UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Maxim DURAND

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

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Immunologie*
Spécialité : *Biologie des organismes*
Unité de recherche : *Centre de Transplantation et Immunologie INSERM UMR 1064*

Soutenue le *7 février 2018*
Thèse N° :

Étude de la régulation lymphocytaire T dans deux modèles de transplantation rénale et pulmonaire

JURY

Président du jury	**Alberto SANCHEZ-FUEYO**, PU-PH, King's College of London, Royaume-Uni
Rapporteurs :	**Christophe PISON**, PU-PH, Unité INSERM 1055, Université de Grenoble
Examinateurs :	**Nathalie BONNEFOY,** Directeur de recherche, IRCM, Unité INSERM 1194, Université de Montpellier
Directeur de Thèse :	**Sophie BROUARD,** Directeur de recherche, CRTI, Unité INSERM 1064, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	**Antoine MAGNAN**, PU-PH, Institut du Thorax, Unité INSERM 1087, Université de Nantes

« Le plus grand savoir est de savoir douter. »

Étienne-François de Vernage ; Maximes et réflexions (1690)

REMERCIEMENTS

Après plusieurs semaines de rédaction intense passées à résumer, discuter et mettre en perspective le travail scientifique accompli durant ces trois dernières années « et demi » … je me confronte désormais à la partie la plus personnelle de ce manuscrit. En effet, le fait de se poser durant quelques heures pour repenser à tout ce que j'ai pu vivre à vos côtés ces dernières années me confirme à quel point cette expérience fut pour moi enrichissante tant sur le plan professionnel que personnel.

Sophie, Antoine, je tiens tout d'abord à vous remercier sincèrement de m'avoir accueilli dans vos équipes de recherche respectives, d'abord en stage de Licence, il y a maintenant plus de 6 ans …. ma première initiation à l'immunologie de la transplantation rénale … puis en stages de Master … lors desquels je me suis passionné pour l'asthme allergique, les modèles murins et finalement la transplantation pulmonaire… Au-delà de tout ce que vous m'avez apporté l'un et l'autre, la genèse de cette thèse, qui m'a captivée durant ces 3 ans, tient essentiellement de votre passion commune pour la recherche et de votre volonté de collaborer malgré les « obstacles » rencontrés. J'ai pris beaucoup de plaisir et j'ai beaucoup appris en travaillant à vos côtés. Je vous remercie pour votre confiance, votre encadrement et votre soutien lorsque j'en avais besoin, tout en me laissant assez d'autonomie pour me permettre de développer mes propres idées et hypothèses de travail. Je vous souhaite le meilleur pour la poursuite de vos projets de recherche respectifs.

Je tiens ensuite à remercier Nathalie Bonnefoy, Christophe Pison et Alberto Sanchez-Fueyo d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que jury ainsi qu'Eliane Piaggio et José Cohen qui ont suivi l'évolution de mes recherches durant ces trois années.

Je remercie également Ignacio Anegon et Régis Josien qui, en leur qualité de directeur de l'Institut de Recherche en Transplantation et Immunologie, m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions.

Les travaux de recherche étant bien plus riches lorsqu'ils émanent d'un travail d'équipe, je remercie l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai collaboré aux cours de ces trois années.

Merci à Cécile Déjou, Jean-François Eliaou et Nathalie Bonnefoy de l'équipe « Immunité et Cancer » de l'IRCM, ainsi qu'à Nicole Bec et Christian Larroque de la plateforme PP2I, pour votre accueil et vos conseils scientifiques sans lesquels nous n'aurions pu aller aussi loin dans la caractérisation de la fonction ATPasique des Tregs.

Je remercie également Gervaise Loirand de m'avoir fait confiance. Bien que notre collaboration fût rapide, j'ai pris beaucoup de plaisir à participer à votre étude et avoir l'occasion de travailler sur l'inflammation dans un contexte qui m'était jusqu'ici étranger.

Je remercie aussi tous les membres passés ou présents de « mon équipe poumon ».

Faouzi, tu sais déjà à quel point j'ai appris en travaillant à tes côtés. Même si, depuis le début, tu ne t'es jamais résolu à me considérer comme un « stagiaire » mais bien comme ton collègue, tu m'as appris énormément de choses et transmis ta passion pour la recherche en Immunologie. J'admire, encore aujourd'hui, ta rigueur scientifique, ton investissement et ta modestie (mais oui … je sais … ce sont les

mathématiciens les vrais génies). Merci pour tout cela, merci pour ces soirées passées à discuter de science (et pas que …), merci pour ton soutien et ton enthousiasme constants pendant ma thèse malgré la distance.

Merci à Marie-Aude de m'avoir formé « dans la douleur » à l'expérimentation animale. Après toutes ces petites tapes sur la tête et pincements lorsque je me loupais sur un LBA ou une intubation … je l'aurais bien mérité mon « Bertrand aime cuisiner ». Merci à toi pour ces super journées passées à l'animalerie entre injections, pléthy, flexi, concours de tir dans les DASRI et crises de rire.

Philippe … notre super chirurgien thoracique, tu m'as ouvert la voie concernant l'identification des biomarqueurs du BOS. Merci pour ton enthousiasme à toutes épreuves et ta disponibilité devant toutes mes questions d'ordre « médical » à propos des patients transplantés pulmonaires. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes cotés et je te souhaite le meilleur pour la poursuite de ton activité en clinique.

Greg, je regrette que nous n'ayons pas eu beaucoup l'occasion de travailler ensemble, merci pour ces discussions toujours constructives autour de nos projets de recherche respectifs. Bon courage pour la suite de ta carrière et pleins de bonheur avec ta petite famille !

Luc … mon collègue, médecin et surtout notre super pipelette locale. Merci pour ta bonne humeur et ton sourire qui donne toujours la pèche. J'espère que nous aurons encore l'occasion de ne pas toujours être d'accord sur nos résultats respectifs. Pleins de bonnes choses pour la poursuite de ta carrière médicale mais aussi en science je l'espère !

Merci à Eugénie, tu sais que tu m'as été d'un grand soutien à la fois professionnel (et oui … sans toi pas de qPCR réalisées aussi rapidement ☺) et personnel particulièrement cette dernière année. J'espère que tu continueras à être notre/le pivot de « COLT échantillons et base de données » et que tu vas t'éclater dans les nouveaux projets à venir.

Merci à Marie, allias, « la belge », m'enfin nous n'avons pas beaucoup travaillé ensemble mais nos soirées hors labo étaient Topiee. On se retrouve bientôt dans le pays des frites et des « spongeon » et des « bouboules sur ta chemise » !

Martin, l'inventeur de surnoms originaux … il est vrai que je fais plus mature que toi, mais de là à m'appeler papy Durand ^^ … Merci pour ces soirées BBQ, jeux et « cytométrie » et ces séances de sport que je reprendrais un jour, promis. Je te souhaite de prendre autant de plaisir que moi dans la poursuite de ta thèse !

Laure, mon ingénieur / co-doctorante ces trois dernières années et désormais docteur Castan (félicitations !). Au-delà de ton accent difficilement compréhensible et de tes plaintes constantes sur le fait que dans le « nord » il fait beaucoup trop froid … j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler à tes cotés ! Merci pour ces soirées et week-end passées en culture ou au cymomètre à discuter science et essayer vainement de trouver des lymphocytes parmi les particules lipidiques des plaques d'athérome. Merci pour ton aide et ta présence lorsque mes manips s'éternisaient souvent tard le soir. Et merci surtout pour ton soutien dans cette dernière ligne droite ! Tu es une scientifique rigoureuse et une personne passionnée et je te souhaite le meilleur dans la poursuite de tes travaux en post-doc.

Je remercie aussi, Jennifer (qui m'a appris que ce n'est pas bien du tout d'écrire sur les PSM et les paillasses ☺), Julie, Aurore, Jérémy, Sandie, Damien, Dorian, Morane, Anaïs, Pierre-Joseph et Mallo pour leur accueil lors de ma thèse et lorsque j'étais encore un jeune étudiant de Master.
Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe 4 du CRTI.

Merci à Jean-Paul, avec qui j'ai partagé, ou plutôt envahi mon bureau et qui m'a « supporté » pendant ces trois années. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Pierrick, merci pour ta disponibilité, ta patience et ton travail en général avec les patients transplantés rénaux. Je ne t'ai pas toujours épargné avec mes demandes qui étaient soient très urgentes, soit très très urgentes …

Je remercie également Magali toujours disponible pour répondre à mes questions à propos des patients tolérants ou plus généralement des patients greffés rénaux, ainsi qu'Irène et Béatrice, nous accueillant toujours avec le sourire malgré nos demandes répétées de prélèvements de donneurs sains.

Richard, tu as été le premier à m'initier il y a de cela 6 ans à l'immunologie de la transplantation, la classification de Banff, les microARN… C'est sur tes conseils que j'ai décidé d'aller me former ailleurs pour finalement revenir travailler auprès de Sophie. Tout d'abord, merci pour cela ! Merci aussi pour tout le travail que tu as fourni dans le cadre des analyses RNAseq malgré les biais et l'ensemble des projets que tu avais à gérer à côté. Tu es un scientifique rigoureux et toujours bienveillant. J'ai adoré travailler à tes cotés et partager quelques parties de billard autour d'un verre dans un « très accueillant » bar belge. Je croise les doigts pour les concours et je te souhaite beaucoup de réussite par la suite de tes projets !

Merci à Mélanie, digne représentante de la team B cells (même si bon, soyons francs … les Tregs ce sont quand même les plus importants ☺). Je ne vanterais pas uniquement ton sourire et ta bonne humeur, ce serait trop simple ! Merci beaucoup pour ton aide sur le travail avec les patients tolérants. Bonne chance pour la suite et je croise les doigts pour les papiers à venir.

Nicolas, toujours à la pointe en cytométrie et prêt à donner des conseils avisés. Bien que nous n'ayons que peu travaillé ensemble je te remercie pour ton aide ! Je ne m'étendrais pas sur l'épisode du toboggan américain destiné aux grands enfants de tous âges … mais je garderais un très bon souvenir de ces ballades à Chicago en béquilles ! Je te souhaite le meilleur pour la poursuite de tes projets de recherche.

Alexandra, le « pilier » de l'équipe 4. Tout d'abord encore félicitation pour ton EPHE, tu le mérites grandement ! Merci, tu fais partie de ceux qui m'ont permis de m'intégrer aussi facilement au sein de l'équipe et du laboratoire. Merci aussi pour ta carte d'impression ... ta carte d'accès au labo … tes conseils concernant les commandes … toutes tes réponses à mes centaines de questions … et toujours avec le sourire ! Merci aussi pour toutes ces soirées tardives au laboratoire entre boulot, projection privée de films, livraison de nourriture rarement diététique et pauses café ! J'espère que tu vas continuer à autant t'amuser dans la recherche.

Je remercie également les stagiaires avec lesquels j'ai eu la chance de travailler ces trois dernières années. Tout particulièrement Florian, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi lors de ton master 1 et je te souhaite le meilleur pour la poursuite de ta thèse.

Je remercie aussi Sophie C., Alexis, Émilie, Gaëlle, Lola, Ludmilla, Hoa, Jérémy, Amédée et Adrien qui m'ont accueilli lors ces trois années de thèse

Un GRAND, un ENORME merci à Carole ! Ma labmate, amie et collaboratrice. Nous aurons vécu beaucoup de choses ensemble, à la fois au laboratoire et dans le cadre de notre grand projet « Recyclabs ». Bien que nous n'ayons pas pu tout mener de front cette dernière année, j'ai pris énormément de plaisir à travailler avec toi. Tu es une scientifique hors-pair, une amie géniale et une sacrée entrepreneuse !!! Cette thèse n'aurait pas été la même sans toi … merci d'avoir passé autant de temps à mes côtés pour m'aider, parfois me booster et souvent me calmer :-D. J'espère sincèrement que nous aurons un jour l'occasion de re-réfléchir ensemble sur nos projets de recherche et nos projets personnels autour d'un petit verre de vin et d'un plateau de charcuterie. Merci pour tout ! Je te souhaite le meilleur pour la suite en recherche et avec tes deux petits bouts de choux.

Une pensée pour les joueurs (semi-professionnels) de fléchettes et les amateurs de breuvages des (jeudi) vendredi (et samedi) soirs.

Mathieu, que dis-je, Dr Sikorski, toujours partant pour se changer un peu les idées et améliorer sa technique pour viser le bull ! Encore félicitation pour la thèse, on se retrouve dans quelques semaines pour une petite partie !

Jérémy, notre futur médecin et jeune chercheur brillant aux pouvoirs surnaturels, capable de faire deux rebonds sur les murs et plafond avant d'atteindre le cible (la morille : technique récemment ajoutée aux règles officielles de la World Darts Federation). Je te souhaite le meilleur pour la poursuite de ta thèse !

Alexandra (et oui … encore), Laure, Vaness, J-C, Yodit, Théo, Claire, Damien, Justine (animatrice officielle de soirées thème Céline Dion), « Malo, Alex et Pierre » (les challengers). Merci à vous tous pour ces soirées mémorables ayant rythmé ces deux dernières années de thèse.

Je tiens également à remercier Néjma. Cette thèse n'aurait pas été la même sans ta présence, tes conseils et réflexions autours de nos projets de recherche respectifs. Je te remercie pour ton soutien infaillible lors de ces trois années de thèse. Je te souhaite de réussir dans la poursuite de ta carrière en post-doc.

Merci à l'ensemble des membres présents et anciens du bureau de l'Asso DNA BioSanté : Tiphaine, Marie, Lindzy, Martin (bon courage pour la reprise de l'asso), Damien, Dimitri, Ennys et Méryl. J'ai pris énormément de plaisir à sortir un peu du travail de thèse pour organiser avec vous les événements permettant de faire vivre le corps de la recherche en biologie sur le territoire nantais.

Merci également à mes camarades thésards qui ont déjà ou qui vont bientôt soutenir leur thèse : Jason, Ahmed, Eros, Laure, Néjma, Mat, Lola, Lyssia, et j'en oublie surement ; ainsi qu'à mes amis qui ont suivis mon parcours du Master à la thèse et qui m'ont toujours rassuré dans mes choix : Bapt, Gio et Théo … la triplette parfaite lorsqu'il s'agit de se changer un peu les idées et de parler qualité, production, conseil ou affaires réglementaires !

Enfin, je remercie ma famille, Papa, Maman, Fanny. Jamais je n'aurais pu réaliser tout ceci sans votre aide. Merci pour tout. Merci mille fois pour votre soutien et votre présence malgré la distance. Je vous aime.

AVANT-PROPOS

La transplantation est aujourd'hui la seule opportunité thérapeutique pour des milliers de patients atteints d'une perte de fonction terminale d'organes vitaux. En 2015, plus de 120 000 transplantations ont été réalisées à travers le Monde (GODT). Les organes les plus couramment transplantés étaient le rein (84 300), le foie (27 800), le cœur (7 000), les poumons (5 000), le pancréas (2 300) et le petit intestin (200). Du fait de l'éducation du système immunitaire des receveurs, permettant la défense de l'organisme contre l'infection de pathogènes, l'organe transplanté est reconnu comme étranger et par conséquent attaqué comme tel. La transplantation d'un organe s'accompagne donc systématiquement de traitements immunosuppresseurs pour contrôler la réponse immune dirigée contre l'allogreffe. Les récents progrès réalisés dans le développement de ces médicaments immunosuppresseurs, régulant de plus en plus précisément l'action des populations immunitaires cibles, ont permis de prévenir de façon importante la survenue du rejet aigu. Néanmoins, la survie du greffon à long terme reste fortement impactée par la survenue de rejet ou dysfonction chronique, mal contrôlés par les traitements actuels, quel que soit l'organe transplanté. La compréhension des mécanismes conduisant au rejet chronique constitue donc actuellement un enjeu majeur dans le domaine de la transplantation.

Un autre enjeu de recherche actuel repose sur l'induction chez les receveurs d'une tolérance envers l'organe du donneur sans passer par l'utilisation de traitement immunosuppresseur. Pour atteindre cet état de tolérance, plusieurs équipes s'intéressent à la possibilité d'exploiter les mécanismes physiologiques de l'éducation du système immunitaire à la reconnaissance du soi. Le but étant de pouvoir appliquer la tolérance centrale, la tolérance au soi à la tolérance en transplantation afin que l'hôte reconnaisse la greffe sans générer de réaction immunitaire agressive à son égard. Cependant, l'existence d'un état de tolérance dite opérationnelle ou spontanée, retrouvé chez près de 20% des patients après une transplantation hépatique et plus rarement chez des patients après une transplantation rénale, a remis en question le dogme de l'induction de tolérance via l'exploitation des mécanismes de tolérance centrale. Chez ces patients, la tolérance, dite opérationelle, se caractérise par une survie fonctionnelle du greffon à long terme en l'absence d'immunosuppression

chronique (Waldmann, 1999). Les études effectuées sur ces patients opérationellement tolérants suggèrent la mise en jeux des mécanismes de tolérance périphérique pouvant participier à cet état de tolérance alloimmmune.

Mieux comprendre des mécanismes impliqués dans les phénomènes de rejet chronique, identifier des marqueurs prédictifs précoces de la perte de fonction des greffons à long terme et décrypter les mécanismes à l'origine de la tolérance spontanée afin qu'ils servent de base à l'induction de tolérance ou permettent une meilleure survie des greffons à long terme sont trois axes prioritaires de la recherche en transplantation.

C'est à partir de ces problématiques que j'ai, durant ma thèse, travaillé sur (i) l'étude des mécanismes de la tolérance après transplantation rénale via l'analyse de la fonction des lymphocytes T régulateurs mémoires dans la perturbation de leur environnement métabolique, (ii) l'analyse du profil lymphocytaire T circulant chez des patients atteints de dysfonction chronique après transplantation pulmonaire et l'identification de la proportion des cellules T régulatrices comme un potentiel biomarqueur prédictif de la survenue du rejet.

Au cours de ma thèse, j'ai également réalisé d'autres travaux portant sur la compréhension des mécanismes de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire, lors desquels je me suis intéressé à la régulation lymphocytaire B en transplantation pulmonaire. J'ai également participé à l'étude du rôle joué par les lymphocytes B régulateurs dans un modèle murin d'asthme allergique, une situation pathologique impliquant une réaction inappropriée du système immunitaire face à des protéines environnementales sans danger pour l'organisme.

Ce manuscrit traite exclusivement des travaux portant sur les lymphocytes T régulateurs dans la tolérance opérationnelle après transplantation rénale et la survenue de rejet chronique après transplantation pulmonaire chez l'Homme. Les travaux portant sur l'étude des lymphocytes B et de l'immunorégulation dans l'asthme allergique sont présentés en annexe.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS I
AVANT-PROPOS V
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS 1
LISTE DES ABRÉVIATIONS 5
LISTE DES FIGURES 7
LISTE DES TABLEAUX 8
CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS 9
I. L'acquisition de la tolérance au soi 9
A. L'éducation thymique des lymphocytes T : sélection positive et tolérance centrale 10
1. Le développement des thymocytes 11
2. La sélection positive 12
3. La sélection négative : la tolérance centrale 12
B. La tolérance périphérique 14
1. Les mécanismes intrinsèques 15
2. Les mécanismes extrinsèques 17
i. Les cellules régulatrices du compartiment lymphocytaire T 17
ii. Les autres cellules régulatrices 20
II. Les lymphocytes T régulateurs 24
A. La découverte des cellules T régulatrices 24
B. Les avancés dans la caractérisation phénotypique des Tregs 25
1. Les premiers marqueurs : CD5 et CD45RB 25
2. La molécule CD25 : un marqueur plus restreint mais non exclusif 27
3. FoxP3 : facteur de transcription clé du développement et de la fonction des Tregs 28
4. Le CD127 : la chaine alpha du récepteur à l'IL-7 30
5. Les autres marqueurs des Tregs 31
C. Le développement des Tregs 32
1. Le développement thymique des tTregs 33
2. L'induction en périphérie des pTregs 36
3. Comment différencier les pTregs des tTregs 37
i. Les marqueurs phénotypiques 37
ii. La spécificité antigénique 39
iii. Modification épigénétique et stabilité 39
D. Les mécanismes d'action de Tregs 40
1. L'induction d'apoptose de lymphocytes T effecteurs 40
2. La déprivation en IL-2 necessaire à l'activité T effectrice 41
3. La sécrétion cytokinique : induction d'un environnement pro-tolérogène 41
i. Le TGF-béta 42
ii. L'interleukine 10 43

iii. Les autres cytokines pro-tolérogènes 44
4. Modulation de la fonction et de la maturation des cellules dendritiques 45
5. Modification métabolique de l'environnement cellulaire 46
E. Tregs : les fonctions physiologiques et physiopathologiques 46
III. La transplantation 49
A. Historique de la transplantation 49
B. Les limites de la transplantation 50
1. Le manque de donneurs 50
2. Les complications précoces : chirurgicales et infectieuses 52
3. Les complications tardives : immunosuppression et rejets 53
C. La réponse allo-immune et le rejet d'allogreffe 53
1. La reconnaissance du greffon par le système immunitaire du receveur 53
i. La voie directe 54
ii. La voie indirecte 55
iii. La voie semi-directe 55
2. Le rejet hyper aigu 56
3. Le rejet aigu 56
4. Le rejet ou la dysfonction chronique 57
D. Le syndrome de bronchiolite oblitérante 57
1. Le diagnostic du BOS 57
2. Les mécanismes impliqués dans le développement du BOS 59
3. Les facteurs de risque 60
4. Comment traiter le BOS ? 61
5. Les biomarqueurs du BOS 62
E. La prévention et le traitement du rejet : l'immunosuppression 62
1. L'inhibition de la prolifération celullaire 62
2. Les corticoïdes 64
3. Le blocage de l'activation des lymphocytes T 64
i. Le blocage du premier signal 64
i. Le blocage du deuxième signal 66
i. Le blocage du troisième signal 66
4. La déplétion lymphocytaire 67
5. Le blocage de la migration des cellules effectrices 67
6. Les effets délétères de l'immunosupression à long terme 68
F. La tolérance en transplantation : l'objectif ultime 68
1. L'induction de tolérance en transplantation 69
2. La tolérance opérationnelle après transplantation rénale 70
3. Les lymphocytes T régulateurs, transplantation rénale et tolérance opérationelle – REVUE N°1 74
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DE LA THÈSE 88
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS 90
I. Article n°1 90

II. Article n°2 118
CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES 151
I. Discussion de l'article 1 151
II. Discussion de l'article 2 157
III. Discussion générale 162
ANNEXES 164
I. la tolérance opérationnelle 164
A. Article n°3 164
II. Le rejet chronique d'allogreffe pulmonaire 174
A. Article n°4 174
B. Revue n°2 196
III. Le rôle des Bregs dans l'asthme allergique 206
A. Article n°5 206
B. Article n°6 218
RÉFÉRENCES 243

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Revues didactiques

Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions?

*Faouzi Braza, **Maxim Durand**, Nicolas Degauque, Sophie Brouard*

Publié dans American Journal of Transplantation : 15, 2288–300 (2015).

COLT : 10 ans de recherche en transplantation pulmonaire, résultats et perspectives

*Adrien Tissot, Aurore Foureau, Carole Brosseau, Richard Danger, Antoine Roux, Eric Bernasconi, Carine Gomez, **Maxim Durand**, Benjamin Renaud Picard, Jérôme Le Pavec, Johanna Claustre, Philippe Lacoste, Myriam Benmerad, Mallory Pain, Valérie Siroux, Pierre-Joseph Royer, Pierre Mordant, Martine Reynaud-Gaubert, Romain Kessler, Olivier Brugière, Jean-François Mornex, Claire Dromer, Marcel Dahan, Christiane Knoop, Véronique Boussaud Angela Koutsokera, Karine Botturi-Cavailles, Eugénie Durand, Jennifer Loy, Laurent Nicod, Christophe Pison, Sophie Brouard, Xavier Blanc, Antoine Magnan, pour le COLT consortium.*

Soumis

Articles originaux

A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation

Faouzi Braza, Julie Chesne*, **Maxim Durand**, Stéphanie Dirou, Carole Brosseau, Guillaume Mahay, Marie-Aude Cheminant, Antoine Magnan, Sophie Brouard*

Publié dans Allergy : 70, 1421–31 (2015).

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients

Richard Danger, Mélanie Chesneau, Chloé Paul, Pierrick Guérif, ***Maxim Durand****, Kenneth A Newell, Sai Kanaparthi, Laurence A Turka, Jean-Paul Soulillou, Rémi Houlgatte, Magali Giral, Gérard Ramstein, Sophie Brouard*

Publié dans Kidney International : 91, 1473–1481 (2017).

Leukocyte RhoA exchange factor Arhgef1 mediates vascular inflammation and atherosclerosis

Maria Luigia Carbone, Gilliane Chadeuf, Sandrine Heurtebise-Chrétien, Xavier Prieur, Thibault Quillard, Yann Goueffic, Nathalie Vaillant, Marc Rio, Laure Castan, ***Maxim Durand****, Céline Baron-Menguy, Julien Aureille, Juliette Desfrançois, Angela Tesse, Raul M Torres & Gervaise Loirand*

In press dans Journal of Clinical Investigation : doi:10.1172/JCI92702 (2017)

Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance

Maxim Durand*, Florian Dubois, Cécile Dejou, Eugénie Durand, Richard Danger, Mélanie Chesneau, Carole Brosseau, Pierrick Guerif, Nicolas Degauque, Jean-François Eliaou, Magali Giral, Nathalie Bonnefoy, Sophie Brouard*

In press dans Kidney International

High circulating CD4+CD25hiFoxP3+ T cell subpopulation early after transplantation is associated with development of Bronchiolitis Obliterans Syndrome

Maxim Durand**, Philippe Lacoste*, Richard Danger, Lola Jacquemont, Carole Brosseau, Eugénie Durand, Gaëlle Tilly, Jennifer Loy, Aurore Fourreau, Pierre-Joseph Royer, Adrien Tissot, Antoine Roux, Martine Reynaud-Gaubert, Romain Kessler, Sacha Mussot, Claire Dromer, Olivier Brugière, Jean François Mornex, Romain Guillemain, Johanna Claustre, Nicolas Degauque, Antoine Magnan, Sophie Brouard, COLT and SysCLAD consortia*

In press dans Journal of Lung and Heart Transplantation

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

Circulating CD9+ B cells: biomarker of long-term BOS-free survival after lung transplantation

Carole Brosseau, **Maxim Durand***, Eugénie Durand, Richard Danger, Jennifer Loy, Aurore Fourreau, Mélanie Chesneau, Philippe Lacoste, Pierre-Joseph Royer, Adrien Tissot, Antoine Roux, Martine Reynaud-Gaubert, Romain Kessler, Sacha Mussot, Claire Dromer, Olivier Brugière, Jean François Mornex, Romain Guillemain, Johanna Claustre, Antoine Magnan, Sophie Brouard and COLT and SysCLAD consortia*

Soumis

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

CD9+ Regulatory B Cells Induce Effector T Cell Apoptosis: a New Therapeutic Strategy For Severe Asthma

*Carole Brosseau, **Maxim Durand**, Luc Colas, Eugénie Durand, Aurore Foureau, Marie-Aude Cheminant, Gregory Bouchaud, Laure Castan, Martin Klein, Antoine Magnan, Sophie Brouard*

Soumis

Communications orales

High regulatory T cells rate early after lung transplantation is associated with Bronchiolitis Obliterans Syndrome development

2017 American Transplant Congress, Chicago – USA, 29 avril-3 mai 2017

Profil lymphocytaire T régulateur : possible biomarqueur prédictif du développement de Bronchiolite Oblitérante

16ème réunion annuelle de la Société Francophone de Transplantation, Liège – Belgique, 6-9 décembre 2016

Regulatory T lymphocytes profile as a possible predictive biomarker of the Bronchiolitis Obliterans Syndrome after lung transplantation

DHU 2020 Autumn School - Fibrosis and remodeling: from common pathways to personalized targets, Nantes, 27-28 octobre 2016

Analysis of the regulatory T lymphocytes profile as predictive biomarker of the lung allograft chronic dysfunction

12th International Congress on Lung Transplantation, Paris, 15-16 septembre 2016

Immunomonitoring Lymphocytaire T et signature prédictive du rejet chronique d'allogreffe pulmonaire chez l'Homme

Lung Storming 2016, Paris, 17-18 juin 2016

Memory regulatory T cells: A potential actor in immunological operational tolerance in Kidney-transplant patients

2nd IGO Summer meeting, Nantes, 22 avril 2016

Posters

Regulatory T lymphocytes profile as a possible predictive biomarker of the Bronchiolitis Obliterans Syndrome after lung transplantation

DHU 2020 Autumn School - Fibrosis and remodeling: from common pathways to personalized targets, Nantes, 27-28 octobre 2016

Memory Regulatory T cells: a potential actor in immunological operational tolerance in kidney-transplant patients via the ATP degradation into adenosine

Journées de l'École Doctorale Biologie Santé de Nantes/Angers, Nantes, 10-11 décembre 2015

Analysis of the regulatory T lymphocytes profile as predictive biomarker of the lung allograft chronic dysfunction

German-French Lung Retreat 2015, Weissach – Germany, 24-27 mars 2015

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADO	Adénosine
ADP	Adénosine diphopsphate
AIRE	Auto Immune Regulator
AMP	Adénosine monophopsphate
ARAD	Dysfonction d'allogreffe pulmonaire reversible suite au traitement à l'azythromycine
ATP	Adénosine triphopsphate
BAL	Lavage broncho-alvéolaire
BOS	Syndrome de bronchiolite oblitérante
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CDR3	Domaine hyper variable 3 de la chaine alpha du TCR
CEB	Cellule epithéliale bronchique
CLAD	Dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNI	Inhibiteur de la calcineurine
COLT	Cohort in lung transplantation
CPT	Capacité pulmonaire totale
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DN	Thymocyte double négatif CD4-CD8-
DP	Thymocyte double positif CD4+CD8+
DSA	Anticorps spécifique du donneur
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBV	Epstein-Barr virus
FoxP3	Forkhead box P3
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GITR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes
GZMB	Granzyme B
HLA	Antigène des leukocytes humains
IBD	Maladie inflammatoire de l'intestin
ICOS	Costimulateur des lymphocytes T inductible
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFNg	Interféron gamma
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
ILT	Immunoglobulin-like transcript

IPEX	Syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X
LAG3	Gène d'activation lymphocytaire 3
LPS	Lipopolysaccharide
MLR	Réaction mixte lymphocytaire
MMF	Mycophenolate mofetif
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères
NF kB	Facteur nucléaire kappa B
NFAT	Facteur nucléaire des lymphocytes T activés
NK	Cellule natural killer
PD1	Programmed cell death 1
PGD	Dysfonction primaire du greffon
RAG	Gène d'activation de le recombinaison
RAS	Syndrome restrictif d'allogreffe pulmonaire
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère
SP	Thymocyte simple positif
TCR	Recepteur des lymphocytes T
TEC	Cellule épithéliale thymique
cTEC	Cellule épithéliale du cortex thymiqe
mTEC	Cellule épithéliale de la médulla thymique
TEMRA	Lymphocyte T effecteur mémoire CD45RA+
Tfh	Lymphocyte T folliculaire helper
TGF-ß	Transforming growth factor béta
Th	Lymphocyte T helper
TIM1	T-cell immunoglobulin and mucin domain 1
TLR	Toll like receptor
TNFR2	Récepteur du facteur de nécrose tumorale 2
TR1	Lymphocyte T régulateur de type 1
Treg	Lymphocyte T régulateur
iTreg	Treg induits i*n vitro*
mTreg	Treg mémoire
nTreg	Treg naïf
nonTreg	Cellule T FoxP3+ non régulatrice
pTreg	Treg induit en périphérie
tTreg	Treg dérivé du thymus
TSDR	Région déméthylée spécifique des lymphocytes T régulateurs
TSLP	Lymphoprotéine stromal thymique
VEMS	Volume maximal expiré en une seconde

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le développement thymique des cellules lymphocytaires T 10

Figure 2 : La sélection positive et négative lors du développement lymphocytaire T dans le thymus 13

Figure 3 : Les mécanismes de la tolérance périphérique..... 15

Figure 4 : Mécanismes d'action des cellules dendritiques tolérogènes..... 22

Figure 5 : La proportion des différentes sous-populations identifiées comme enrichies en lymphocytes T régulateurs 26

Figure 6 : Les deux voies de développement des Tregs..... 33

Figure 7 : Le développement thymique des tTregs 35

Figure 8 : Temps relatif du développemet de rejet hyper aigu, aigu et chronique après transplantation..... 53

Figure 9 : Les diférentes voies de reconnaissance des alloantigènes 54

Figure 10 : Modification histologiques et de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de BOS et de RAS..... 58

Figure 11 : Les différentes étapes de l'activation lymphocytaire T..... 65

Figure 12 : Induction de Tregs par les lymphocytes B GzmB+ *in vitro*..... 154

Figure 13 : Hypothèse du rôle de l'activité ATPasique des mTregs dans l'allogreffe 156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes sous-populations lymphocytaires T CD8 régulatrices..... 18

Tableau II : Les différentes sous-populations lymphocytaires B régulatrices humaines 22

Tableau III : Evolution du nombre de nouveaux inscrits dans l'année de 2006 à 2015 51

Tableau IV : Evolution du nombre d'inscrits au 1er janvier de 2006 à 2015 51

Tableau V : Evolution du nombre de greffes d'organes effectuées de 2006 à 2015. 51

Tableau VI : Les biomarqueurs diagnostics et prédictifs de la survenue du BOS..... 63

CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS

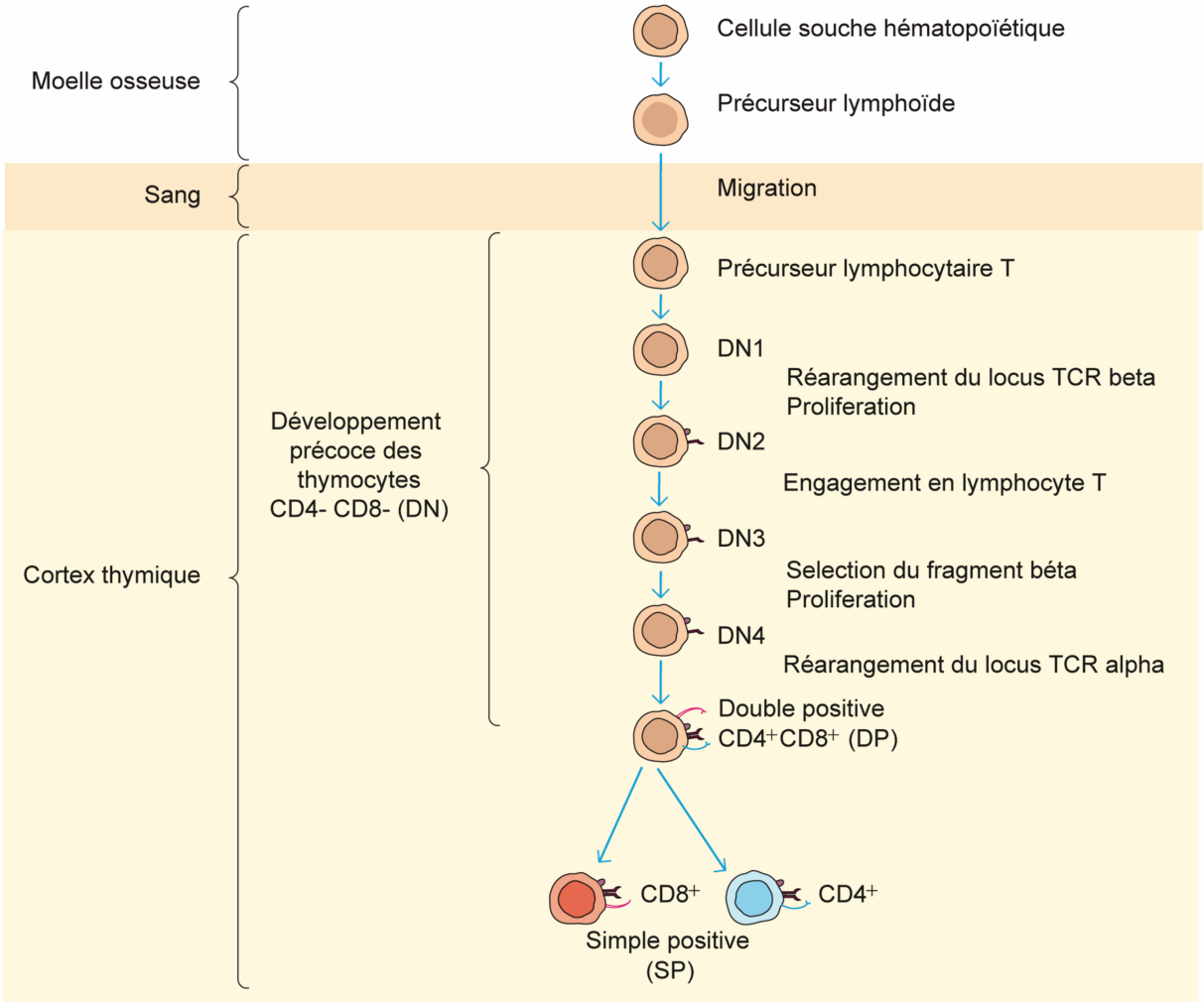
« Tout être vivant est une " machine " développée par l'évolution pour survivre à des hasards infiniment complexes : ses rencontres avec les agents infectieux pathogènes, mais aussi les dysfonctionnements de ses cellules, erreurs ou mutations. […] D'où les mécanismes de défense, eux-mêmes très complexes, mis en place contre ces ennemis, tant externes qu'internes. Confiés au système immunitaire, ces mécanismes de survie se sont développés en un " jeu du chat et de la souris évolutif " » Philippe Kourilsky

I. L'ACQUISITION DE LA TOLÉRANCE AU SOI

Le système immunitaire est par définition un réseau complexe dédié à la protection des organismes multicellulaires contre les pathogènes présents dans notre environnement. Ou présenté différemment, la protection de l'intégrité, du « soi » contre le « non-soi » (Burnet and Fenner, 1949; Mečnikov, 1901). Sa première ligne de défense, l'immunité innée, est efficace et rapide mais primitive et peu spécifique. Au-delà des barrières physiques (épithélium et muqueuses) et des barrières chimiques, les cellules de l'immunité innée reconnaissent des motifs microbiens et des signaux de danger. Contrairement aux cellules de l'immunité adaptative tel que les lymphocytes T et B, celles de l'immunité innée ne sont pas sujettes à l'éducation à la reconnaissance du soi, ni à la mémoire immunitaire. Ce sont ces mécanismes physiologiques de tolérance au soi qui assurent l'absence de réaction immunitaire agressive envers les tissus de l'hôte qui pourrait conduire au développement de pathologies auto-immunes (Hogquist et al., 2005). Néanmoins, lors d'une transplantation, ces mécanismes sont à l'origine de l'attaque par le système immunitaire du greffon reconnu comme étranger.

A. L'éducation thymique des lymphocytes T : sélection positive et tolérance centrale

La génération de lymphocytes T matures capables d'initier une réponse adaptative vis à vis d'un antigène nécessite deux processus distincts : le développement précoce des thymocytes et les événements de sélection positive et négative (Figure 1).



D'après Kuby Immunology, seventh edition, 2013, W.H. Freeman and Company, New York

Figure 1 : Le développement thymique des cellules lymphocytaires T

Les précurseurs lymphoïdes sont issus de la maturation des cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse. Ils migrent vers la jonction cortico-médullaire via la circulation sanguine. Leur maturation en thymocytes double-négatifs (DN), puis double-positifs (DP) et enfin simple-positifs (SP) a lieu dans le cortex thymique et permet la génération de thymocytes portant un récepteur des cellules T (TCR) fonctionnel.

1. Le développement des thymocytes

D'abord, un faible nombre de précurseurs lymphoïdes issus de la moelle osseuse migre vers le thymus via la circulation sanguine (Kadish and Basch, 1975; Wallis et al., 1975). Leur interaction avec l'épithélium thymique et plusieurs étapes de migration du compartiment cortico-médullaire vers le cortex aboutissent à leur maturation en thymocytes immatures dit double-négatifs $CD4^-$ $CD8^-$ (DN). On distingue quatre populations de thymocytes immatures en fonction de leur stade de maturation : DN1, DN2, DN3 et DN4 (Godfrey et al., 1993). Au stade DN1, les thymocytes peuvent encore entrer dans des voies de différenciation menant à la formation de cellules dendritiques, de cellules Natural Killer (NK) ou de lymphocytes B. C'est lorsque ces thymocytes deviennent résidents du cortex thymique qu'ils vont entrer définitivement dans le lignage lymphocytaire T au stade DN2. À ce stade, intervient le réarrangement somatique des gènes V, D et J codants la chaine béta du récepteur des lymphocytes T (TCR) faisant intervenir les enzyme RAG (Recombination Activation Gene) (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992, 1993). Ainsi au stade DN3, les thymocytes expriment un pré-TCR formé d'une chaine béta fonctionnelle et d'une pseudo-chaine alpha. L'expression de ce pré-TCR, permet une signalisation intracellulaire qui est nécessaire à la survie et la prolifération des thymocytes DN3, c'est la sélection béta (von Boehmer and Fehling, 1997; Hoffman et al., 1996). Cette voie de signalisation intracellulaire induit leur maturation en thymocytes DN4 qui vont fortement proliférer et être sujets à l'exclusion allélique empêchant l'expression d'un second TCR (Malissen et al., 1992). Enfin, ces thymocytes acquièrent l'expression des molécules CD4 et CD8, ils sont alors appelés double-positifs $CD4^+$ $CD8^+$ (DP) et ne prolifèrent plus. C'est aussi à ce stade que les réarrangements du gène codant pour la chaine alpha aboutissent à l'expression d'un TCR mature alpha/béta à la surface des thymocytes DP (Raulet et al., 1985).

Le caractère aléatoire des réarrangements somatiques des gènes codant les chaines alpha et béta du TCR permet la génération de thymocytes capables de reconnaître un très grand nombre d'antigènes. Mais ce répertoire TCR extrêmement diversifié est aussi composé de thymocytes qui (i) n'ont pas la capacité d'interagir avec les molécules présentatrices d'antigène du soi (CMH) ou (ii) qui reconnaissent des antigènes du soi, dit auto-antigènes et peuvent donc engendrer des réponses

immunes délétères à l'intégrité du soi. Les cellules épithéliales thymiques présentent aux thymocytes DP des antigènes du soi portés par des molécules de CMH de classe I et II du soi. Cette interaction permet la mise en place de mécanismes de sélection positive et négative aboutissant à la survie exclusive des thymocytes capables de reconnaître un antigène étranger présenté par une molécule de CMH du soi.

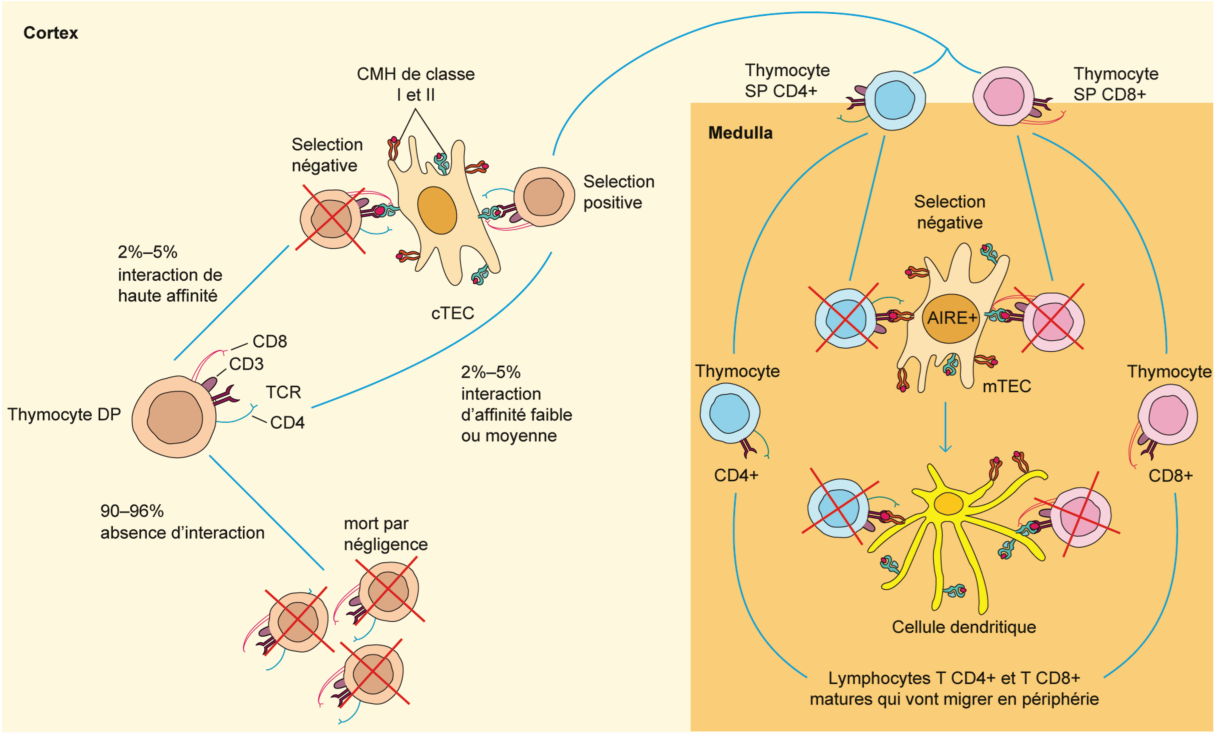
2. La sélection positive

La sélection positive correspond à la sélection des thymocytes exprimant un TCR capable de reconnaître les molécules de CMH du soi. Plus de 90% des thymocytes DP ne présentent qu'une faible affinité TCR CMH/peptide du soi, par défaut de reconnaissance de la molécule de CMH du soi. Ils ne passent pas cette étape de sélection et meurent par apoptose : c'est la mort par négligence (Merkenschlager et al., 1997) (Figure 2).

3. La sélection négative : la tolérance centrale

La sélection négative, aussi appelée tolérance centrale, permet la survie des thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas les auto-antigènes présentés dans le thymus. Initialement, la sélection négative a été décrite comme ayant lieu dans le cortex thymique via la présentation d'auto-antigènes par les cellules épithéliales (cTEC). Cela soulevait la question de la diversité des peptides du soi pouvant être présentés aux thymocytes en cours de maturation. Comment, dans le thymus, pouvait se faire la sélection négative de thymocytes dont le TCR est spécifique d'auto-antigènes tissus-spécifiques (de l'intestin, du foie, du rein, du poumon …) ? C'est la découverte de la capacité des cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) à présenter des antigènes tissulaires qui a permis de mieux comprendre ce processus de sélection négative (Kyewski et al., 1984). En effet, contrairement aux cTEC, les mTEC expriment le facteur de transcription AIRE (Auto Immune REgulator) qui permet l'expression et la présentation d'antigènes tissulaires (Derbinski et al., 2001; Liston et al., 2003). Dans le cortex thymique, les thymocytes DP sont donc soumis à la sélection positive et négative par interaction avec les cTEC. Moins de 5% d'entre eux passeront ces étapes de sélection.

Ceux-ci vont alors exprimer à leur surface soit la molécule CD4 soit la molécule CD8 ainsi que le récepteur CCR7 qui, via l'interaction avec ses ligands CCL19 et CCL21, permet leur migration vers la médulla thymique ; ce sont des thymocytes dits simple-positif (SP) (Ueno et al., 2004). Dans la médulla, les thymocytes SP subissent une nouvelle étape de sélection négative lors de l'interaction avec trois types de cellules présentatrices : les cellules mTEC, les cellules dendritiques circulantes et les cellules dendritiques capables de capter et de présenter les antigènes initialement présentés par les mTEC par transfert d'antigènes (Humblet et al., 1994; Koble and Kyewski, 2009) (Figure 2).



D'après Kuby Immunology, seventh edition, 2013, W.H. Freeman and Company, New York

Figure 2 : La sélection positive et négative lors du développement lymphocytaire T dans le thymus

Les thymocytes double-positifs (DP) sont soumis dans le cortex thymique à sélection positive lors de leur interaction avec les cellules épithéliales du cortex (cTEC). Moins de 10% des thymocytes DP capables de reconnaître les molécules de présentation des antigènes (CMH) du soi survivent. La présentation d'antigènes du soi par les cTEC aboutit à une première étape de sélection négative des thymocytes DP dans le cortex thymique. Après maturation, les thymocytes simple-positifs (SP), migrent dans la médulla thymique via l'interaction CCR7/ ligands de CCR7. Dans la médulla, les cellules épithéliales (mTEC) exprimant le facteur de transcription AIRE présentent des antigènes du soi non présentés par les cTEC (antigènes tissus-spécifiques). L'interaction des thymocytes SP avec les mTEC et les cellules dendritiques de la médulla permet une seconde étape de sélection négative aboutissant à la génération de lymphocytes T matures.

La reconnaissance d'un complexe CMH du soi/peptide du soi par les thymocytes DP dans le cortex thymique ou SP dans la médulla thymique peut avoir plusieurs conséquences. Le premier mécanisme de tolérance centrale identifié et le plus communément décrit est la délétion clonale (Gallegos and Bevan, 2004; Kappler et al., 1987). Il correspond à la mort par apoptose des thymocytes auto-réactifs. D'autres mécanismes ont ensuite été proposés. Les thymocytes portant un TCR spécifique d'auto-antigène peuvent être sujet à l'anergie clonale, c'est à dire l'induction d'un défaut de fonction et de prolifération des lymphocytes T dans un contexte de stimulation antigénique (Hudrisier et al., 2003; Ramsdell and Fowlkes, 1992; Ramsdell et al., 1989). La sélection négative peut aussi aboutir à l'inhibition de la maturation des thymocytes spécifiques d'auto-antigène. Enfin, bien que ce mécanisme soit controversé, des évènements de réarrangement du gène codant la chaine alpha du TCR peuvent être mis en place dans le but de modifier la spécificité antigénique et ainsi laisser une seconde chance aux thymocytes auto-réactifs (Kreslavsky et al., 2013; McGargill et al., 2000).

Suite aux évènements de sélection positive et négative, lorsque la maturation des thymocytes en lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$ fonctionnels est effective, ceux-ci vont quitter le thymus et migrer en périphérie. Cette migration est dépendante de l'expression de la protéine S1P1 (Sphingosine-1-phosphate receptor 1), augmentée chez les lymphocytes T matures (Matloubian et al., 2004), qui est le récepteur de la protéine S1P secrété par les cellules endothéliales vasculaires (Venkataraman et al., 2008).

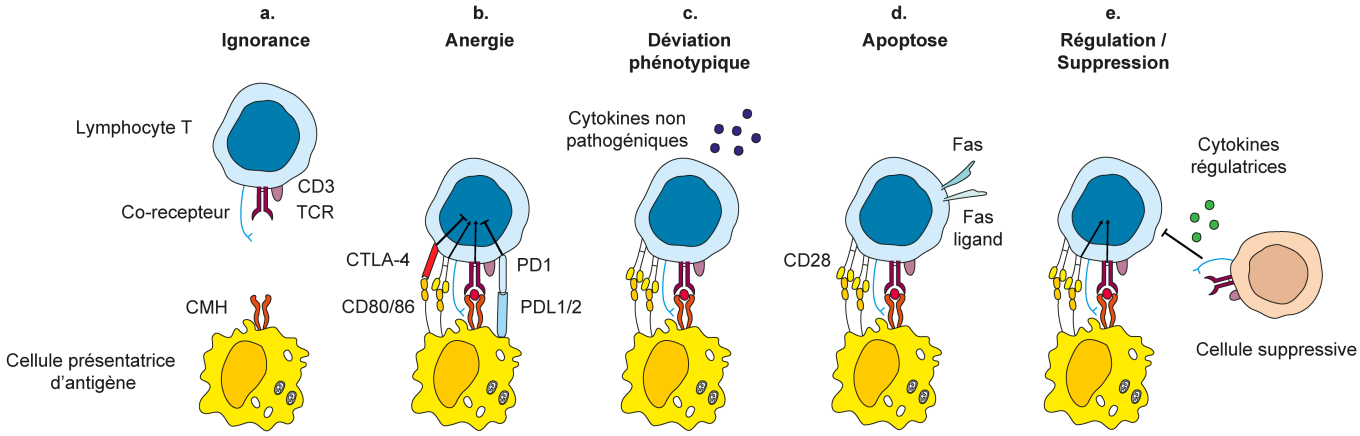
B. La tolérance périphérique

Bien que lors du développement thymique les cellules lymphocytaires T soient soumises à la sélection négative, tous les antigènes du soi ne sont pas présentés par les cellules cTEC et mTEC. Ainsi, le filtre de la sélection négative n'est pas parfait et l'on retrouve des lymphocytes T auto-réactifs, ayant échappés à la délétion clonale, en périphérie chez des individus sains (Bouneaud et al., 2000). Afin d'assurer l'intégrité des tissus de l'hôte et donc l'absence de réaction immune en réponse aux antigènes du soi, une tolérance dite périphérique est également mise en place. Comme pour la tolérance centrale, des mécanismes distincts sont présents pour assurer la tolérance

périphérique. On distingue les mécanismes intrinsèques, propres à la cellule T mature qui reconnaît en dehors du thymus un auto-antigène et les mécanismes extrinsèques faisant intervenir des cellules régulatrices présentes en périphérie.

1. Les mécanismes intrinsèques

Le scénario le plus simple permettant d'empêcher la réponse d'une cellule T auto-réactive envers un antigène du soi est appelé l'ignorance ou la ségrégation antigénique. Dans cette situation, le lymphocyte T auto-réactif présent en périphérie ne va pas rencontrer son antigène soit car celui-ci est séquestré dans un compartiment non-accessible aux cellules T matures (Niederkorn, 2006) soit parce que cet antigène est présent en quantité trop faible pour initier une réponse lymphocytaire T (Kurts et al., 1998) (Figure 3a.)



Adapté de Walker J and Abbas A, The ennemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery, Nat. Rev. Immunol., 2002

Figure 3 : Les mécanismes de la tolérance périphérique

Les lymphocytes T matures spécifiques d'un antigène du soi, ayant migrés en dehors du thymus sont soumis à différents mécanismes de tolérance périphérique. a. L'ignorance : les cellules T ne rencontrent pas l'antigène en périphérie et n'engendrent pas de réponse envers le soi. b. L'anergie : Les clones T fixent l'antigène du soi présenté par une cellule dendritique. L'anergie est mise en place par la signalisation intracellulaire issue de la fixation de CTLA-4 à la molécule CD80/86 et la fixation de PD1 et son ligand. c. La déviation phénotypique : après fixation de l'auto-antigène, l'activation T engendre une réponse non pathogénique. d. L'apoptose : la stimulation chronique du lymphocyte T par l'antigène du soi induit l'expression de Fas Ligand qui se lie à la molécule Fas, ce qui provoque la mort du lymphocyte. e. La régulation / la suppression : une cellule régulatrice lymphocytaire ou d'origine myéloïde inhibe l'activation de la cellule T auto-réactive lorsque celle-ci rencontre l'antigène en périphérie.

TCR : récepteur des cellule T ; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité ; CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 ; PD1 : programmed cell death 1 ; PDL1 : PD1 ligand ; CD80/86 : molécule de co-stimulation.

Lorsque le lymphocyte T auto-réactif, n'ayant pas été soumis à la sélection négative, rencontre son antigène en périphérie, il peut aussi être sujet à trois autres mécanismes de tolérance périphérique : (i) l'anergie, (ii) la déviation phénotypique et (iii) la délétion par apoptose (Walker and Abbas, 2002) (Figure 3).

L'anergie a été initialement décrite *in vitro* comme mise en place lors d'une activation TCR du lymphocyte T auto-réactif en l'absence d'un signal de co-stimulation (CD28 – CD80/86) (Jenkins and Schwartz, 1987). Elle correspond à l'inactivation fonctionnelle du lymphocyte T lorsqu'il rencontre l'antigène du soi. Il est aujourd'hui admis que *in vivo* la molécule CTLA-4, portée par le lymphocyte T, entre en compétition avec la molécule CD28 pour lier CD80/86 présent sur la cellule présentatrice d'antigène et inhibe l'activation lymphocytaire T (Fife and Bluestone, 2008; Perez et al., 1997). La molécule PD1, exprimée à la surface des lymphocytes T anergiques, se liant à ses ligand PD L1 et L2, a aussi été décrite comme impliquée dans le phénomène d'anergie, inhibant la sécrétion cytokinique (Fife and Bluestone, 2008) (Figure 3b.).

La tolérance périphérique peut aussi faire intervenir le mécanisme de déviation phénotypique de la cellule T auto-réactive. Cela correspond à une activation physiologique de la cellule T associée à une sécrétion cytokinique et à l'expression de récepteurs de chimiokines qui n'auront pas pour finalité le développement de syndromes auto-immuns, dirigés contre le soi. (Figure 3c.)

Dans le cadre de l'ignorance, l'anergie ou la déviation phénotypique, la cellule T spécifique d'un antigène du soi va survivre en périphérie sans engendrer de réponse pathogénique. En revanche, l'inhibition de la réponse immune peut passer par la délétion par apoptose des clones T auto-réactifs. (Figure 3d.). Ce mécanisme, connu sous le nom de AICD (mort cellulaire induite par l'activation) est mis en place en réponse aux activations lymphocytaires T chroniques dues à la présence importante de l'antigène du soi en périphérie. Il fait intervenir le couple de molécule Fas, récepteur de mort, et son ligand FasL. L'activation répétée de la cellule auto-réactive en présence d'interleukine 2 (IL-2) va induire l'expression de FasL (Lenardo, 1991; Van Parijs et al., 1997). L'interaction de FasL et de Fas, exprimé à la surface des cellules T matures, va activer une voie de signalisation intracellulaire conduisant à l'apoptose

du clone T auto-réactif. Il a en effet été observé chez l'Homme qu'un défaut dans la signalisation intracellulaire de la molécule Fas est associée au développement d'un syndrome auto-immun lymphoprolifératif (Fisher et al., 1995).

2. Les mécanismes extrinsèques

En regard des mécanismes intrinsèques, modifiants le comportement de la cellule T auto-réactive lorsqu'elle rencontre son antigène en périphérie, plusieurs études ont démontré l'importance d'autres cellules, dites régulatrices, dans l'inhibition de la réponse immune dirigée contre le soi (Figure 3e.). De nombreuses populations aux capacités suppressives, régulatrices directes ou indirectes ont aujourd'hui été identifiées.

i. Les cellules régulatrices du compartiment lymphocytaire T

Les lymphocytes T régulateurs $CD4^+$ $FoxP3^+$

Dans le cadre de la tolérance au soi, une sous-population lymphocytaire T particulière semble être nécessaire pour contrôler l'émergence de pathologies auto-immunes. En effet, chez la souris, une thymectomie peu de temps après la naissance se traduit par le développement de syndromes auto-immuns multiples (Nishizuka and Sakakura, 1969). Il apparaît que cette situation pathologique est due à un défaut de cellules lymphocytaires T régulatrices dites naturelles, issues du thymus. L'absence de cellules T régulatrices circulantes peut donc être à l'origine d'un défaut dans le contrôle des réactions immunes engagées envers les antigènes du soi. Étant donné le rôle central de ces cellules dans les mécanismes de rejet ou de tolérance à l'allogreffe après transplantation, un chapitre leur est consacré ultérieurement.

Les lymphocytes CD8 Tregs

Le concept de lymphocytes T CD8 possédant des capacités suppressives a été proposé à la fin des années 1970 par Gershon et al. dans une étude visant à analyser l'interaction des cellules thymiques dans l'induction d'une tolérance antigène spécifique. Bien que les cellules CD8 Tregs aient été peu étudiées par la suite, il apparaît aujourd'hui qu'il existe plusieurs sous-types de cellules Tregs CD8 impliqués

dans la régulation des pathologies auto-immunes à la fois chez l'Homme et chez la souris (Tableau I).

Tableau I : Les différentes sous-populations lymphocytaires T CD8 régulatrices

		Phénotype	Mécanismes d'action	Reference
Homme	Nat.	CD8+ CD25+ FoxP3+ CTLA-4+ GITR+	Contact cellulaire (CTLA-4, TGF-ß)	(Cosmi et al., 2003; Maggi et al., 2005)
		CD8+ HLA-G+	Facteur soluble (HLA-G)	(Feger et al., 2007).
	Induits	CD8+ CD28- FoxP3+	Contact cellulaire (ILT3, ILT4)	(Vlad et al., 2008)
		CD8+ CD28- CD45RA+ CCR7- FoxP3+	Facteur soluble (IL10, IL6, IFNg)	(Filaci et al., 2001)
		CD8+ CD103+	Contact cellulaire	(Uss et al., 2006)
		CD8+ IL-10+	Facteur soluble (IL10)	(Gilliet and Liu, 2002)
		CD8+ CD25+ CD28+ FoxP3+	Contact cellulaire	(Mahic et al., 2008)
		CD8+ CD25+ CTLA-4+ FoxP3+	Contact cellulaire	(Miller et al., 1992)
		CD8+ CD25+ CTLA-4+ FoxP3+ CD28-	Contact cellulaire (CTLA-4)	(Jarvis et al., 2005)
		CD8+ CD45Ro+ CCR7+ IL-10+	Facteur soluble (IL10)	(Wei et al., 2005)
		CD8+ CD103+ FoxP3+ CTLA-4+ GITR+	Contact cellulaire	(Billerbeck et al., 2007).
		CD8+ CD25+ FoxP3+ LAG3+	Facteur soluble (CCL4)	(Joosten et al., 2007)
		CD8+ CD28- CD56+	Contact cellulaire	(Klimiuk et al., 1999)
		CD8+ IL-16+	Facteur soluble (IL16, TGF-ß, IL10)	(Möttönen et al., 2005).
		CD8+ LAG3+ CTLA-4+	Contact cellulaire	(Boor et al., 2011)
Souris	Nat.	CD8+ CD122+	Facteur soluble (IL10)	(Endharti et al., 2005)
		CD8+ CD25+	Contact cellulaire	(Bienvenu et al., 2005)
		CD8+ spécifique de Qa-1	Cytotoxicité	(Jiang and Chess, 2008)
	Induits	CD8+ CD11c+	Facteur soluble (IFN g)	(Davila et al., 2005)
		CD8+ CD28-	Facteur soluble (IL10, TGF-ß)	(Ménager-Marcq et al., 2006)
		CD8+ CD28- FoxP3+	Indéterminé	(Ben-David et al., 2007)
		CD8+ FoxP3+ PD1+ TGF-ß+	Facteur soluble (TGF-ß)	(Hahn et al., 2005)
		CD8+ CD45RO+ CD101+ CD103+	Contact cellulaire	(Allez et al., 2002)
		CD8+ CD44- CD103+	Facteur soluble (TGF-ß)	(Ho et al., 2008)
		CD8+ CD62L+ GITR+ TGF-ß+	Facteur soluble (TGF-ß)	(Kang et al., 2005)
		CD8+ PD1+	Facteur soluble (IL-4)	(Izawa et al., 2007)
		CD8+ CD28-	Contact cellulaire	(Najafian et al., 2003)
		CD8+ CD45RClow FoxP3+	Facteur soluble (IL10)	(Xystrakis et al., 2004)
		CD8+ CD122+ PD1+	Facteur soluble (IL10)	(Dai et al., 2010)

Nat. : Naturels

Adapté de Ligocki, A. J. & Niederkorn, J. Y. Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. Transplantation 99, 1553–9 (2015). et Filaci, G., Fenoglio, D. & Indiveri, F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. Autoimmunity 44, 51–7 (2011).

On distingue les cellules CD8 régulatrices naturelles, c'est à dire des cellules qui présentent des capacités suppressives dès la sortie du thymus, et les cellules CD8 régulatrices induites qui acquièrent leurs capacités suppressives en périphérie suite à une stimulation antigénique.

Les Tregs CD8 naturels incluent une population présentant un phénotype et des fonctions similaires aux lymphocytes Tregs CD4. Elles expriment le récepteur à l'interleukine 2 (CD25), les marqueurs de surface CTLA-4 et GITR et le facteur de transcription FoxP3 (Cosmi et al., 2003). Leur fonction sur l'inhibition de la réponse T CD4 effectrice est contact-dépendante et fait intervenir les molécules TGF-ß et CTLA-4 diminuant l'expression du récepteur à l'IL-2 à la surface des T effecteurs (Cosmi et al., 2003). Chez la souris, une autre sous-population de CD8 Tregs naturels a été caractérisée selon l'expression de la molécule CD122. Elle est capable, après transfert adoptif, de diminuer la sévérité d'une encéphalomyélite auto-immune expérimentale, via la sécrétion d'IL-10, cytokine immunosuppressive (Rifa'i et al., 2004; Suzuki et al., 1995). Enfin, chez l'Homme, une population de CD8 Tregs exprimant la molécule CXCR3, est capable comme les Tregs CD8 CD122+ murins d'inhiber les réponses T CD4 effectrices via la sécrétion d'IL-10 (Shi et al., 2009).

En regard de ces populations Tregs CD8 naturelles, pouvant être impliquées dans les mécanismes de tolérance périphérique via l'inhibition de l'activation des lymphocytes T CD4, la majeure partie des cellules Tregs CD8 identifiées sont induites en périphérie ou *in vitro* (Tableau I). Chez l'Homme, certaines d'entre elles ont été montrées comme fonctionnellement déficientes ou absentes chez des patients atteints de pathologies auto-immunes (Filaci et al., 2001; Tulunay et al., 2008), renforçant l'hypothèse de leur rôle dans l'inhibition des réponses T dirigées contre le soi.

Les lymphocytes Tr1

Les lymphocytes T régulateurs Tr1 représentent une population de lymphocytes T CD4 qui n'expriment pas la molécule FoxP3 et dont l'activité suppressive est médiée par la sécrétion d'IL-10. Leur première description a été réalisée en 1994 chez des patients atteints d'immunodéficience combinée sévère (SCID) ayant développés une tolérance envers une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ces cellules

dont le TCR était dirigé contre les molécules du CMH du receveur exprimaient après stimulation antigène-spécifique *in vitro* de grandes quantités d'IL-10 (Bacchetta et al., 1994).

Plusieurs études ont identifié ces cellules T productrices d'IL-10 comme impliquées dans la régulation des réponses dirigées contre les antigènes du soi et les pathologies auto-immunes. Kitani et al. ont décrit en 2000 la présence de cellules Tr1 auto-réactives, dont le TCR était spécifique des molécules de CMH de l'hôte. Ces cellules sont capable *ex-vivo* d'inhiber la prolifération des clones T CD4 après activation via la sécrétion d'IL-10 et de TGF-ß (Kitani et al., 2000). Une fréquence moins importante des cellules Tr1 a aussi été retrouvée chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde à la fois sur le site inflammatoire et en périphérie (Yudoh et al., 2000). Plus récemment un défaut de génération de cellules TR1 a été décrit chez des patients atteints de sclérose en plaques comparés à des volontaires sains (Astier et al., 2006).

Les lymphocytes Th3

Les lymphocytes Th3 constituent une sous-population lymphocytaire T CD4 régulatrice peu décrite comparée aux populations présentées précédemment. Identifiés en 1996 dans un modèle d'induction de tolérance orale aux antigènes de la myéline dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) (Fukaura et al., 1996), les lymphocytes Th3 exercent leur activité suppressive via la sécrétion de TGF-ß (Chen et al., 1994). *In vitro*, ces lymphocytes Th3 sont induits en réponse au TGF-ß, à l'IL-4 et à l'IL-10 (Weiner, 2001). Il a aussi été décrit qu'ils étaient capables d'induire l'expression de FoxP3 dans des cellules $CD4^+$ $CD25^+$ mais aussi dans des cellules $CD4^+$ $CD25^-$ de façon TGF-ß dépendante (Carrier et al., 2007) et d'inhiber les réponses lymphocytaires Th1 et Th2 (Weiner, 2001).

ii. Les autres cellules régulatrices

D'autres cellules que les lymphocytes T ont été décrites pour leur activité suppressive et sont par conséquent impliquées dans les mécanismes extrinsèques de tolérance périphérique.

Les lymphocytes B régulateurs

Au sein du compartiment lymphocytaire, des lymphocytes B ont aussi été décrit comme impliqués dans l'inhibition de l'activation lymphocytaire T à la fois dans des modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires mais aussi *in vitro* chez l'Homme. Le concept de lymphocytes B régulateurs a initialement été proposé en 1974 dans un modèle d'hypersensibilité chez le cochon d'Inde. Dans ce modèle, l'inflammation accrue après lymphodéplétion était contrôlée par transfert adoptif de splénocytes. Cet effet était perdu lorsque les splénocytes étaient déplétés en lymphocytes B suggérant une activité régulatrice des cellules lymphocytaires B (Katz et al., 1974). Depuis, plusieurs équipes se sont intéressées à ces cellules B régulatrices et ont identifié l'IL-10 comme médiateur central de leurs propriétés suppressives. Ces cellules dites B10 ont été décrites pour leur rôle dans différents modèles de pathologie auto-immunes : EAE (Carter et al., 2011; Fillatreau et al., 2002), colite ulcérative (Mizoguchi et al., 2002; Sattler et al., 2014), arthrite (Evans et al., 2007; Yang et al., 2012), lupus (Watanabe et al., 2010) ; dans des modèles de pathologies allergiques (Amu et al., 2010; Braza et al., 2015a), mais aussi dans l'induction de tolérance après transplantation (Chesneau et al., 2013; Ding et al., 2011).

Chez l'Homme, différentes populations de cellules B régulatrices ont été mises en évidence (Tableau II). L'importance de ces cellules lymphocytaires B régulatrices dans l'inhibition des réponses lymphocytaires T est fortement suggérée par l'association entre un défaut dans leur nombre ou leur fonction et le développement de pathologies inflammatoires (Blair et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013; Kamekura et al., 2015; Khoder et al., 2014; Oka et al., 2014; van der Vlugt et al., 2014; Zhu et al., 2015).

Les cellules dendritiques immatures

Bien que la fonction traditionnellement associée aux cellules dendritiques soit l'activation lymphocytaire T via la présentation antigénique par les molécules de CMH, de nombreuses études ont montré que ces cellules dendritiques jouent aussi un rôle important dans le maintien de la tolérance périphérique. En effet, une sous-population de cellules dendritiques immatures possède des propriétés tolérogéniques (Figure 4).

Tableau II : Les différentes sous-populations lymphocytaires B régulatrices humaines

	Sous-type	Phénotype	Mécanismes d'action	Reference
Naturels	Cellules B immatures	$CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$	Contact cellulaire (PD1, PD-L1, CD80, CD86, CD1d) Facteur soluble (IL-10)	(Blair et al., 2010; Bosma et al., 2012; Menon et al., 2016; Siewe et al., 2013).
	Cellules B10	$CD24^{hi}$ $CD27^{+}$	Facteur soluble (IL-10)	(Iwata et al., 2011)
	Cellules B GZMB+	$CD38^{+}$ $CD1d^{+}$ IgM^{+} $CD147^{+}$	Facteur soluble (GZMB, IL-10, IDO)	(Chesneau et al., 2015a; Lindner et al., 2013)
	Cellules Br1	$CD25^{hi}$ $CD71^{hi}$ $CD73^{low}$	Facteur soluble (IL10), IgG4	(van de Veen et al., 2013)
	Plasmablastes	$CD27^{int}$ $CD38^{hi}$	Facteur soluble (IL-10)	(Matsumoto et al., 2014)
	-	$CD39^{+}$ $CD73^{+}$	Facteur soluble (Adénosine)	(Saze et al., 2013)
Induits	iBregs	-	Facteur soluble (TGF-ß, IDO)	(Nouël et al., 2015)
	-	$CD19^{+}$ $TIM1^{+}$	Facteur soluble (IL-10)	(Liu et al., 2016)

GZMB : granzyme B / IDO : Indoléamine / TIM1 : T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 PD1 :Program cell death 1. Adapté de Mauri, C. & Menon, M. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. J. Clin. Invest. 127, 772–779 (2017).

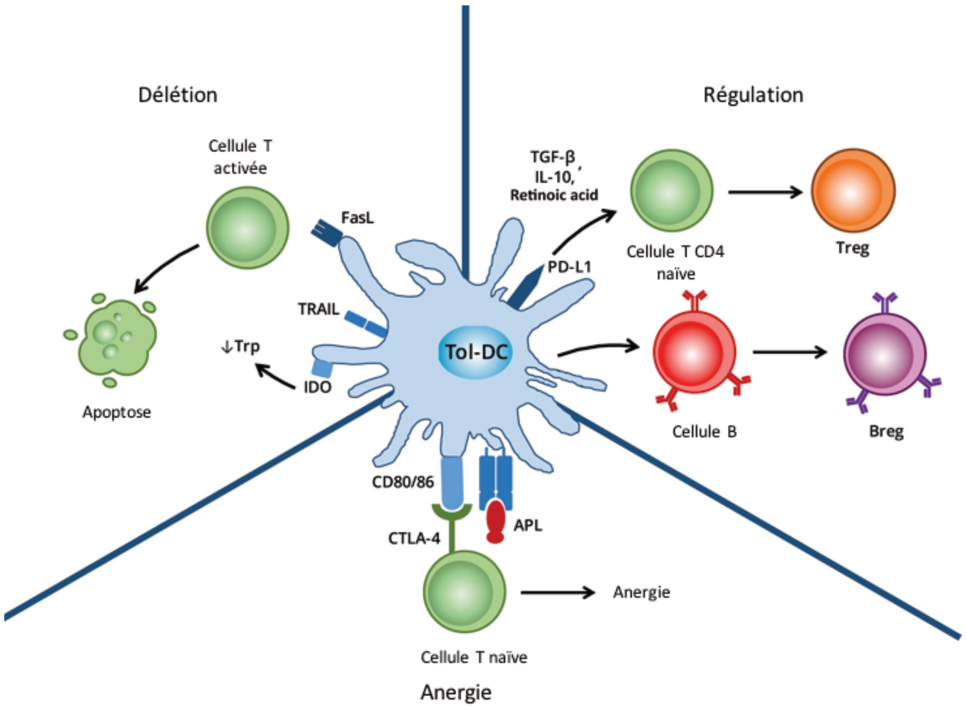


Figure 4 : Mécanismes d'action des cellules dendritiques tolérogènes

Adapté de Horton, C., Shanmugarajah, K. & Fairchild, P. J. Harnessing the properties of dendritic cells in the pursuit of immunological tolerance. Biomed J 40, 80–93 (2017).

En périphérie, l'inhibition de l'activation lymphocytaire T par les cellules dendritiques tolérogènes (Tol-DC) peut être assurée par différents mécanismes : l'induction d'anergie des cellules T naïves lors de leur activation, la délétion des cellules T activées ou encore l'induction de cellules T régulatrices capable d'inhiber les réponses T effectrices.

Ces cellules expriment peu de molécules de CMH et de molécules de co-stimulation et exprime la molécule CTLA-4 à leur surface pouvant ainsi induire l'anergie des lymphocytes T effecteurs lors de la présentation antigénique (Steinbrink et al., 2002; Walunas et al., 1996). Ces cellules dendritiques tolérogéniques sont capable d'inhiber les réponses T effectrices et de promouvoir les populations T régulatrices en périphérie par l'intermédiaire de différents mécanismes : la sécrétion cytokinique d'IL-10 (Akbari et al., 2001; Gregori et al., 2010) ou de TGF-ß ; l'expression d'IDO et de Fas Ligand (Fallarino et al., 2002; Munn et al., 2002; Süss and Shortman, 1996) et la perturbation de l'environnement métabolique par consommation de l'ATP extracellulaire (Mascanfroni et al., 2013).

Les macrophages

Les macrophages, comme les cellules dendritiques, sont issus de la maturation de progéniteurs myéloïdes. Ils circulent sous formes de monocytes mais migrent dans l'ensemble des tissus à l'état basal ou en réponse à une inflammation (Gordon and Taylor, 2005; Nahrendorf et al., 2007).

Les macrophages ont initialement été décrits pour leur rôle dans l'élimination des cellules mortes, la défense de l'organisme contre les pathogènes (Dale et al., 2008; Gordon and Taylor, 2005; Mackaness, 1977) et la cicatrisation des plaies en participant au remodelage tissulaire (Kreider et al., 2007). Depuis plusieurs années, leur fonction dans la régulation des réponses immunes en périphérie a été clairement établie. Ces macrophages, appelées macrophages régulateurs, ont été pour la première fois identifiés après stimulation *in vitro* à l'aide d'agonistes des TLR combinés à des complexes immuns IgG (Gerber and Mosser, 2001). D'autres facteurs permettent l'induction de ces macrophages régulateurs *in vitro* : les prostaglandines (Strassmann et al., 1994), les corps apoptotiques (Erwig and Henson, 2007), l'IL-10 (Martinez et al., 2008) et des ligands des récepteurs couplés aux protéines G (GPcRs) (Haskó et al., 2007). Ces macrophages régulateurs sont caractérisés par une importante sécrétion d'IL-10 (Gerber and Mosser, 2001) et de TGF-ß (Fadok et al., 1998) favorisant les réponses lymphocytaires T régulatrices aux seins des tissus.

II. LES LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS

Comme présenté précédemment, les lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs (Tregs) tiennent une place importante dans les mécanismes de tolérance périphérique nécessaires à la reconnaissance du soi et du non-soi. De plus, ces Tregs possèdent un rôle vital dans le contrôle des réactions inflammatoires à l'état physiologique ainsi que dans de nombreuses situations pathologiques : les pathologies auto-immunes, l'allergie, les infections aigues ou chroniques, le cancer ou encore le rejet et la tolérance après transplantation.

Ce sont ces Tregs auxquels je me suis particulièrement intéressé au cours de ma thèse dans les contextes de tolérance opérationnelle après transplantation rénale, et de dysfonction chronique du greffon après transplantation pulmonaire. Ainsi, je développerais dans ce chapitre la biologie des lymphocytes T régulateurs : leur découverte et les avancés majeures ayant permis leur meilleure caractérisation, leur développement, leurs mécanismes d'action ainsi que leurs fonctions physiopathologiques.

A. La découverte des cellules T régulatrices

Les premiers travaux suggérant l'existence de cellules T aux propriétés suppressives portaient sur les mécanismes de tolérance au soi. En effet, l'étude publiée par Nishizuka et Sakakura en 1969 a mis en évidence le développement d'anomalies ovariennes, ayant été ultérieurement identifiées comme étant d'origine auto-immune, chez des souriceaux ayant subi une thymectomie 3 jours après leur naissance. Dans ce même modèle, la transplantation d'un thymus ectopique 7 jours après la naissance permettait de prévenir le développement de l'atrophie ovarienne (Nishizuka and Sakakura, 1969). Dans une seconde étude, publiée en 1971, Gershon et Kondo s'intéressent au rôle des lymphocytes thymiques dans un protocole d'induction de tolérance chez la souris. Ils montrent que l'injection de splénocytes issues de souris tolérisées à des souriceaux thymectomisés permet d'induire une tolérance chez les individus receveurs (Gershon and Kondo, 1971). Enfin, dans le même modèle utilisé par Nishizuka et Sakakura en 1969, Sakagushi, Takahashi et Nishizuka ont mis en évidence l'importance des lymphocytes T issus de souris adultes

dans le contrôle du développement de l'auto-immunité chez les souriceaux thymectomisés (Sakaguchi et al., 1982).

L'ensemble de ces travaux suggéraient donc l'importance des lymphocytes T d'origine thymique présents en périphérie dans la régulation des réponses immunitaires d'origine auto-immune : les lymphocytes T nommés T suppresseurs. Ces travaux suggéraient aussi l'existence en périphérie de deux populations lymphocytaires T : les lymphocytes T suppresseurs et les lymphocytes T effecteurs, possédant des fonctions inverses sur le développement de syndromes auto-immuns. Cependant, le phénotype de ces cellules ainsi que leurs mécanismes d'action n'étaient pas encore identifiés.

B. Les avancés dans la caractérisation phénotypique des Tregs

Suite à la première identification des lymphocytes T aux capacités suppressives, plusieurs décennies ont été nécessaires à la mise en évidence de marqueurs robustes permettant de les étudier plus précisément.

1. Les premiers marqueurs : CD5 et CD45RB

L'un des premiers marqueurs étudiés afin de différencier les cellules T suppressives, régulatrices des autres sous-populations lymphocytaires T conventionnelles fut la molécule CD5. Dans le modèle murin de thymectomie néonatale précédemment décrit, les auteurs avaient identifié les cellules lymphocytaires T $CD4^{+}CD5^{high}$ (à l'époque nommé Lyt-1^{high}) comme la population à l'origine de la protection contre le développement de l'ovarite auto-immune (Sakaguchi et al., 1982). Cette observation fut confirmée en 1985 dans un second modèle murin de pathologie auto-immune multi-organes après thymectomie néonatale. Chez ces souris, le transfert de lymphocytes T $CD4^{+}CD5^{-}$ (déplétion des cellules T $CD4^{+}CD5^{high}$) ne permettait pas de contrôler le développement de la pathologie. À l'inverse, le transfert de lymphocytes T $CD4^{+}CD5^{high}$ prévenait le développement de la pathologie auto-immune multi-organes (Sakaguchi et al., 1985). Nous savons aujourd'hui que l'expression de la molécule CD5 est retrouvée sur plus de 60% des lymphocytes T CD4 et augmentée après activation et par conséquent non-restreinte aux lymphocytes

T régulateurs (Figure 5). Bien que ce marqueur ne soit plus couramment utilisé comme marqueur phénotypique des lymphocytes T régulateurs, plusieurs études ont identifié la molécule CD5 comme liée fonctionnellement à la stabilité des lymphocytes T régulateurs induits dans un environnement pro-inflammatoire (Palin and Love, 2015).

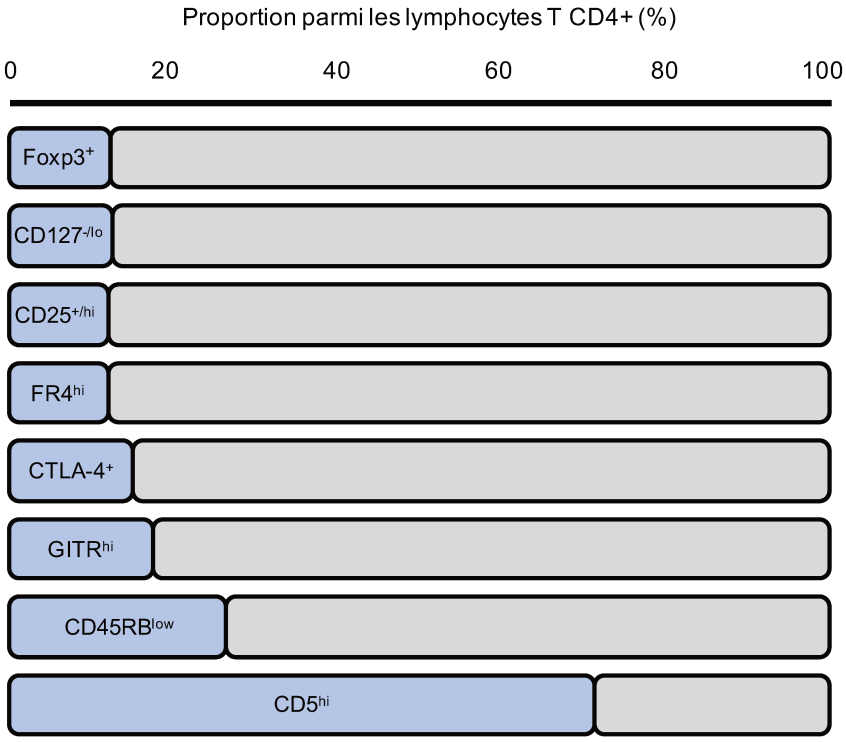


Figure 5 : La proportion des différentes sous-populations identifiées comme enrichies en lymphocytes T régulateurs

Adapté de Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu. Rev. Immunol. 22, 531–62 (2004).

En 1990, l'étude de Powrie et Mason, identifiait la molécule CD45RB comme potentiel marqueur de surface pour les lymphocytes T régulateurs (Powrie and Mason, 1990). Dans cette étude, les auteurs utilisaient un modèle de pathologie auto-immune multi-organes (wasting disease) chez le rat. Dans ce modèle, le transfert de cellules $CD4^+CD45RB^{low}$ chez les rats athymiques permettait le contrôle du développement de la pathologie auto-immune, contrairement au transfert de cellules $CD4^+CD45RB^{high}$. Powrie et Mason ont aussi mis en évidence que le transfert d'une population mixte de cellules T $CD4^+CD45RB^{high}$ et $CD4^+CD45RB^{low}$ au ratio deux tiers / un tiers n'était pas pathogénique (Powrie and Mason, 1990). Cette première identification des cellules $CD4^+CD45RB^{low}$ comme potentielle sous-population enrichie en cellules T régulatrices

fut validée par deux études indépendantes en 1993. En effet, Powrie et al. ainsi que Morrissey et al., ont mis en évidence que l'injection de cellules T $CD4^+CD45RB^{high}$ à des souris BALB/c immunodéficientes en lymphocytes B et T (souris SCID) induisait le développement d'une pathologie inflammatoire auto-immune de la muqueuse intestinale (IBD : Inflammatory Bowel Disease). A l'inverse, l'injection de cellules $CD4^+CD45RB^{low}$ ou la co-injection de cellules $CD45RB^{low}$ et $CD45RB^{high}$ n'était pas pathogénique (Morrissey et al., 1993; Powrie et al., 1993). Comme pour la molécule CD5, nous savons aujourd'hui que plus de 20% des cellules lymphocytaires T CD4 sont $CD45RB^{low}$ et que ce marqueur n'est donc pas restreint aux lymphocytes T régulateurs (Figure 5).

2. La molécule CD25 : un marqueur plus restreint mais non exclusif

Comme illustré sur la Figure 5 et rapporté par Shimon Sakaguchi en 2004 (Sakaguchi, 2004), bien que ces marqueurs aient permis des avancées conséquentes dans la caractérisation des cellules lymphocytaires T régulatrices capables de prévenir le développement de pathologies auto-immunes, leur expression par une importante proportion de cellules T $CD4^+$ (plus de 20%) a poussé d'autres chercheurs a essayer de définir plus précisément le phénotype de ces cellules T régulatrices.

Ainsi, en 1995, Sakaguchi et al. ont mis en évidence que l'expression de la molécule CD25, la sous-unité alpha du récepteur membranaire à l'IL-2, était partagée par les population $CD5^{hi}$ et $CD45RB^{low}$ et permettait de discriminer plus précisément les lymphocytes T aux capacités suppressives des autres sous-populations lymphocytaires T (Sakaguchi et al., 1995). Dans cette étude, les auteurs ont tout d'abord montré que l'injection de cellules des ganglions lymphatiques et de la rate de souris immunocompétentes, déplétées en cellules $CD25^+$, chez des souris athymiques était à l'origine du développement spontané de syndromes auto-immuns multiples (thyroïdite, gastrite, diabète auto-immun, sialadénite, surrénalite, ovarite, glomérulonéphrite, polyarthrite et wasting disease). Chez les souris ayant reçu une injection de cellules déplétées en lymphocytes T $CD25^+$, le développement des différentes pathologies auto-immunes était accompagné d'une présence accrue d'autoanticorps sériques (Sakaguchi et al., 1995). Dans cette même étude, la

reconstitution du compartiment lymphocytaire T $CD25^+$ peu de temps après l'injection des cellules $CD25^-$ permettait de prévenir l'apparition des lésions auto-immunes de façon dose-dépendante. Ainsi, ces résultats démontraient l'importance des cellules T $CD25^+$ dans le maintien des mécanismes de tolérance au soi.

Enfin, les auteurs se sont aussi intéressés au rôle de ces cellules T $CD25^+$ dans la tolérance au non-soi à partir d'un modèle de transplantation allogénique de peau suivi d'une immunisation avec des protéines xenogéniques. L'injection de cellules $CD25^-$ ne permettait pas de prévenir les réponses immunes dirigées contre le greffon et les protéines xenogéniques. Mais de façon intéressante, la reconstitution du compartiment T $CD25^+$ induisait une diminution des réponses immunes allo et xenospécifiques (Sakaguchi et al., 1995). Plus tard, de nombreuses équipes de recherche ont confirmé l'intérêt de la molécule CD25 comme marqueur membranaire des cellules T régulatrices (Baecher-Allan et al., 2001; Jonuleit et al., 2001; Levings et al., 2001; Taams et al., 2001).

Bien que les cellules $CD25^+$ ne représentent que 15% des cellules T $CD4^+$ circulantes chez l'Homme (Figure 5) et que le CD25 semble être un marqueur partagé par la cellules T régulatrices murines et humaines, son expression n'est pas spécifique aux lymphocytes T régulateurs. En effet, après activation, l'expression de CD25 est trouvée augmentée sur les lymphocytes T effecteurs sans que ceux-ci n'acquièrent de capacités immuno-régulatrices.

3. FoxP3 : facteur de transcription clé du développement et de la fonction des Tregs

L'avancée la plus significative de ces dernières années dans la caractérisation phénotypique des lymphocytes T régulateurs fut la découverte du rôle clé du facteur de transcription FoxP3 dans le développement et la fonction des Tregs.

C'est en 1982 que Powell et al. ont décrit pour la première fois chez l'Homme un syndrome auto-immun multi-organes lymphoprolifératif : l'IPEX (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X linked syndrome) (Powell et al., 1982). Caractérisé par différents symptômes d'ordre auto-immuns, ce syndrome a été

identifié comme causé par des mutations dans le gène codant pour le facteur de transcription FoxP3 sur le chromosome X au début des années 2000 (Bennett et al., 2001; Wildin et al., 2002). Cette mutation avait été auparavant décrite chez la souris comme étant à l'origine du profil « Scurfy », équivalent murin de l'IPEX chez l'Homme (Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001). Aussi bien chez l'Homme que chez la souris les symptômes ne sont retrouvés que chez les individus males homozygotes portant la mutation, et non chez les femelles.

Le développement de syndromes auto-immuns multiples chez les patients atteints d'IPEX et les souris présentant un profil scurfy suggérait l'importance de ce facteur de transcription dans la fonction des cellules capables de réguler les réponses immunitaires dirigées contre le soi : les lymphocytes T régulateurs. Ainsi, différentes études ont rapporté chez la souris une expression de FoxP3 stable et importante dans les cellules T $CD4^+CD25^+$ exclusivement (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003) ainsi que l'absence de cellules $CD4^+CD25^+$ chez les souris scurfy. Il a aussi été montré que l'expression forcée de FoxP3 dans des cellules T CD4 naïves leur confèrent des propriétés régulatrices *in vitro* mais aussi *in vivo* (Hori et al., 2003). De plus, chez des souris chez lesquelles le gène codant pour le récepteur de la toxine diphtérique est sous contrôle du promoteur du gène FoxP3, la déplétion des cellules $FoxP3^+$ par injection de toxine diphtérique aboutit au développement d'un syndrome auto-immun létal (Lahl et al., 2007). Chez la souris, l'expression du facteur de transcription FoxP3 est donc nécessaire au développement et à la fonction des cellules T régulatrices.

Chez les patients atteints d'IPEX, il a été montré que le nombre de cellules T $CD4^+CD25^{hi}$ présentes en périphérie est équivalent à celui retrouvé chez des individus sains. Néanmoins, *in vitro* ces cellules présentent une altération importante de leur capacité régulatrice sur la prolifération de lymphocytes T effecteurs autologues (Bacchetta et al., 2007; Le Bras and Geha, 2006). Il semble donc que l'expression du facteur de transcription FoxP3 soit particulièrement nécessaire aux fonctions immuno-régulatrices des lymphocytes Tregs humains. Différentes études ont aussi mis en évidence l'expression de FoxP3, de façon transitoire et en plus faible quantité, par les cellules T $CD4^+$ effectrices (Bacchetta et al., 2007; Gavin et al., 2006; Walker et al., 2003; Wang et al., 2007; Ziegler, 2007), suggérant qu'il n'est pas un marqueur exclusif

des lymphocytes Tregs. Néanmoins, des études plus récentes ont réaffirmé un lien étroit entre le taux d'expression de FoxP3 ainsi que le statut de déméthylation du promoteur du gène codant FoxP3 (TSDR), l'expression de molécules liées à la fonction des Tregs, la stabilité des Tregs ainsi qu'à leurs capacités suppressives *in vitro* (Miyara et al., 2009; Sakaguchi, 2005).

Ainsi, la découverte du rôle du facteur de transcription FoxP3 a permis une avancée majeure à la fois en tant que marqueur plus restreint des cellules Tregs mais aussi dans la compréhension de son rôle central dans l'acquisition des propriétés régulatrices des Tregs.

4. Le CD127 : la chaine alpha du récepteur à l'IL-7

Durant l'année 2006, deux groupes distincts ont identifié la molécule CD127 comme nouveau marqueur permettant de distinguer les lymphocytes T régulateurs des cellules T conventionnelles chez l'Homme. Liu et al. et Seddiki et al. ont en effet rapporté au sein des cellules $CD4^+CD25^+$ une expression de FoxP3 plus importante par les cellules $CD127^{low}$ comparées aux cellules $CD127^+$ (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). De plus les capacités régulatrices des lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ corrélaient négativement avec l'expression membranaire du marqueur CD127 (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006). Chez l'Homme, cette population lymphocytaire T $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ représente environ 6% des lymphocytes T CD4 circulants (Seddiki et al., 2006). De façon intéressante, tout comme pour les marqueurs CD25 et FoxP3, une faible expression de la molécule CD127 semble être aussi retrouvée sur les lymphocytes T $CD4^+$ régulateurs chez la souris (Cozzo et al., 2003). Par ailleurs, chez la souris, la surexpression de la molécule FoxP3 se traduit par l'augmentation d'une sous-population lymphocytaire T $CD127^{low}$ possédant des propriétés régulatrices, suggérant un lien direct entre l'expression du facteur de transcription FoxP3 et l'expression faible de la chaine alpha du récepteur à l'IL-7 (Liu et al., 2006). Néanmoins, l'expression de CD127 semble être aussi diminuée à la surface des lymphocytes T conventionnels après activation *in vitro* et en réponse à une activation chronique chez l'Homme (Alves et al., 2008; Del Pozo-Balado et al., 2010).

5. Les autres marqueurs des Tregs

De nombreuses autres équipes se sont intéressées à la caractérisation phénotypique plus fine des lymphocytes T régulateurs en prenant comme base l'expression des marqueurs déjà identifiés : CD25, FoxP3 et CD127 et en cherchant à identifier le marqueur des cellules « les plus suppressives ».

Ainsi, chez la souris, CTLA-4 (Waterhouse et al., 1995), mais aussi GITR (Shimizu et al., 2002) et la neuropiline-1 (Bruder et al., 2004) ont été proposé comme marqueurs associés à la fonction des lymphocytes T régulateurs.

Ce fut aussi le cas, chez l'Homme, pour CD27 (Ruprecht et al., 2005), FR4 (Yamaguchi et al., 2007), CD49d (Kleinewietfeld et al., 2009), CD44 (Liu et al., 2009), GARP (Probst-Kepper et al., 2009; Sun et al., 2016), TNFR2 (Chen et al., 2010) et CD147 (Solstad et al., 2011), tous associés à l'expression de la molécule FoxP3 à la surface des lymphocytes T aux capacités régulatrices.

Au-delà des marqueurs liés à la fonction des lymphocytes T régulateurs ou à l'expression du facteur de transcription FoxP3, différentes équipes se sont particulièrement intéressées au statut mémoire ou naïf des cellules $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^{+}$ chez l'Homme. En 2009, Miyara et al. ont rapporté qu'au seins des Tregs $FoxP3^{+}$ humaines, les cellules possédant un phénotype mémoire $CD45RA^{-}FoxP3^{hi}$ présentaient un statut de déméthylation du promoteur du gène codant FoxP3 et une fonction suppressive plus importante que les cellules Tregs possédant un phénotype naïf $CD45RA^{+}FoxP3^{low}$ (Miyara et al., 2009). Dans le même esprit, la molécule CD39, exprimée principalement par les cellules T mémoires, a été proposée comme marqueur des lymphocytes Tregs $FoxP3^{+}$ fonctionnels chez l'Homme (Borsellino et al., 2007; Ye et al., 2016).

Plus récemment, CD15s, un carbohydrate tetrasaccharidique retrouvé fixé sur les résidus glycosylés à la surface de nombreux types cellulaires a été décrit comme identifiant chez l'Homme les cellules T régulatrices $FoxP3^{hi}$ les plus suppressives (Miyara et al., 2015). Dans cette étude, il est aussi intéressant de noter que l'expression du marqueur CD39 est retrouvée augmentée à la surface des Tregs

CD15s^{+} et CD45RA^{-}FoxP3^{hi} comparée aux autres sous-populations dont les capacités suppressives sont moindres (Miyara et al., 2015). Peu d'études se sont ensuite interessées à l'expression du CD15s à la surface des Tregs. Très récemment, Miyara et al., ont de nouveau démontré l'expression de ce marqueur à la surface de Tregs humaines présentant d'importantes capacités supressives à la fois *in vitro* et *in vivo* (Miyara et al., 2017). En effet, l'utilisation de la combinaison IL-2, rapamycine, histone déacétylase et inhibiteur des DNA méthyltransférases permet l'expansion *in vitro* d'une population homogène de Tregs CD15s^{+} qui maintient dans le temps son expression importante du facteur de transcription FoxP3, ainsi sa capacité suppressive *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte après une xénogreffe (Miyara et al., 2017). Les Tregs CD15s^{+} constitueraient donc chez l'Homme un sous-type cellulaire d'intêret lors de thérapies cellulaires à visée thérapeutique dans l'autoimmunité, l'allergie ou encore la transplantation.

Malgré les avancées considérables dans la caractérisation phénotypique des lymphocytes T régulateurs, à la fois chez l'Homme et chez la souris, l'expression de la quasi-totalité des marqueurs identifiés est aussi retrouvée sur certaines sous-populations lymphocytaires T conventionnelles non-suppressives et peut être modulée par l'environnement inflammatoire ou l'activation *in vitro*. Ainsi, l'analyse chez l'Homme des cellules lymphocytaires T CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}CD127^{low} reste aujourd'hui la meilleure option pour étudier ces cellules Tregs en périphérie (Rodríguez-Perea et al., 2016).

C. Le développement des Tregs

Il est aujourd'hui admis que les lymphocytes T régulateurs circulants sont issus de deux processus de développement différents (Figure 6). On distingue en effet les lymphocytes Tregs présentant un profil régulateur dès la sortie du thymus, les tTregs (Tregs dérivés du thymus) ou nTregs (Tregs naturels) et les lymphocytes Tregs générés en périphérie à partir de lymphocytes T CD4^{+} conventionnels, les pTregs (Tregs induit en périphérie *in vivo*) (Abbas et al., 2013). De nombreuses équipes s'intéressent aussi à l'induction de cellules Tregs *in vitro*, dites iTregs, qui pourraient être utilisées à des fins de modulation des réponses immunes chez l'Homme (Abbas et al., 2013).

1. Le développement thymique des tTregs

Les premières expériences de thymectomie néonatale réalisées sur des souriceaux développant des pathologies auto-immunes suggéraient, depuis les années 1970, l'origine thymique des cellules T régulatrices en charge de la tolérance périphérique (Gershon and Kondo, 1971; Nishizuka and Sakakura, 1969; Sakaguchi et al., 1982). Il est en effet décrit que les thymocytes exprimant les molécules CD25 et FoxP3 sont détectables chez la souris à partir de 3 jours après leur naissance (Lahl et al., 2007; Sakaguchi et al., 2007) suggérant fortement l'implication d'un défaut en cellules Tregs dérivées du thymus dans le développement des syndrome auto-immuns chez les souriceaux thymectomisés. La question de l'acquisition d'un phénotype Treg, et de l'expression du facteur de transcription FoxP3 au cours du développement thymique a beaucoup été étudiée depuis le début des années 2000. L'une des premières interrogations concernant le développement des Tregs fut le stade de différenciation des thymocytes ainsi que le compartiment thymique au sein duquel les thymocytes s'engagent dans un phénotype T régulateur.

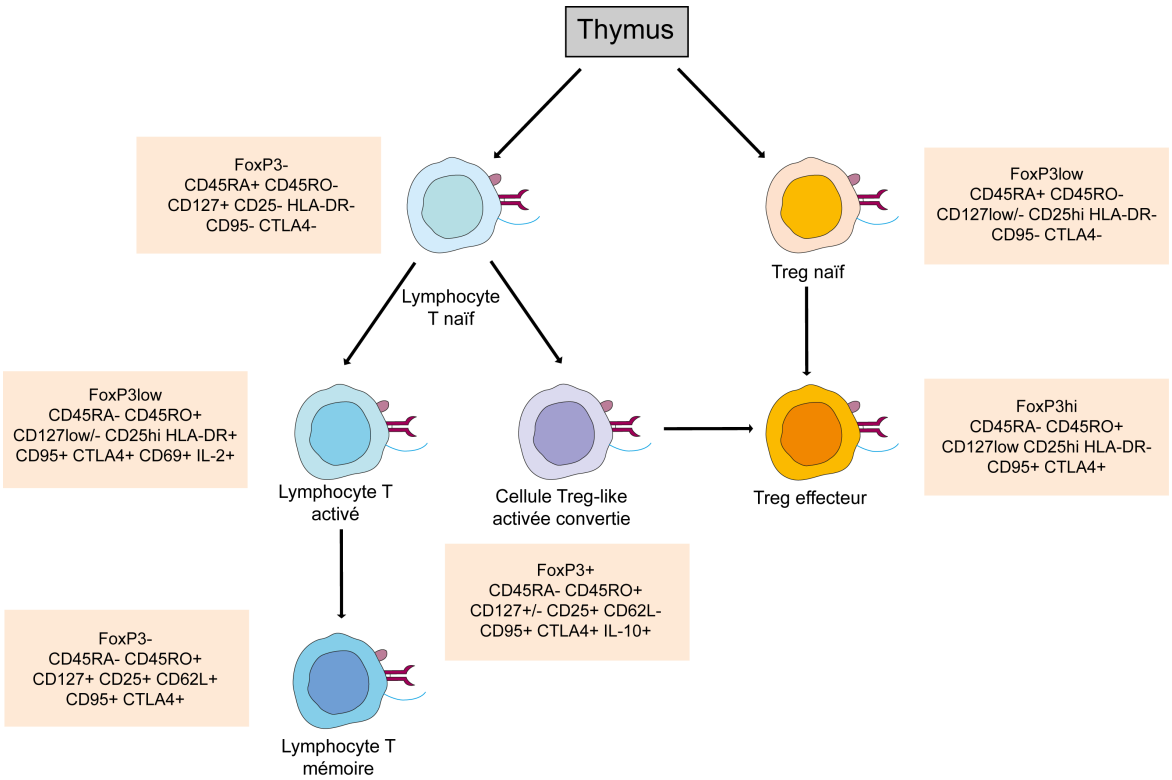


Figure 6 : Les deux voies de développement des Tregs

Adapté de Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat. Rev. Immunol. 10, 490–500 (2010).

Plusieurs travaux ont mis en évidence chez l'Homme l'expression de FoxP3 par des thymocytes avant l'acquisition d'un TCR alpha béta fonctionnel, dans le cortex thymique (Nunes-Cabaço et al., 2010; Tuovinen et al., 2008a). Cependant, la contribution de ces cellules à la formation de Tregs dérivés du thymus n'a pas été clairement établie (Caramalho et al., 2015a). La majorité des études ont montré l'expression de FoxP3 à la fois par des thymocytes DP dans le cortex thymique et par des thymocytes SP dans la médulla thymique exprimant donc un TCR fonctionnel, la molécule CD25 ainsi que plusieurs marqueurs liés à la fonction des Tregs (CTLA-4, CD39 et GITR) (Figure 7). De plus ces thymocytes possèdent des fonctions immunorégulatrices *in vitro* comparables à celles des Tregs retrouvés en périphérie (Annunziato et al., 2002; Cupedo et al., 2005; Darrasse-Jèze et al., 2005; Ito et al., 2008; Nunes-Cabaço et al., 2011; Stephens et al., 2001). De façon intéressante, la culture de thymocytes DP exprimant FoxP3 et, ou CD25 avec des cellules TEC ou des cellules dendritiques plasmacitoïdes matures permettrait leur maturation en SP tout en maintenant l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Martín-Gayo et al., 2010; Nunes-Cabaço et al., 2011) (Figure 7). Cela suggère donc l'implication directe des DP FoxP3$^+$ dans la formation du pool de SP FoxP3$^+$ lui-même à l'origine des cellules tTregs retrouvées en périphérie (Caramalho et al., 2015a).

Les mécanismes à l'origine de l'acquisition d'un phénotype régulateur par les thymocytes DP et SP ont fait l'objet de nombreuses études. Chez la souris, le rôle de la stimulation du TCR dans l'acquisition du phénotype régulateur par les thymocytes a été clairement établi. Bien que chez l'Homme des limitations techniques n'ont pas encore permis d'affirmer le rôle direct de la stimulation TCR dans le développement des thymocytes FoxP3$^+$, les résultats de plusieurs études le suggèrent largement.

En effet, les marqueurs CD27 et CD69, marqueurs de sélection positive exprimés après reconnaissance d'un complexe CMH/peptide du soi par le TCR des thymocytes, sont exprimés par les thymocytes à l'origine de la formation de tTregs (Cupedo et al., 2005; Darrasse-Jèze et al., 2005; Nunes-Cabaço et al., 2011; Tuovinen et al., 2008b). De plus les thymocytes DP et SP à l'origine des tTregs expriment la molécule CTLA-4 (Nunes-Cabaço et al., 2011) montrée, chez la souris, comme surexprimée après stimulation du TCR (Arvind et al., 2003).

En plus de suggérer l'importance de la stimulation du TCR dans l'acquisition du phénotype régulateur des thymocytes DP et SP, cela suggère aussi que les thymocytes régulateurs et donc les tTregs qui en découlent possèdent un TCR capable de reconnaître un autoantigène présenté par les cTEC et les mTEC dans le thymus. Ainsi, l'hypothèse actuelle indique que les tTregs formeraient un pool de cellules participant à la régulation des réponses T dirigées contre le soi. Autrement dit, les tTregs seraient des sentinelles dédiées à l'inhibition de la survenue de syndromes auto-immuns. L'expression de FoxP3 dans les thymocytes serait directement dépendante de la spécificité antigénique et de l'affinité de leur TCR.

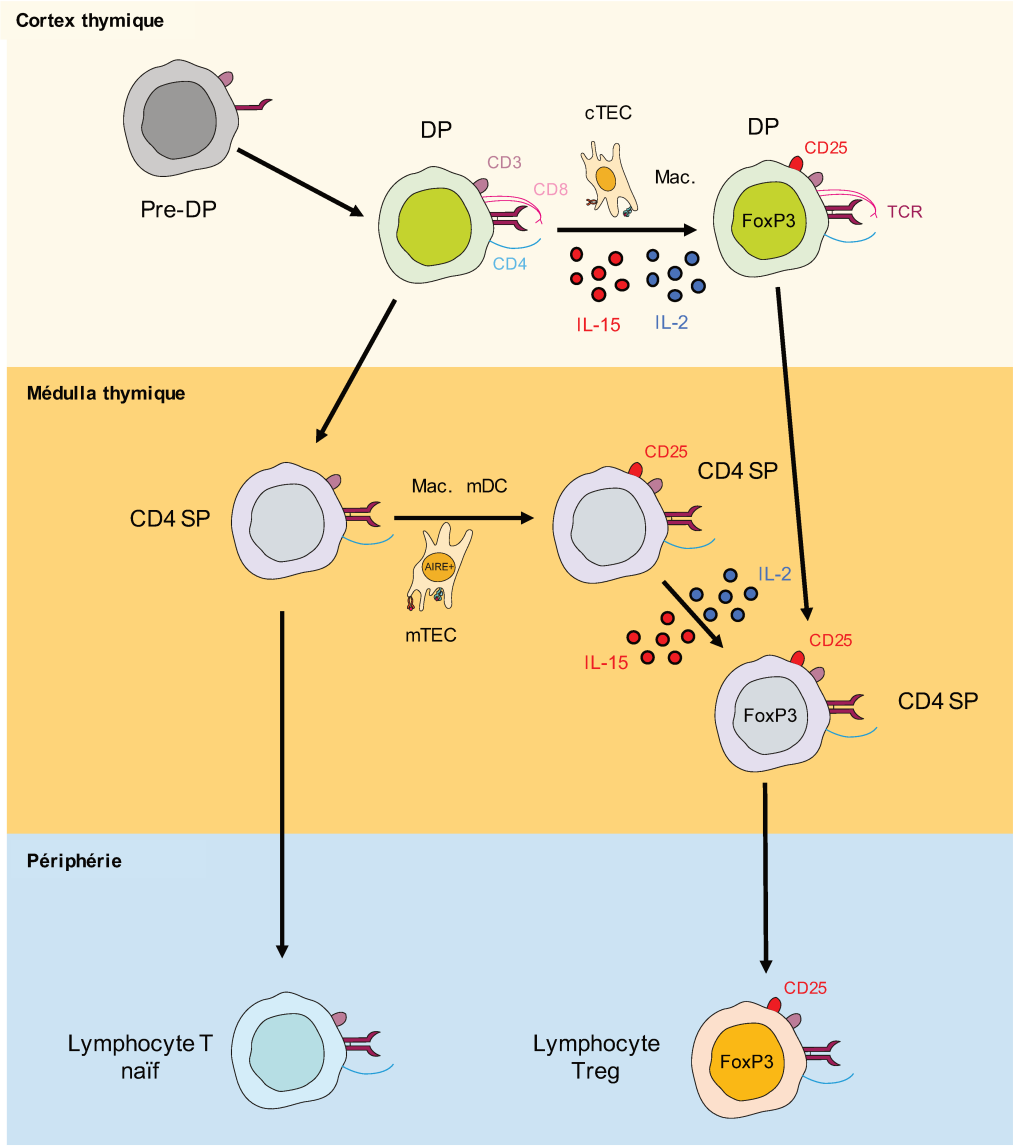


Figure 7 : Le développement thymique des tTregs

Adapté de Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R. B. & Sousa, A. E. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. Front Immunol 6, 395 (2015)

De nombreux autres facteurs et voies de signalisation ont été identifiés comme impliqués dans la différentiation des thymocytes en tTregs. La lymphoprotéine stromale thymique TSLP permet aux cellules dendritiques thymiques de différencier des thymocytes SP en tTregs (Hanabuchi et al., 2010; Watanabe et al., 2005). Cette capacité des cellules dendritiques à induire des tTregs est perdue lors du blocage de la molécule HLA-DR (Hanabuchi et al., 2010; Watanabe et al., 2005). De plus, les cellules mTEC sont capables d'induire la survie et la prolifération de tTregs via un mécanisme ICOS/ICOS-ligand dépendant en présence d'IL-2 (Nazzal et al., 2014). Enfin, le rôle critique de la présence d'IL-2 et d'IL-15 dans la différenciation des thymocytes en tTregs a été décrit par Caramalho et al. Cette étude met aussi en évidence le rôle des lymphocytes B et des macrophages en tant que cellules présentatrices d'antigènes impliquées dans l'acquisition d'un phénotype $FoxP3^+$ des thymocytes SP et DP (Caramalho et al., 2015b).

2. L'induction en périphérie des pTregs

Les premiers travaux traitant de Tregs induits *in vivo* ont été réalisés dans un modèle de tolérance orale chez le cochon d'Inde, et par transfert adoptif de splénocytes d'une souris ayant reçu le protocole de tolérance orale à l'ovalbumine dans une souris naïve. Ce transfert permettait à la souris receveuse de présenter une tolérance envers ce même antigène (Richman et al., 1978). Ces études suggéraient donc l'existence d'une tolérance périphérique assurée par des cellules qui n'était pas dérivées du thymus. En 2003, Chen et al. ont mis en évidence la conversion de cellules T naïves $CD4^+CD25^-$ en cellules Tregs $CD4^+CD25^+$ exprimant FoxP3 *in vitro* via l'activation des cellules T conventionnelles en présence de TGF-ß et d'IL-2 (Chen et al., 2003). Ces cellules induites *in vitro* étaient capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T conventionnels *in vitro* et d'inhiber *in vivo*, par transfert adoptif, les réponses T antigènes spécifiques dans deux modèles : un modèle murin de TCR transgénique dirigé contre le peptide immuno-dominant de l'ovalbumine et un modèle d'induction d'asthme allergique aux acariens (Chen et al., 2003). Par la suite, de nombreuses équipes se sont intéressées aux mécanismes d'induction de Tregs *in vivo* et à leur capacité d'assurer une tolérance périphérique. Ainsi une stimulation du TCR par de faibles doses de ligands ou des ligands de haute affinité (Gottschalk et al., 2010; Kretschmer et al., 2005) accompagnée d'une co-stimulation sub-optimale

(Semple et al., 2011; Zheng et al., 2006), de TGF-ß1 (Josefowicz et al., 2009; Tone et al., 2008), d'IL-2 (Chen et al., 2011; D'Cruz and Klein, 2005; Fontenot et al., 2005) et ou d'acide rétinoïque (Xiao et al., 2008) semble favoriser la conversion de lymphocytes T conventionnels en pTregs *in vivo*.

En regard de ces études visant à induire expérimentalement des cellules Tregs *in vivo*, il est décrit que ces pTregs peuvent être retrouvés dans un contexte de pathologie inflammatoire chronique. Plusieurs études ont démontré l'induction de pTregs dans des modèles murins d'asthme allergique (Curotto de Lafaille et al., 2008; Weiss et al., 2012), de colite (Haribhai et al., 2009) et d'infection parasitaire intestinale (Grainger et al., 2010). Dans les années 2010, le développement de pTregs a aussi été identifié dans différents sites immuno-privilégiés (McPherson et al., 2013; Zhou et al., 2012).

3. Comment différencier les pTregs des tTregs

Depuis la découverte des Tregs induits *in vivo* en périphérie, les pTregs, de nombreuses équipes s'intéressent aux différences à la fois phénotypiques et fonctionnelles entre ces pTregs et les tTregs. Bien que leurs origines soient différentes, il semble que ces deux sous-populations Tregs soient très similaires.

i. Les marqueurs phénotypiques

En 2010, Thornton et al. ont proposé le facteur de transcription Helios comme marqueur permettant de différencier les tTregs des pTregs. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence que 70% des cellules Tregs présentes en périphérie expriment le facteur Helios à la fois chez la souris et chez l'Homme, alors que près de 95% des Tregs thymiques murins sont Helios$^+$ (Thornton et al., 2010). D'autres études ont ensuite décrit l'expression de Helios par plus de 90% des Tregs thymiques chez l'Homme (MacDonald et al., 2013). Ces résultats suggéraient donc l'intérêt potentiel de Helios comme marqueur spécifique des tTregs.

Depuis, plusieurs études ont décrit l'expression du facteur de transcription Helios à la fois par des Tregs induits *in vitro*, mais aussi par des pTregs chez la souris.

En 2012, Gottschalk et al., mettent en évidence, après transfert de cellules T portant un TCR transgénique chez la souris et injection du peptide du cytochrome c de mite, l'induction *in vivo* de cellules Tregs FoxP3^{+} exprimant le facteur de transcription Helios. (Gottschalk et al., 2012). Chez l'homme, l'étude de Himmel et al., remet, elle aussi, en cause l'utilisation de Helios comme marqueur des tTregs. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence une importante proportion (plus de 30%) de cellules Tregs naïves, considérées comme dérivées directement du thymus, qui n'expriment pas Helios (Himmel et al., 2013). Ainsi, l'utilisation du facteur de transcription Helios comme marqueur exclusif des tTregs reste encore aujourd'hui controversée (Dhamne et al., 2013; Shevach and Thornton, 2014).

Comme le facteur de transcription Helios, la Neuropilin-1 fut décrite en 2012 comme potentiel marqueur des cellules tTregs. Les études de Yadav et al. et de Weiss et al., ont identifié la Neuropilin-1 comme marqueur exprimé exclusivement par les tTregs chez la souris dans des modèles d'EAE et d'asthme allergique après sensibilisation à l'ovalbumine (Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012). Bien que ces travaux aient permis de mieux caractériser les tTregs et pTregs chez la souris, leur transposition chez l'Homme reste controversée. Plusieurs études ont en effet remis en doute la robustesse de la Neuropilin 1 comme marqueur des tTregs humains (Battaglia et al., 2008; Milpied et al., 2009). Parmi ces études, Milpied et al. ont mis en évidence l'absence de différence dans l'expression de la Neuropilin-1 par les Tregs issus du thymus, du sang, des ganglions lymphatiques et des amygdales (Milpied et al., 2009). Ainsi, l'utilisation de la molécule Neuropilin-1 comme marqueur exclusif des tTregs chez l'Homme reste elle aussi controversée.

Chez l'Homme aucun marqueur robuste ne permet donc de différencier les tTregs dérivés du thymus, des pTregs induits *in vivo* en périphérie. Ceci constitue une limitation importante dans la meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces deux sous-populations chez l'Homme. Cependant à l'aide des marqueurs Helios et Neuropilin-1 plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à leur fonctions chez la souris.

ii. La spécificité antigénique

Le fait que les tTregs, contrairement aux pTregs, acquièrent leur phénotype régulateur lors de leur développement thymique, nécessitant un engagement du TCR, et possèdent une fonction centrale dans le contrôle du développement de pathologies auto-immunes, suggèrent que ces tTregs sont spécifiques d'auto-antigènes. Cette auto-réactivité des tTregs a été clairement établie dans deux études chez la souris au début des années 2000 (Hsieh et al., 2004; Romagnoli et al., 2002). En effet, Hsieh et al., ont montré que les tTregs et les T CD4 possèdent un répertoire TCR distinct et que les tTregs sont capables de reconnaitre des peptides du soi lorsqu'ils sont présentés par des cellules présentatrices d'antigènes de la rate (Hsieh et al., 2004).

Contrairement aux tTregs, les pTregs semblent être eux spécifiques d'antigènes du non-soi étant donné que cette population est induite à partir de lymphocytes T CD4 conventionnels, qui en raison de la sélection négative lors de leur développement dans le thymus, n'auraient théoriquement pas pu survivre s'ils étaient auto-réactifs. Ainsi, Haribhai et al., ont montré que les pTregs présentaient un répertoire TCR peu semblable à celui des tTregs (Haribhai et al., 2011). Ainsi, contrairement aux tTregs qui formeraient un pool de cellules sentinelles dédiées à l'inhibition de la survenue de syndromes auto-immuns, les pTregs pourraient permettre d'étendre cette tolérance envers des antigènes extérieurs, particulièrement au niveau des muqueuses en contact direct avec l'extérieur (Schmitt and Williams, 2013).

iii. Modification épigénétique et stabilité

À la fois chez l'Homme et chez la souris, la stabilité de l'expression du facteur de transcription FoxP3 est dépendante de modifications épigénétiques (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007; Lal and Bromberg, 2009). En effet, la déméthylation d'une région du promoteur du gène codant FoxP3 n'est retrouvée que sur les cellules Tregs comparées aux autres cellules présentes en périphérie. Cette région est appelée TSDR pour Treg specific demethylated region (Baron et al., 2007). Il semble de plus, que parmi les cellules FoxP3^{+}, le statut de déméthylation des TSDR soit directement impliqué dans la stabilité du phénotype régulateur des Tregs (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007; Wieczorek et al., 2009).

Plusieurs équipes se sont donc intéressées au statut de méthylation des TSDR au sein des compartiments tTregs et pTregs. Dans l'ensemble de ces études, il apparaît que les pTregs induits *in vivo* expérimentalement ou induits *in vitro* et les tTregs présentent un statut de méthylation différent. En effet, une méthylation plus importante des TSDR a été décrite pour les pTregs comparés aux tTregs (Baron et al., 2007; Floess et al., 2007; Haribhai et al., 2011; Lal et al., 2009; Ohkura et al., 2012; Polansky et al., 2008; Schmitt et al., 2012; Zheng et al., 2010).

D. Les mécanismes d'action de Tregs

Les lymphocytes T régulateurs ne constituent pas une population homogène. En effet, au-delà de la distinction tTregs / pTregs, on distingue aussi différents stades de « maturation » ou « d'activation » au sein du compartiment Treg. Chez l'homme, bien que la majorité des Tregs retrouvés en périphérie possèdent un phénotype mémoire/effecteurs : $CCR7^{-}CD45RA^{-}$ (Beyer and Schultze, 2007), seuls les Tregs présentant un phénotype naïf ($CD45RA^{+}$) maintiennent leur phénotype et leurs fonctions régulatrices après expansion *ex vivo* (Hoffmann et al., 2006). Plus récemment l'étude de Miyara et al., publiée en 2009, distinguait les resting-Tregs ($CD45RA^{-}FoxP3^{low}$), les Tregs mémoires ($CD45RA^{-}FoxP3^{high}$) et les Tregs naïfs ($CD45RA^{+}FoxP3^{low}$) (Miyara et al., 2009). Dans cette étude, les Tregs mémoires présentent des capacités suppressives plus importantes que les resting Tregs ou les Tregs naïfs alors que les Tregs naïfs constitue le seul sous-type de Tregs capable de secréter d'importante quantité de cytokines immunosuppressives *ex vivo* (Miyara et al., 2009). Ces études illustrent le fait que les mécanismes d'action des Tregs peuvent différer en fonction de la population de Tregs étudiée et qu'il n'existe pas un mécanisme d'action mais que les Tregs possèdent plusieurs mécanismes, leur permettant d'assurer une tolérance périphérique, mis en place en fonction du contexte inflammatoire et de la cellule cible (Schmidt et al., 2012).

1. L'induction d'apoptose de lymphocytes T effecteurs

L'un des mécanismes les plus efficaces pour inhiber les réponses immunes consiste en l'induction de l'apoptose des lymphocytes T effecteurs par les lymphocytes T régulateurs. Différentes études ont mis en évidence cette fonction de cytotoxicité

directe des Tregs humaines et murine *in vitro* via la secrétion de Granzyme A, B et de perforines sur les cellules T effectrices, mais aussi sur les monocytes et les cellules dendritiques (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004; Zhao et al., 2006).

2. La déprivation en IL-2 necessaire à l'activité T effectrice

Du fait de l'expression importante de la molécule CD25, recepteur de haute affinité à l'IL-2, à la surface des Tregs, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'effet, sur les réponse T effectrices, de l'appauvrissement du milieu en IL-2 par les Tregs. Ainsi, chez la souris, les résultats de Pandiyan et al. suggèrent l'implication des Tregs dans l'apoptose des lymphocytes T conventionnels, via la déprivation du milieu en IL-2 (Pandiyan et al., 2007). Cependant, cette observation reste aujourd'hui controversée. En effet, lors de la co-culture de cellules Tregs et T conventionelles murines, le blocage de la molécule CD25 *in vitro*, inhibant la consommation de l'IL-2 par les Tregs, n'a pas d'effet sur l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T conventionnels (Tran et al., 2009). De plus, l'étude de Vercoulen et al., a mis en évidence l'importance de l'IL-2 exogène dans la prolifération des lymphocytes T conventionnels mais pas de modification de l'apoptose de ces cellules en absence d'IL-2 remettant en cause le lien entre la déprivation en IL-2 et l'induction d'apoptose des lymphocytes T (Vercoulen et al., 2009)

3. La sécrétion cytokinique : induction d'un environnement pro-tolérogène

De nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à l'importance de la sécrétion de cytokines dans la modulation de l'environnement cellulaire des cellules Tregs et dans leurs capacités suppressives, particulièrement sur les réponses immunes des cellules T conventionnelles. Ainsi, de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle crucial de la sécrétion d'IL-10 et de TGF-ß, deux cytokines immunosuppressives, dans l'activité régulatrice des Tregs et la mise en place d'un environnement tolérogène.

i. Le TGF-béta

Le TGF-béta (TGF-ß) a été décrit comme étant une cytokine majeure dans le développement et la fonction des Tregs. Une déficience en TGF-ß chez la souris, au niveau systémique ou uniquement dans les lymphocytes T, se traduit par le développement de pathologies auto-immunes médiées par les lymphocytes T et par une diminution du nombre de Tregs circulants, suggérant son rôle dans le maintien d'une tolérance au soi en périphérie (Li et al., 2006a, 2006b; Marie et al., 2006). Plusieurs études ont mis en évidence une sécrétion importante de TGF-ß par les Tregs à la fois sous sa forme soluble ou liée à la membrane cellulaire. De plus, le blocage du TGF-ß lors de test de suppression *in vitro* inhibe partiellement l'activité régulatrice des lymphocytes Tregs humains ou murins sur la prolifération des lymphocytes T conventionnels (Levings et al., 2002; Nakamura et al., 2001). Cependant, l'implication du TGF-ß dans l'inhibition des réponses T conventionnelles reste controversée. Les études de Baecher-Allan et al., Piccirillo et al., ou encore Godfrey et al., n'identifient pas le TGF-ß comme acteur de la suppression des réponses T conventionnelles (Baecher-Allan et al., 2002; Godfrey et al., 2005; Piccirillo et al., 2002). En effet, la neutralisation du TGF-ß à l'aide d'un anticorps bloquant n'influence pas les capacités suppressives des Tregs murines *in vitro*, et *ex vivo*. Les Tregs issus de souris TGF-ß1 -/- présentent des capacités suppressives équivalentes aux Tregs des souris TGF-ß1+/+ (Piccirillo et al., 2002).

Plus récemment, de nouvelles preuves de l'implication du TGF-ß dans les mécanismes de tolérance périphérique *in vivo* ont été décrit. Dans des modèles murins de colite, la sécrétion de TGF-ß par les Tregs est nécessaire pour prévenir le développement de la maladie (Izcue et al., 2009). De plus, les souris présentant une déficience en TGF-ß dans les lymphocytes T exclusivement, présentent des réponses T helper augmentées et le développement de syndromes auto-immuns (Li et al., 2007). L'ensemble de ces travaux suggèrent, malgré la controverse, un rôle important du TGF-ß dans les mécanismes de régulation assurés par les Tregs, bien que celui-ci puisse dépendre de la cellule cible et de l'environnement inflammatoire étudié (Schmidt et al., 2012).

ii. L'interleukine 10

L'interleukine 10 (IL-10) est l'une des principales cytokines pro-tolérogénique ayant été décrite pour son activité *in vitro* à la fois sur les lymphocytes T, les lymphocytes B mais aussi les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques (Moore et al., 2001). Comme pour le TGF-ß, plusieurs modèles expérimentaux suggèrent l'activité immunosuppressive de l'IL-10 *in vivo*. En effet, les souris déficientes en IL-10 développent une entérocolite chronique (Kühn et al., 1993) et l'IL-10 est impliquée dans la prévention du développement de pathologies inflammatoires cutanées et de chocs endotoxiques en réponse au LPS (Berg et al., 1995). Le rôle de l'IL-10 dans la régulation des réponses immunes dépendantes des Tregs a beaucoup été étudié. En 1999, Asseman et al., se sont intéressés aux mécanismes de régulation des Tregs *in vivo* dans un modèle de colite induite par transfert de cellules T conventionnelles chez des souris immunodéficientes en lymphocyte B et T (SCID : severe combined immunodeficient mice). Dans ce modèle, contrairement aux Tregs provenant de souris IL-10+/+, le transfert de Tregs provenant de souris IL-10-/- ne prévient pas le développement de la colite (Asseman et al., 1999). Toujours dans ce même modèle, le rôle de l'IL-10 a été précisé dans les années 2000. Ainsi, l'IL-10 a été décrite comme impliquée dans le contrôle des réponses T mémoires/activées et non dans le contrôle des réponses T naïves (Asseman et al., 2003; Uhlig et al., 2006). L'importance de l'IL-10 dans l'inhibition des réponses immunes par les Tregs a ensuite été démontrée dans d'autres modèles murins de pathologies inflammatoires *in vivo* (Belkaid, 2007; McGeachy and Anderton, 2005).

Contrairement au TGF-ß, pour lequel la majorité des études démontrent son implication dans le maintien de la tolérance au soi, il semble que l'IL-10 ne soit pas impliquée dans ces phénomènes mais plus plutôt dans la régulation des réponses immunes dirigées contre le non-soi, ou dans le maintien d'une « homéostasie » immunitaire en évitant l'emballement du système immunitaire lors d'évènements inflammatoires chroniques de type infectieux (Rubtsov et al., 2008). En effet, des souris déficientes pour l'IL-10 ou son récepteur ne développent pas spontanément de syndrome auto-immuns mais sont plus susceptibles au développement de colite en réponse à la flore intestinale (Kühn et al., 1993; Spencer et al., 1998). Dans ce cadre, chez l'Homme, des variants dans le locus codant pour l'IL-10 ont été identifiés comme

facteur de risque pour le développement de colite ulcérative (Franke et al., 2008). Enfin, les Tregs sont capable d'inhiber l'hyperréactivité bronchique dans un modèle d'asthme allergique induit par sensibilisation et challenge d'ovalbumine chez la souris. Cette inhibition est IL-10 et non TGF-ß dépendante (Presser et al., 2008).

Ayant discuté dans la partie « développement des Tregs », de l'importance des tTregs dans le contrôle des syndromes auto-immuns, contrairement au pTregs qui seraient plutôt impliqués dans l'immunité des muqueuses, et l'inhibition des réponses immunes dirigées contre des antigènes extérieurs, il est possible que le TGF-ß soit un mécanisme propre au tTregs et que l'IL-10 participe plus spécifiquement à la modulation des réponses immunes par les pTregs.

Au-delà de son activité suppressive, lorsqu'elle est secrétée par les Tregs, il semblerait que l'IL-10 joue aussi un rôle dans le maintien du phénotype régulateur des Tregs lorsqu'elle est secrétée par d'autres cellules du système immunitaire (Murai et al., 2009) comme les lymphocytes Tr1 (Roncarolo et al., 2006), les lymphocytes B régulateurs (Iwata et al., 2011) et les macrophages (Gerber and Mosser, 2001).

iii. Les autres cytokines pro-tolérogènes

D'autres cytokines ont été identifiées plus récemment comme ayant un rôle dans la fonction pro-tolérogénique des Tregs. En effet, en 2015, Bézie et al., ont identifié l'IL-34 comme une cytokine exprimée par les lymhocytes Tregs $CD4^{+}CD45RC^{low}FoxP3^{+}$ et ayant une capacité immuno-régulatrice (Bézie et al., 2015; Guillonneau et al., 2017). La capacité suppressive de l'IL-34 était déjà suggérée par d'autres études ayant mis en évidence un lien entre l'IL-34 et le développement tumoral (Baud'huin et al., 2010; DeNardo et al., 2011; Rietkötter et al., 2015) ainsi que les infections par des pathogènes (Preisser et al., 2014; Yu et al., 2015). De façon interessante, bien qu'une déficience en IL-34 chez la souris ne provoque pas le developpement de syndromes auto-immuns (Wang et al., 2012), l'IL-34 est capable *in vitro* d'assurer l'inhibition de l'activation des lymphocytes T CD4 effecteurs, et *in vivo*, dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, l'injection d'IL-34 prolonge le maintien du greffon fonctionnel (Bézie et al., 2015).

Comme l'IL-34, l'IL-35 a aussi été identifiée comme impliquée dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T conventionnels par les Tregs (Collison et al., 2007). La déficience pour l'une des chaines formant l'IL-35 aboutit à une diminution de la fonction suppressive des Tregs *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de pathologie inflammatoire de l'intestin : l'IBD (Inflammatory Bowel Disease). Cependant, chez la souris, cette déficience ne provoque pas le developpement spontanée de désordes auto-immuns (Collison et al., 2007). Chez l'Homme, il apparaît que l'IL-35 n'est pas constitutivement exprimé par les Tregs (Bardel et al., 2008), mais, *in vitro*, le traitement de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs par de l'IL-35 induit une population de Tregs $FoxP3^-$ dont les fonctions suppressives sont exclusivement dépendantes de l'IL-35 (Collison et al., 2010).

4. Modulation de la fonction et de la maturation des cellules dendritiques

En plus des fonctions des Tregs ciblant directement les lymphocytes T convientionels, les Tregs sont aussi capable de moduler la maturation et la fonction de cellules dendritiques (Bluestone and Tang, 2005). Des études *in vivo*, par imagerie intra-vitale, ont mise en évidence une interaction directe entre les lymphocytes Tregs et les cellules dendritiques (Tadokoro et al., 2006; Tang et al., 2006). Cette interaction permettrait la modulation de l'activation des lymphocytes T conventionnels par le biais d'un mécanismes impliquant CTLA-4, exprimé à la surface des Tregs (Read et al., 2000). L'utilisation d'anticorps anti-CTLA-4 ou de lymphocytes Tregs déficients en CTLA-4 diminue la supression des lymphocytaire T dépendante de la modulation cellules dentritiques/Tregs (Oderup et al., 2006). Cette interaction des Tregs $CTLA\text{-}4^+$ avec les cellules dendritiques préviendrait directement l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 à leur surface. En plus de de ce mécanisme CTLA-4 dépendant, d'autres études ont mis en évidence un rôle des Tregs dans l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques et dans leur fonction via Lag3, ainsi que l'IL-10 ou le TGF-ß, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T conventionnels (Houot et al., 2006; Kryczek et al., 2006; Liang et al., 2008; Misra et al., 2004).

5. Modification métabolique de l'environnement cellulaire

Plus récemment, la capacité des Tregs à induire un environnement pro-tolérogènique indépendamement de la sécrétion cytokinique a été identifiée comme un nouveau mécanisme de régulation immune des Tregs. En 2007, plusieurs équipes de recherche ont mis en évidence l'expression des ectonucléotidases membranaires CD39 et CD73 à la surface des Tregs humaines et murines (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007; Dwyer et al., 2007). Ces deux molécules sont impliquées dans la modulation de l'environnement inflammatoire. En effet, la molécule CD39 ,caractérisée pour la première fois en 1996 (Kaczmarek et al., 1996), possède une activité phosphohydrolytique sur l'adénosine tri-phosphate (ATP) et l'adénosine di-phosphate (ADP) (Deaglio et al., 2007), deux médiateurs pro inflammatoires impliqués dans l'activation lymphocytaire T (Bours et al., 2006). La molécule CD73, permet la dégradation de l'adénosine mono-phosphate (AMP) extracellulaire en adénosine, un médiateur anti-inflammatoire capable d'augmenter les capacités regulatrices des Tregs et d'inhiber l'activation des cellules dendritiques et des lymhpocytes T conventionnels (Borsellino et al., 2007; Bours et al., 2006; Schenk et al., 2011; Trabanelli et al., 2012). Ainsi la co-expression des molécules CD39 et CD73 à la surface des Tregs permet de dégrader l'ATP extracellulaire en adénosine et ainsi induire un environnement pro-tolérogénique.

Suite à cette première découverte, de nombreuses études ont confortés l'implication de l'activité ATPasique des Tregs dans le controle des réponses immunes à la fois chez l'Homme et chez la souris (Fletcher et al., 2009; Ring et al., 2011; Sun et al., 2010; Ye et al., 2011). Enfin, un défaut dans la proportion de Tregs $CD39^{+}$ a été identifié chez l'homme comme associé au développement de différentes pathologies inflammatoires. (Åkesson et al., 2015; Grant et al., 2014; Han et al., 2017) suggérant le rôle de la dégradation de l'ATP extracellule dans le contrôle de l'inflammation par les Tregs.

E. Tregs : les fonctions physiologiques et physiopathologiques

Les lymphocytes T régulateurs constituent une sous-population importante à la fois necessaire au maintien de l'homéostasie des réponses immunes mais aussi impliquée dans différents processus pathologiques.

L'auto-immunité

En effet, les études fondatrices ayant permis l'identification de lymphocytes T CD4 aux capacités suppressives ont mis en évidence leur rôle clé dans le maintien de la tolérance au soi en périphérie (Gershon and Kondo, 1971; Nishizuka and Sakakura, 1969; Sakaguchi et al., 1982). Plus récemment, un défaut de la proportion ou de la fonction de ces Tregs a été identifié dans plusieurs pathologies autoimmunes chez l'Homme : le syndrome de l'IPEX (Bacchetta et al., 2007; Le Bras and Geha, 2006), le diabiète auto-immun de type 1 (Lindley et al., 2005), la sclérose en plaques (Viglietta et al., 2004) ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Ehrenstein et al., 2004). De plus, les Tregs possèdent un rôle thérapeutique potentiel dans le cadre de l'auto-immunité (Roncarolo and Battaglia, 2007) puisque dans différentes études pré-cliniques, le transfert de Tregs chez les souris permet de prévenir le développement de pathologies auto-immunes (Mottet et al., 2003; Tang et al., 2006).

La tolérance materno-fœtale

La gestation constitue une situation particulière impliquant la mise en place de mécansimes de tolerance actifs necessaires à la survie du fœtus. En effet, en l'absence de système de régulation immune, le fœtus peut etre considéré comme étranger par le système immunitaire de la mère puisqu'il présente des antigènes paternels. L'implication des Tregs dans ces mécanismes de tolérance materno-fœtale a d'abord été identifié chez la souris (Aluvihare et al., 2004). Aluvihare et al., on mis en évidence l'augmentation de la proportion de cellules lymphocytaires régulatrices dès les premiers jours de gestation (Aluvihare et al., 2004). De plus, la déplétion des lymphocytes Tregs conduit au rejet du fœtus (Samstein et al., 2012). Ces observations ont aussi été retrouvées chez la femme présentant une augmentation du nombre de Tregs lors d'une grossesse arrivant à terme (Somerset et al., 2004). A l'inverse, un faible nombre de Tregs dans l'utérus corrèle avec la survenue de fausses couches (Sasaki et al., 2004).

Les réponses anti-infectieuses

Les Tregs ont aussi été montré comme necessaires dans contrôle de la réponse immune lors d'infections. En effet, une infection virale ou bactérienne va provoquer la

mise en place d'une réponse effectrice rapide par le système immunitaire. Cette réponse, necessaire à l'élimination du pathogène doit néanmoins etre controlée afin d'éviter un emballement du système pouvant provoquer des lésions graves de l'organe infecté. Dans ce cadre plusieurs études ont identifié le rôle central des Tregs dans le contrôle des réponses anti-infectieuses (Mills, 2004).

Les réponses anti-tumorales

Dans le cadre des réponses anti-tumorales, les Tregs jouent un rôle délétère puiqu'ils favorisent la progression tumorale en inhibant les réponses dirigées contre les cellules en cours de division anarchique. Cette observation, d'abord décrite dans des modèles murins (Berendt and North, 1980; Bursuker and North, 1984) semble être aussi retrouvée chez l'Homme puiqu'un nombre elevé de Tregs a été mis en évidence dans différents types de cancers (Bacić et al., 2011; Sasada et al., 2003; Woo et al., 2001). De plus la présence de Tregs dans les tumeurs est un marqueur de mauvais pronostic chez l'Homme (Curiel et al., 2004).

La transplantation d'organe

Dans le cadre de la transplantation, plusieurs observations, dont celle de notre équipe suggèrent un rôle potentiel des Tregs dans les mécanismes de tolérance opérationelle aux allogreffes (Braza et al., 2015b). De plus l'utilisation des Tregs dans le but de prévenir le rejet de greffe est considéré comme une stratégie thérapeutique prometteuse et peut être obtenue par transfert de Tregs ou par leur induction *in vivo*. Cette implication des Tregs en tolérance opérationelle et son potentiel intérêt thérapeutique sont discutés plus en détails dans la partie suivante (Revue 1 : *Regulatory T cells in kidney Transplantation: New Directions ?*).

III. LA TRANSPLANTATION

A. Historique de la transplantation

Bien que plusieurs écrits fassent état d'essais de transplantation bien avant les années 1900, les grandes avancées ayant mené à ce que l'on connaît aujourd'hui ont été réalisées au XXème siècle. En effet, c'est en 1902, que le français Alexis Carrel met au point chez l'animal une nouvelle technique de suture vasculaire et suggère la necessité du maintien des organes dans le froid avant leur transplantation. C'est ainsi qu'il obtiendra en 1912 un prix Nobel pour ces travaux sur « la suture vasculaire et la transplantation de cellules sanguines et d'organes ». En 1906, Mathieu Jaboulay et Emerich Ullman échouent tous deux dans la réalisation d'une xénogreffe chez l'Homme. Néanmoins, ces travaux suggèrent déjà à l'époque l'implication de mécanismes distincts des techniques chirurgicales dans le maintien d'un greffon stable à plus long terme. Cette hypothèse a été fortement renforcée par les travaux de Serguey Voronoy en 1933, qui réalise la première allogreffe rénale à partir d'un donneur décédé. Cette tentative échoue mais permet la naissance de la notion de rejet médié par le système immunitaire.

C'est après la seconde guerre mondiale que de nombreuses avancées significatives vont etre réalisées dans le domaine de la transplantation. En 1952, Jean Hamburger et Jean Vaysse réalisent la première greffe à partir d'un donneur vivant : la greffe du rein d'une mère sur son enfant. L'enfant ne survivra que 21 jours. Cette même année, Jean Dausset et son équipe mettent en évidence l'existence de marqueurs moléculaires spécifiques à chaque individu : le système HLA (Human Leucocyte Antigene). Le rôle des différents groupes HLA-A, B et C chez l'Homme et H2-K, D et L chez la souris fut établi en 1958. Ainsi, pour cette dévouverte fondamentale dans le domaine de la transplantation, Jean Dausset reçoit le prix Nobel en 1980. C'est en 1954, qu'un premier essai de greffe à partir de donneur vivant fonctionne. À Boston, John Merril et Jospeh Murray réalisent une greffe sur un enfant atteint d'une néphrite. L'enfant reçoit alors le rein de son frère jumeau lui permettant ainsi de survivre près de 8 ans après la greffe. La survie du greffon arpès la greffe entre les deux jumeaux apporte une preuve de plus de la necessité d'une compatibilité immunologique entre donneur et receveur.

La preuve faite de l'importance du système immunitaire dans le rejet d'allogreffe chez l'Homme, d'autres essais se poursuivent en 1956 à Boston et à Paris. Lors de ces essais, des greffes sont réalisées à partir de faux jumeaux et après irradiation et traitement par des corticoïdes. Ces transplantations associées à un protocole visant à inhiber l'activation du système immunitaire des patients transplantés permettent une meilleure survie du receveur. Cependant, lors de ces greffes sur des faux jumeaux, l'obstacle de l'incompatibilité biologique reste partiellement infranchi. C'est la découverte et l'utilisation de l'aziathropine, utilisée pour la première en1962 lors d'une allogreffe chez l'Homme qui marque l'utilisation des immunosuppresseurs lors de la transplantation. Riches de l'ensemble de ces connaissances suite aux essais de greffes rénales, Starlz réalise la première greffe hépatique et Hardy la première greffe pulmonaire en 1963, Lillehei effectue la première greffe pancréatique en 1966 et Barnard la première greffe de cœur en 1967. Toutes ces premières fois ne permettent pas une survie à moyen-terme de l'organe transplanté.

La révolution dans le domaine de la transplantation intervient en 1972 lors de la découverte par Jean-François Borel des propriétés immunosuppressives de la cyclosporine ayant permis d'augmenter significativement le taux de survie de greffon hépatique à 5 ans. Cette molécule officiellement synthétisée chimiquement à partir des années 1980 apportera un développement considérable de la transplantation chez l'Homme. Ainsi, au cours du XXème et du XXIème siècle, dans le domaine de la transplantation, de nombreux axes ont été amélioré : les techniques chirurgicales, la conservation des greffons ainsi que les stratégies d'immunosuppression. Cependant, la transplantation présente toujours de nombreuses limites et complications et ne représente donc pas une solution thérapeutique définitive.

B. Les limites de la transplantation

1. Le manque de donneurs

Bien que des progrès très importants aient été réalisés ces dernières décénnies, la transplantation, reste majoritairement limitée par l'accès à la greffe. Du fait de la prévalence importante de pathologies chroniques aboutissant à une

dysfonction terminale d'organe, le nombre de greffons disponibles ne permet pas la transplantation de l'ensemble des patients en attente de greffe. En France, une augmentation constante du nombre de nouveaux inscrits sur les listes des patients en attente de greffe a été observée ces dix dernières années : 5483 en 2006 contre 7638 en 2015 (Tableau III) (Agence de la Biomédecine, 2015). Cependant le nombre de greffons disponibles ne suit lui pas cette augmentation. Ainsi, en 2015, parmi les 13826 patients en attente de greffe, 5746 ont été greffés et 553 sont décédés en attente d'un greffon (Tableaux IV, V) (Agence de la Biomédecine, 2015).

Tableau III : Evolution du nombre de nouveaux inscrits dans l'année de 2006 à 2015

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Coeur	454	508	508	485	463	515	530	545	570	622
Coeur-poumons	38	30	45	24	23	18	24	21	17	13
Foie	1300	1346	1372	1466	1580	1532	1724	1822	1787	1756
Intestin	9	14	20	7	7	11	8	5	2	3
Pancréas	124	105	116	125	119	93	119	127	129	127
Poumon	257	256	277	276	272	325	334	376	362	382
Rein	3301	3553	3731	3907	4171	4027	4337	4548	4768	4735
Total	**5483**	**5812**	**6069**	**6290**	**6635**	**6521**	**7076**	**7444**	**7635**	**7638**

Données extraites de CRISTAL le 01/03/2016

Tableau IV : Evolution du nombre d'inscrits au 1er janvier de 2006 à 2015

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Coeur	253	240	268	298	302	281	298	321	333	358
Coeur-poumons	28	34	29	34	24	18	17	15	21	18
Foie	486	540	574	669	806	932	941	1106	1267	1296
Intestin	13	13	20	26	21	12	12	10	9	5
Pancréas	170	171	150	154	159	148	145	165	178	200
Poumon	92	132	140	174	180	167	147	127	166	155
Rein	5949	6165	6495	6886	7602	8476	9089	9889	10813	11794
Total	**6991**	**7295**	**7676**	**8241**	**9094**	**10034**	**10649**	**11633**	**12787**	**13826**

Données extraites de CRISTAL le 01/03/2016

Tableau V : Evolution du nombre de greffes d'organes effectuées de 2006 à 2015

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Coeur	358	366	360	359	356	398	397	410	423	471
Coeur-poumons	22	20	19	21	19	12	20	11	13	8
Foie	1037 (36)	1061 (18)	1011 (10)	1047 (12)	1092 (17)	1164 (14)	1161 (9)	1241 (13)	1280 (12)	1355 (15)
Intestin	8	6	13	7	9	10	7	3	3	3
Pancréas	90	99	84	89	96	73	72	85	79	78
Poumon	182	203	196	231	244	312	322	299	327	345
Rein	2731 (247)	2912 (236)	2937 (222)	2826 (223)	2893 (283)	2976 (302)	3044 (357)	3074 (401)	3232 (514)	3486 (547)
Total	**4428 (283)**	**4667 (254)**	**4620 (232)**	**4580 (235)**	**4709 (300)**	**4945 (316)**	**5023 (366)**	**5123 (414)**	**5357 (526)**	**5746 (562)**

() : dont donneurs vivants hors dominos.
Données extraites de CRISTAL le 01/03/2016

Données issues du rapport « Le rapport médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France », Agence de la Biomédecine, 2015

2. Les complications précoces : chirurgicales et infectieuses

Au dela de la pénurie des greffons limitant fortement les transplantations des patients en attente de greffe, plusieurs complications limitent la survie des patients ou du greffon après la greffe. On distingue les complications précoces, liées à l'acte de transplantation, des complications tardives principallement liées à l'immunosuppression ou au rejet de l'allogreffe par le système immunitaire du receveur. Le prélèvement d'un greffon l'expose a des risques de lésions pouvant aboutir à une dysfonction, voire une absence totale de fonction du greffon. Ces lésions sont principallement dues aux mécansimes physiologiques et inflammatoires mis en place lors de la période d'ischémie, causant une hypoxie des tissus, et la reperfusion après revascularisation du greffon chez le receveur (Eltzschig and Carmeliet, 2011; Yellon and Hausenloy, 2007). Bien que la perfusion d'un liquide de préservation et le maintien en hypothermie du greffon aient permis une diminution de ces risques de dysfonctions, ceux-ci sont toujours présents aujourd'hui. De plus, la réponse inflammatoire, résultat de l'ischémie et reperfusion du greffon, conduit à l'activation des cellules lymphocytaires T au sein du greffon et peut être impliquée dans le développement de rejets aigus et chroniques (Chen and Date, 2015; Lenaerts et al., 2013; Salvadori et al., 2015).

En plus des lésions dévéloppées lors du prelevement du greffon, des complications infectieuses peuvent aussi survenir dans les mois suivant la transplantation (Fishman, 2007). Celles-ci peuvent être favorisées par différents paramètres : la condition du receveur, la durée et les difficultées rencontrées lors de l'opération, la fonction du greffon après-greffe ainsi que l'immunosupression du receveur (Halloran, 2004). Ainsi la prévention des complications infectieuses est aujourd'hui systématique et passe par la préparation du receveur, l'utilisation d'antibiotiques pour lutter contre les infections bactériennes, l'appariemment donneur receveur concernant leur statut pour les infections aux cytomégalovirus et l'EBV, l'administration d'anti-viraux à titre préventif et la modulation des traitements immunosupresseurs (Fishman, 2007).

3. Les complications tardives : immunosuppression et rejets

Les complications tardives après transplantation sont principalement dépendantes de l'attaque du greffon par le système immunitaire induisant son rejet ou dépendantes de l'administration des traitements immunsupresseurs. En effet ces traitements présentent de nombreux effets délétères : susceptibilité accrue aux infections virales, perturbations métaboliques, développement de cancers et nephrotoxicité (Malvezzi and Rostaing, 2015; Ventura-Aguiar et al., 2016). Les mécanismes de rejet d'allogreffe ainsi que les effets délétères des traitements immunosupresseurs sont discutés dans les parties suivantes des généralités.

C. La réponse allo-immune et le rejet d'allogreffe

Le rejet d'allogreffe constitue l'une des complications à moyen et long-terme la plus difficile à contrôler. Elle intervient lors de la reconnaissance des antigènes du greffon par le système immunitaire de receveur. On distingue différents types de rejets en fonction du temps post-transplantation (Figure 8) et des mécanismes mis en jeu.

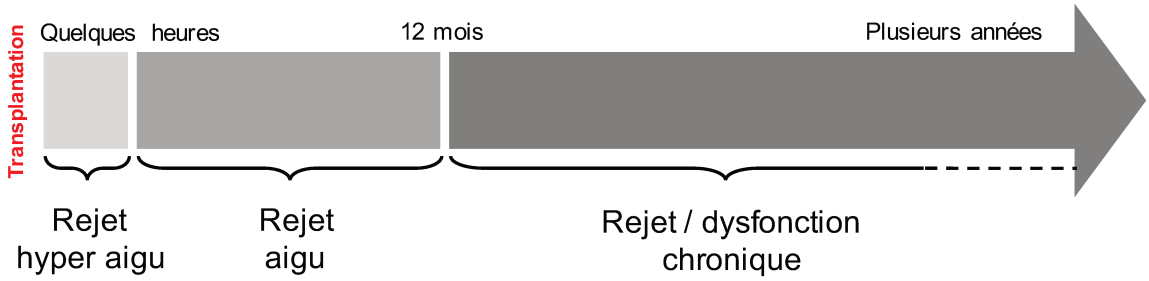


Figure 8 : Temps relatif du développemet de rejet hyper aigu, aigu et chronique après transplantation

1. La reconnaissance du greffon par le système immunitaire du receveur

La reconnaissance des allo-antigènes par les lymphocytes T du receveur est le point de départ de la mise en place d'une réponse dirigée contre l'allogreffe aboutissant son rejet et, ou sa perte de fonction. Cette reconnaissance des allo-antigènes par les lymphocytes T peut passer par trois voies différentes : la voie directe, la voie indirecte et la voie semi-directe (Figure 9).

i. La voie directe

La voie de reconnaissance directe fait intervenir les cellules présentatrices du donneur. Ces cellules vont porter un complexe CMH/peptide du donneur directement reconnu par les lymphocytes T du receveur en présence de signaux de costimulation (Figure 9a.). Cette réaction peut être observée *in vitro* lors de l'activation et la prolifération des lymphocytes T du donneur cutlivés avec des cellules présentatrices d'antigènes irradiées du receveur : c'est la réaction lymphocytaire mixte (MLR) (Gould and Auchincloss, 1999). *In vivo*, différentes études ont mis en évidence une augmentation du temps de survie de la greffe suite à la déplétion des cellules présentatrices d'antigène du greffon (Batchelor et al., 1979).

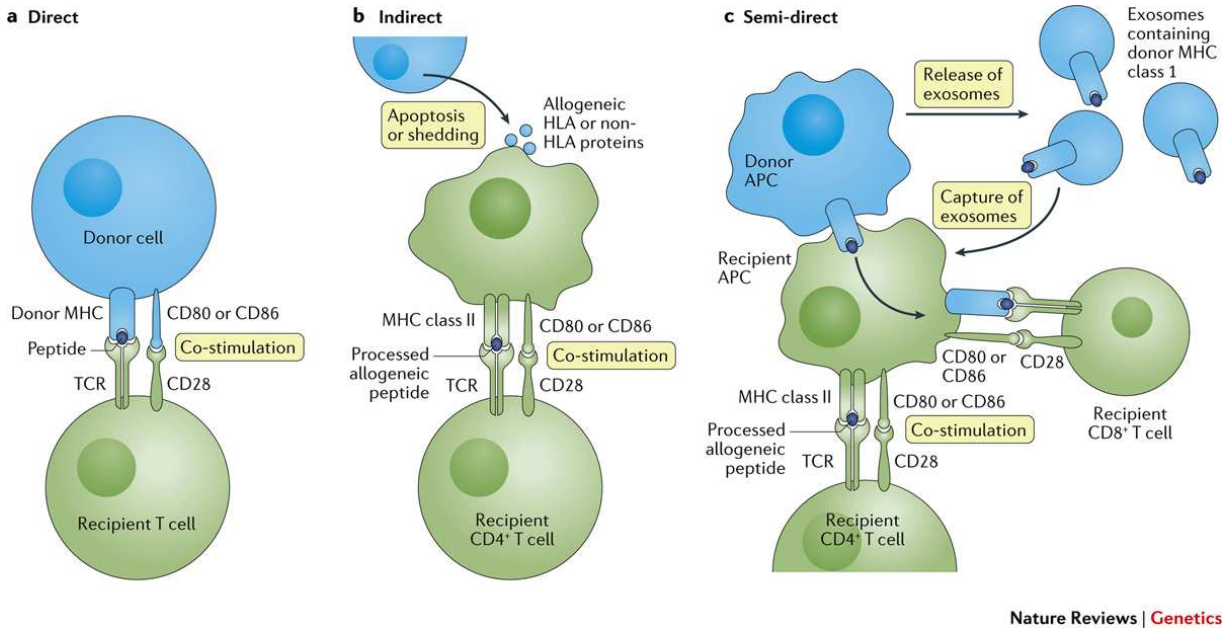


Figure 9 : Les diférentes voies de reconnaissance des alloantigènes

Figure issue de Yang, J. Y. & Sarwal, M. M. Transplant genetics and genomics. Nat. Rev. Genet. 18, 309–326 (2017).

Cette voie de reconnaissance a été particulièrement associée à la survenue de rejets aigus cellulaires. Cependant, cette reconnaissance d'un complexe CMH/peptide du non soi, par le TCR d'un lymphocyte T du receveur pose la question de l'efficacité de l'éducation thymique au soi, et des mécansimes impliqués dans cette reconnaissance. Deux hypothèses subsistent actuellement. La première consisterait en la reconnaissance directe du CMH porté par les cellules du greffon par le TCR des lymphocytes T du receveur, indépendamment du peptide allogénique. La seconde

hypothèse propose une proximité entre les molécules de CMH du donneur et du receveur permettant aux lympocytes T du receveur d'engendrer une réponse immune suite à la reconnaissance du peptide allogénique même s'il est présenté sur une molécule du CMH du donneur. Dans la réalité, il est possible qu'à la fois la molécule du CMH du donneur et le peptide allogénique soit capables d'engendrer l'activation des lymphocytes T du receveur (Obst et al., 2000).

ii. La voie indirecte

La voie de reconnaissance indirecte fait intervenir la présentation de peptides allogéniques portés par les CMH-II du soi par des cellules présentatrices du receveur permettant ainsi l'activation des lymphocytes T CD4 du receveur (Figure 9b.) Contrairement à la voie directe, le rôle de la voie de présentation indirecte dans les mécanismes de rejets aigus reste discuté. Il semble néanmoins que cette voie de présentation des allo-antigènes joue un rôle important dans les mécanismes de rejets chroniques et de secrétion d'anticorps spécifiques du donneur après transplantation d'organe (Benichou, 1999; Benichou and Thomson, 2009; Conlon et al., 2012).

iii. La voie semi-directe

La voie de reconnaissce des alloantigènes semi-directe a été proposée suite à l'observation de l'activation de lymphocytes T CD8 par les cellules dendritiques capables d'activer aussi les lymphocytes T CD4 via la présentation d'alloantigènes par les CMH-II. Cette voie de présentation implique l'acquisition du CMH-I chargé par des peptides allogéniques par les cellules présentatrices d'antigènes du receveur. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de l'acquisition d'un CMH-I/peptide allogénique par les cellules présentatrice du receveur : le contact cellulaire avec les cellules présentatrices du donneur, le contact cellulaire avec les cellules endothéliales du greffon ou encore la capture d'exosomes issus des tissus du greffon portant un CMH-I chargé avec un peptide allogénique (Figure 9c.) Ce transfert des molécules de CMH-I chargées aux cellules présentatrices du receveur permet à la fois la présentation de peptides allogéniques par les CMH-II du soi aux lymphocytes T CD4 et la présentation de peptides allogéniques par les CMH-I du donneur aux lymphocytes T CD8, induisant ainsi l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 du receveur (Herrera

et al., 2004). Le rôle de la présentation semi-directe dans le développement de rejet après transplantation reste aujourd'hui encore controversé.

2. Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu est le plus fulgurant, en effet, il intervient dès les premières heures voires les premières minutes après la transplantation (Figure 8). Il est dû à la présence dans le sang du receveur d'anticorps préformés dirigés contre les molécules présentes à la surface des cellules endothéliales du greffon, les molécules de CMH, et des molécules du système des groupes sanguins ABO présentes à la surface des globules rouges du donneur (Cai and Terasaki, 2005; Kissmeyer-Nielsen et al., 1966; Williams et al., 1968). Ces anticorps peuvent s'être formés à la suite de transfusion sanguine, d'une grossesse ou de précédentes greffes. La fixation de ces anticorps à la surface des cellules du greffon va induire l'activation de la cascade du complément et la mort par nécrose des tissus de l'allogreffe aboutissant à une perte rapide et irréversible du greffon.

De nos jours, le rejet hyper-aigu est extrémement rare. Les progrès effectués dans le typage systématique du groupe sanguin des donneurs et receveurs et la détection des anticorps pré-formés dirigés contre le greffon ont permis l'amélioration de la compatibilité donneur/receveur et donc permis d'éviter le développement de rejet hyper-aigu.

3. Le rejet aigu

Le rejet aigu se développe dans les premières semaines, les premiers mois, voire dans la première année après transplantation (Figure 8). On distingue deux types de rejets aigus. Le rejet aigu humoral médié par les anticorps, se caractérise par l'apparition chez le receveur d'anticorps dirigés contre les cellules du greffon. Il résulte de l'activation et la différenciation de lymphocytes B en plasmocytes (Steele et al., 1996). Comme pour le rejet hyper-aigu, ces anticorps vont induire la nécrose des tissus de la greffe, après leur fixation sur les cellules du greffon.

Le rejet aigu cellulaire médié par les lymphocytes T fait principallement intervenir la voie directe de présentation des alloantigènes aboutissant à l'activation et

la prolifération des lymphocytes T du receveur spécifiques d'alloantigènes du donneur et à l'attaque du greffon (Figure 9a.) Quel que soit le type de rejet, celui-ci est principallement diagnostiqué sur la base d'analyses histologiques de biopsies du greffon. Les statégies actuelles d'immunosupression ont permis de réduire drastiquement l'incidence du rejet aigu après transplantation ainsi que les lésions du greffon causées par celui-ci (Heeger and Dinavahi, 2012; McManigle et al., 2013).

4. Le rejet ou la dysfonction chronique

Le rejet, ou la dysfonction chronique, apparaît beaucoup plus tardivement que les rejets aigus ou hyper-aigus (Figure 8) et se caractérise par une altération lente, progressive et souvent irreversible du greffon et de sa fonction. Les mécanismes impliqués dans le rejet ou la dysfonction chronique d'allogreffe sont divers, peuvent différer en fonction du type d'organe transplanté et sont encore aujourd'hui mal connus. De plus, bien que les traitements actuels soient capables de controler la survenue de rejets aigus, ils ne sont que peu voire pas efficaces pour prévenir le developpement de la dysfonction chronique d'allogreffe.

D. Le syndrome de bronchiolite oblitérante

Dans le cadre de ma thèse je me suis particulièrement intéressé à l'identification de biomarqueurs prédictifs du syndrome de bronchiolitie oblitérante (BOS), une forme de dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire. Ainsi, je traiterais dans cette partie des connaissances concernant les mécanismes impliqués dans le développement du BOS et des enjeux actuels realtifs à sa prévention et à son traitement.

1. Le diagnostic du BOS

Après une transplantation pulmonaire, le BOS, constitue la limite principale de la survie à long terme du greffon et des patients (Weigt et al., 2013). En effet, plus de 50% des patients transplantés pulmonaires développent un BOS dans les 5 années après transplantation. Après le diagnostic du BOS la survie des patients n'est que de 3 à 5 ans (Meyer et al., 2014; Royer et al., 2016). Il constitue la forme la plus fréquente de dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire (CLAD) et met en jeu des mécanismes

d'obstruction des voies respiratoires. Le syndrome restrictif d'allogreffe pulmonaire (RAS) est l'autre forme de CLAD, il est moins commun et met en jeu des mécanismes restrictifs, c'est à dire une diminution du volume pulmonaire total et une fibrose du parenchyme pulmonaire (Figure 10).

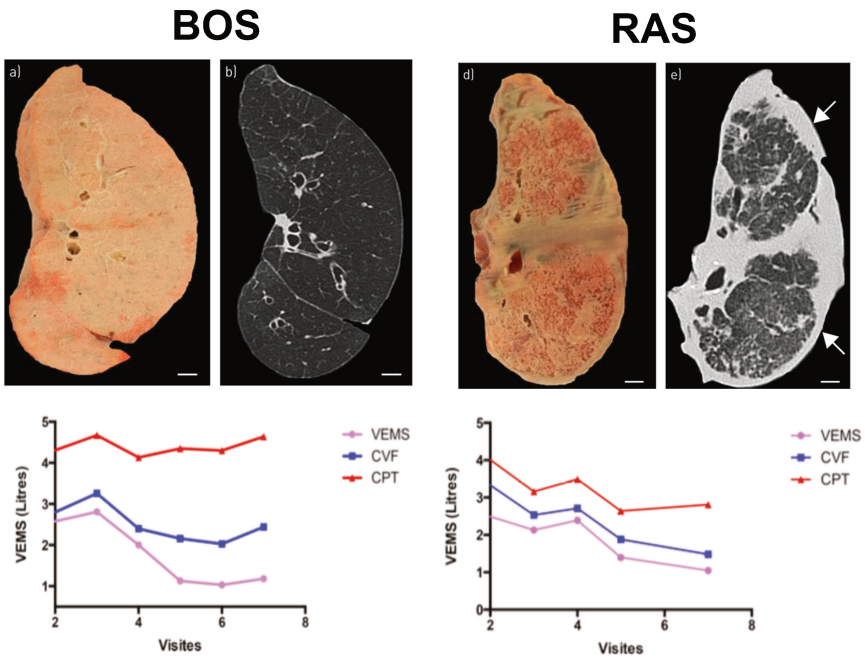


Figure 10 : Modification histologiques et de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de BOS et de RAS

Adaptée de Verleden S. et al., ERJ, 2016 ; Verleden G., et al., JHLT, 2014 ; M. Sato et al., JHLT, 2011.

Le diagnostic du BOS s'appuie principalement sur la mesure des capacités respiratoires des patients transplantés pulmonaires. En effet, le BOS est caractérisé par une diminution progressive et non-reversible du volume maximal expiré en une seconde (VEMS) sans modification de la capacité pulmonaire totale (CPT) (Figure 10).

A terme, le BOS aboutit à une insuffisance respiratoire terminale necessitant la re-transplantation des patients. Bien que de nombreuses équipes aient identifié des facteurs de risques et suspecté plusieurs mécanismes pouvant etre impliqués dans le développement du BOS, les mécanismes exacts sont encore mal connus et aucun marqueur ne permet un diagnostic précoce permettant une prise en charge rapide des patients à risque.

2. Les mécanismes impliqués dans le développement du BOS

Les études réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors du développement du BOS ont principalement mis en évidence l'implication de mécanismes immuns, inflammatoire et non-immuns ainsi que le rôle de l'épithélium bronchique dans la survenue du BOS (Verleden et al., 2016).

Bien que les lésions de l'épithélium bronchique soient considérées comme les premières manifestations physiopathologiques du développement du BOS, il semble que les cellules épithéliales bronchiques (CEB) soient elles mêmes impliquées dans ce processus pathologique. En effet, lors du développement du BOS, les lésions de l'éptihélium bronchique vont aboutir à une modification de la secrétion de cytokines et de chimiokines par les CEB résultant en la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire chez les patients atteint d'un BOS (Suwara et al., 2014). Les CEB sont aussi sujettes à la transition épithéliomésenchymateuse en réponse au TGF-ß impliqué dans la fibrose et l'obstruction des voies respiratoires des patients transplantés (Borthwick et al., 2009).

Les réponses inflammatoires locales impliquant à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative semblent aussi tenir un rôle important dans le développement du BOS. Cette hypothèse est fortement suggérée par plusieurs études ayant identifé des évenements inflammatoires post-greffe comme facteurs de risque dans le développement du BOS (Daud et al., 2007; Fiser et al., 2002; Hachem et al., 2005). De plus, les patients atteints de BOS présentent une altération du profil cytokinique, en faveur de réponses pro-inflammatoires, dans les lavages broncho-alvéolaires comparés aux patients stables (Bharat et al., 2007). Enfin, le fait que le blocage de l'IL-17 dans des modèles murins de transplantation pulmonaire orthotopique prévienne la mise en place de syndrome oblitératif renforce l'hypothèse du rôle de l'immunité adaptative dans le développement du BOS chez l'Homme (Fan et al., 2011).

3. Les facteurs de risque

Depuis sa découverte, de nombreux groupes de recherche se sont intéressés à l'identification de facteurs de risque liés au développement du BOS. L'ensemble de ces études ont permis de mettre en évidence l'aspect multifactoriel de cette pathologie. En effet, le poumon étant l'un des seuls organes transplantés ouverts vers l'extérieur, de nombreux stimuli peuvent être à l'origine de lésions de l'épithélium bronchique et participer aussi à la mise en place progressive du BOS.

C'est le cas de facteurs cliniques et environnementaux qui vont directement impacter le tissu pulmonaire et ainsi accroitre le risque de développement du BOS. D'un point de vue clinique, les risques de développer un BOS à long terme sont par exemple plus elevés chez les patients atteints initialement de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) comparés à des patients atteints de mucoviscidose (ISHLT, 2015). Il en est de même lors d'une re-transplantation pulmonaire, les patients présentent un risque de développement du BOS plus important que lors d'une première transplantation (ISHLT, 2015). Concernant l'environnement, la pollution a été identifiée comme un facteur de risque de développement de dysfonction chronique à long terme (Benmerad et al., 2017; Bhinder et al., 2014; Nawrot et al., 2011).

En regard des facteurs impactants directement l'épithélium bronchique, d'autre facteurs de risques vont, eux, participer à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire au sein de l'allogreffe pulmonaire et donc à la survenue du BOS à long terme. C'est le cas des épisodes de rejets aigus et de la dysfonction primaire du greffon post-transplantation (Daud et al., 2007; Fiser et al., 2002; Hachem et al., 2005). De plus, un risque accru de développement du BOS a aussi été mis en évidence chez des patients présentant des infections microbiennes ou virales (Gottlieb et al., 2009; Gregson et al., 2013; Snyder et al., 2010). Au dela du développement d'infections pulmonaires, chez les patients transplantés, une modification du microbiote pulmonaire semble etre associée à une modification du profil de la réponse immunitaire innée pouvant determiné le developpement à long terme d'une dysfonction chronique de l'allogreffe pulmonaire (Bernasconi et al., 2016; Mouraux et al., 2017).

Enfin, plusieurs études rapportent un lien potentiel entre la réponse humorale ainsi que les réponses auto-immunes et le développement de BOS. En effet, la présence d'anticorps spécifiques des molécules de CMH du donneur nouvellement formés (*de novo* DSA) sont fortement associées avec le developpement du BOS (Kauke et al., 2015; Koutsokera et al., 2017; Morrell et al., 2014). Cependant, cette présence de DSA chez les patients transplantés pulmonaires reflète la mise en place d'un rejet aigu médié par les anticorps (Witt et al., 2013). Ainsi, sachant que les épisodes de rejet aigus sont des facteurs de risques du BOS, le rôle exact des *de novo* DSA dans le developpement du BOS reste à démontrer. Concernant le lien entre réponses autoimmunes et BOS, il a été mis en évidence la présence d'autoanticorps spécifiques du collagène de type V et de la tubuline Ka-1 chez les patients développant un BOS après transplantation pulmonaire (Hagedorn et al., 2010; Saini et al., 2011).

4. Comment traiter le BOS ?

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été testées afin de limiter le developpement de BOS après transplantation pulmonaire, cependant les résultats restent peu statisfaisants (Benden et al., 2017). Parmi ces traitements, l'azithromycine, a permis l'inhibition de l'inflammation pulmonaire et la stabilisation de la fonction pulmonaire d'une partie des patients atteint d'un BOS, présentant une hyper-neutrophilie au sein du greffon (Corris et al., 2015). Cette découverte récente a permis l'identification d'un nouveau type de rejet chronqiue d'allogreffe pulmonaire jusque-là identifié comme BOS : la dysfonction d'allogreffe pulmonaire reversible suite au traitement à l'azythromycine (ARAD) (Verleden et al., 2014). Chez les patients présentant un BOS et ne répondant pas à l'azythromycine, le traitement par irradiation lymphocytaire totale a été proposé comme permettant la stabilisation de la fonction pulmonaire (Benden et al., 2017; Verleden et al., 2009).

D'autres stratégies ont été mises en place non pas dans le but de traiter directement le BOS mais pour limiter l'exposition des patients transplantés à différents facteurs de risques. Dans ce cadre, la déplétion des lymphocytes B, suite au traitement par le Rituximab, permet d'inhiber la production des DSA et diminue l'incidence du BOS chez les patients transplantés (Hachem et al., 2012). De la même façon, l'utilisation du Bortezomib, un inhibiteur du protéasome, contrôle la survenue de rejet aigu médié par

les anticorps (Baum et al., 2013). Le traitement des patients transplantés pulmonaire par l'alemtuzumab, anticotorps monoclonal humanisé anti-CD52, permet, lui, la déplétion massive de l'ensembles des lymphocytes circulants (Ensor et al., 2017; Hanaway et al., 2011). Cependant, cette déplétion peut aboutir chez les patients à l'acquisition d'un état d'immunosupression sévère empéchant toutes réponses à des infections par des pathogènes. L'induction de lymphocytes T régulateurs circulants par photophorèse extracorporelle (ECP) des leucocytes, constitue aussi une option thérapeutique d'intérêt. En effet, l'ECP permet chez les patients transplantés une diminution des DSA, des auto-anticorps ansi que des cytokines pro-inflammatoires (Baskaran et al., 2014).

5. Les biomarqueurs du BOS

Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à limiter les risques de survenue du BOS, mais aucune ne permet de traiter un BOS déjà mis en place. Ce constat associé au caractère irreversible du BOS a poussé de nombreuses équipes de recherche à identifier des marqueurs diagnostique et prédictifs de la survenue du BOS.

Deux compartiments principaux ont fait l'objet de recherche de biomarqueurs : le sang périphérique et l'allogreffe par analyse du lavage broncho-alvéolaire (Kennedy et al., 2013) et de biopsies, plus invasives (Tableau VI).

E. La prévention et le traitement du rejet : l'immunosuppression

Aujourd'hui, les stratégies thérapeutiques utilisées après transplantation d'organe ont principalement pour but l'inhibition de l'activation ou de la migration des lymphocytes T permettant ainsi la prévention de la survenue de rejet aigus. Ces traitements, dits immunosupresseurs, peuvent être classés en fonction de la composante de la réponse immune qu'ils ciblent.

1. L'inhibition de la prolifération celullaire

Historiquement, l'inhibition de la proliferation des lymphocytes T, via l'irridiation des patients, fut la première stratégie immunosupressive utilisée par Jean Hamburger afin

de permettre le maintien d'un greffon stable chez l'Homme. L'irradiation permettant l'induction de la mort de l'ensemble des cellules en cours de prolifération de façon non-sélective, elle n'est aujourd'hui plus utilisée dans le cadre de la transplantation pour des raisons évidentes.

Ciblant toujours la prolifération des cellules lymphocytaires T, les traitements à l'aide d'azathioprine ont permis de prolonger la survie de patients après une greffe rénale. L'azathioprine, un analogue de la purine, inhibe la synthèse d'ADN et donc la prolifération clonale des lymphocytes T lors de la réponse dirigée contre l'allogreffe (Lennard, 1992). Cependant, ce traitement ne prévenait pas efficacemment la survenue de rejets aigus.

Tableau VI : Les biomarqueurs diagnostics et prédictifs de la survenue du BOS

Biomarqueur		Compartiment	Références
Cytokines pro-inflammatoires	Diag	Greffon	(Berastegui et al., 2017; Verleden et al., 2015a)
Insulin like growth factor-1	Diag	Greffon	(Charpin et al., 2000)
Agoniste du recepteur à l'IL-1	Diag	Greffon	(Belperio et al., 2002)
HLA-G	Pred	Greffon	(Brugière et al., 2015; White et al., 2014)
Métalloprotéinases	Pred	Greffon	(Hübner et al., 2005; Smith et al., 2007)
CXCL9	Pred	Greffon	(Shino et al., 2018)
IL-12	Pred	Greffon	(Meloni et al., 2004a)
Chimiokines	Pred	Greffon	(Reynaud-Gaubert et al., 2002)
Mannose binding lectin	Diag	Périphérie / Greffon	(Budd et al., 2012)
Endothelin-1	Pred	Périphérie / Greffon	(Salama et al., 2010)
C-reactive protein	Pred	Périphérie / Greffon	(Vos et al., 2009)
Fibrocytes circulants	Diag	Périphérie	(LaPar et al., 2011)
KL-6	Diag	Périphérie	(Haberman et al., 2010; Ohshimo et al., 2011; Walter et al., 2006)
CD30 soluble	Pred/ Diag	Périphérie	(Bauwens et al., 2006; Fields et al., 2006; Golocheikine et al., 2008)
CD59 soluble	Pred / Diag	Périphérie	(Budding et al., 2016)
MicroARNs	Pred / Diag	Périphérie	(Budding et al., 2017; Carlo et al., 2016)
Cytokines pro-inflammatoires	Pred	Périphérie	(Bharat et al., 2007)
De novo DSA	Pred	Périphérie	(Morrell et al., 2014; Safavi et al., 2014)

Pred : prédicitf / Diag : diagnostic

Ainsi d'autres molécule ciblant la prolifération cellulaire ont ensuite été mises au point et utilisées en clinique. C'est le cas du mycophénolate mofetil (MMF), toujours utilisé aujourd'hui. Le MMF inhibe l'activité enzymatique de la deshydrogénase inosine monophosphate, empechant la synthèse de nucléosides guanosiques (Mathew, 1998).

De la même façon, le FK778 et le léflunomide, inhibent l'activité enzymatique de la dihydroorotate deshydrogénase, necessaire à la synthèse de nucléosides pyrimidiques (Williamson et al., 1995).

Etant donnée l'effet anti-prolifératif non selectif de l'ensemble de ces traitements, leur utilisation en clinique reste restreinte et possède des effets délétères sur les tissus à fort-renouvellement.

2. Les corticoïdes

Leur première utilisation, dans les années 1960, fut une deuxième étape importante dans l'utilisation des drogues immunosupressives après transplantation. Les corticostéroïdes agissent comme des agonistes des recepteurs des glucocorticoïdes naturels. Leurs propriétés anti-inflammatoires et immunsouppressives sont diverses et permettent d'inhiber les réponses immunes à la fois en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la migration des cellules immunitaires, leur prolifération ou encore leur fonctions effectrices (Rhen and Cidlowski, 2005). En clinique, l'utilisation des corticostéroïdes après transplantation varie de façon importante en fonction des pratiques et de l'organe transplanté (Meier-Kriesche et al., 2008). Ainsi, chez des patients à faible risque de rejet, l'arret du traitement aux corticoïdes, voire l'absence totale de traitement peut etre proposé. Néanmoins, ils sont souvent utilisés chez les patients développant des rejets aigus.

3. Le blocage de l'activation des lymphocytes T

Une des stratégies d'immunsupression les plus courantes consiste à bloquer l'activation des lymphocytes T du receveur lors de la réponse allo-immune. Dans le cadre de cette activation lymhocytaire T, les traitements immunosupresseurs peuvent agir sur les différents signaux necessaires à l'activation (Halloran, 2004) (Figure 11).

i. Le blocage du premier signal

Le premier signal est mis en place suite à la reconnaissance par le TCR du lymphocyte T naïf d'un complexe CMH/peptide. Ce premier signal est transmis via la molécule CD3 par trois voies de signalisation différentes : la voie des MAP kinases qui

activent le facteur de transcription AP-1, la voie du couple calcium calcineurine qui active NFAT et la voie de la proétine kinase C thêta qui active NF-kB (Michel et al., 2000; Rincón and Flavell, 1994). Ce signal 1 aboutit à l'expression des molécules CD40 ligand, la chaine alpha du recepteur à l'IL-2 (CD25) et à la sécrétion d'IL-2 (Figure 11).

Deux traitements immunosupresseurs sont aujourd'hui très utilisés pour bloquer la transduction du signal 1, via le blocage de la calcineurine inactive : le Tacrolimus et la Cyclosporine. En clinique ces deux traitements constituent la base de l'immunosupression au long-terme de patients transplantés. Cependant ces deux drogues possèdent de nombreux effets délétères, et ne peuvent pas être administrées à des doses élevées (Thervet et al., 2011).

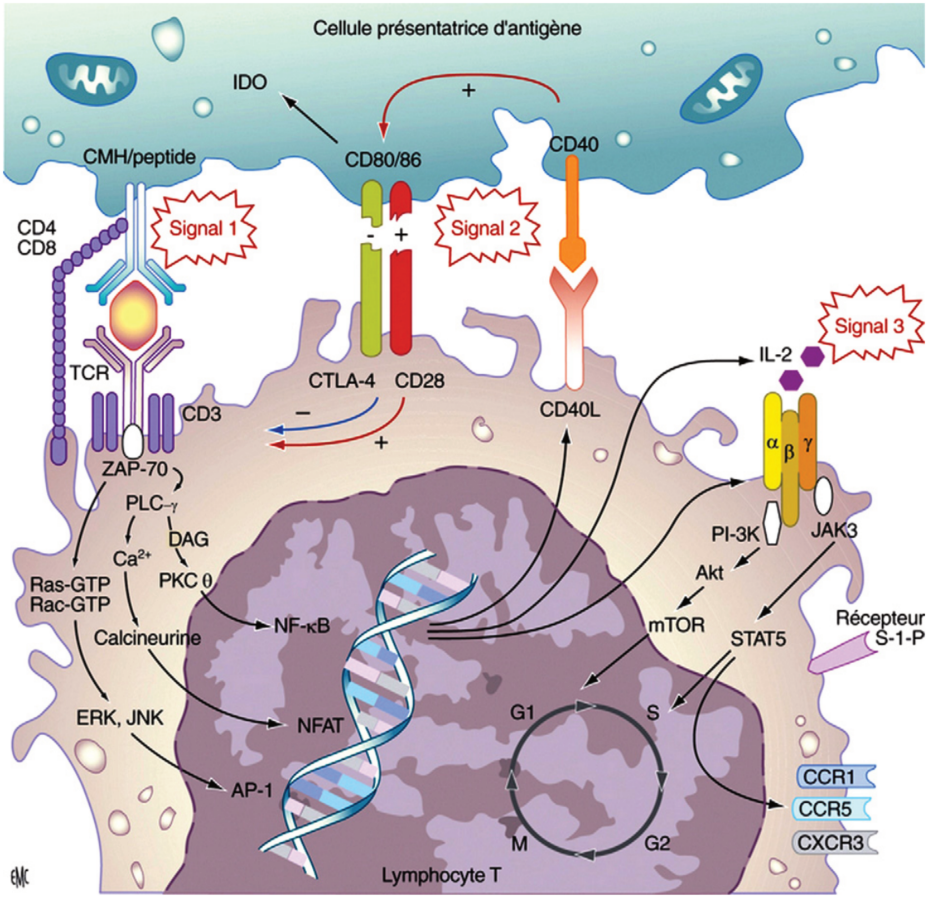


Figure 11 : Les différentes étapes de l'activation lymphocytaire T

i. Le blocage du deuxième signal

Le deuxième signal consiste en l'engagement des molécules de co-stimulation CD40 ligand et CD28. Il permet de renforcer le signal 1 et aboutit à une plus forte expression de CD25 et une sécrétion plus importante d'IL-2 (Figure 11).

Le blocage du deuxième signal, impliqué dans l'activation lymphocytaire T, cible les signaux de co-stimulation. Actuellement en clinique, le Belatacept, une protéine de fusion présentant le domaine de liaison extracellulaire de CTLA-4 avec la partie constante d'une IgG1 humaine, est utilisée pour rentrer en compétition avec CD28 dans la fixation à la molécule CD80/86 (Salomon and Bluestone, 2001). En l'absence du signal 2, les lymphocytes T ne peuvent etre activés et deviennent anergiques. Cette stratégie d'immunosupression est d'autant plus interessante puisqu'elle qu'elle présente peu d'effets délétères à long terme (Larsen et al., 2005; Thervet et al., 2011).

i. Le blocage du troisième signal

Le troisième signal est induit par la fixation l'IL-2 dont la sécrétion a été renforcée par les signaux 1 et 2 sur son recepteur, la molécule CD25. Ce dernier signal permet la prolifération cellulaire, l'expression de gènes anti-apoptotiques et une augmentation de la secrétion de cytokines et chimiokines. Trois voies de signalisation sont impliquées dans ce troisième signal : une voie des MAP-kinases, une voie JAK3 / STAT5 et une voie PI-3K impliquant mTOR (Figure 11).

Différentes stratégies sont actuellement utilisées pour bloquer le troisième signal de l'activation lymphocytaire T : (i) l'utilisation d'anticorps ciblant la molécule CD25 (Basiliximab et Daclizumab) (ii) l'administration d'inhibiteurs de mTOR (la Cyclospirine et la Rapamycine) inhibant ainsi la voie de signalisation PI-3K et (iii) l'injection d'inhibiteurs de JAK3 inhibant la voie JAK3/STAT5. Ce blocage du signal 3 va alors inhiber la sécrétion cytokinqiue ainsi que la prolifération des lymphocytes T activés (Thervet et al., 2011; Vincenti et al., 2006).

4. La déplétion lymphocytaire

Plusieurs anticorps sont actuellement utilisés dans le but, non plus de moduler les réponses immunes dirigées contre l'allogreffe, mais de dépléter les sous-populations immunitaires impliquées dans les phénomènes de rejet.

C'est le cas des anticorps mono-clonaux anti-CD3, qui ont été les premiers à être utilisés en clinique chez l'Homme (Cosimi et al., 1981). Ces anticoprs vont se fixer sur la molécule CD3 des lymphocytes T ciculants empéchant d'une part l'intéraction TCR CMH/peptide et aboutissant à la déplétion des lymphocytes T. Cependant, son utilisation, pouvant etre à l'origine de complications importantes dues au relargage de cytokines dans le sang, est aujou'd'hui limitée au traitement d'épisodes sévères de rejets.

L'alemtuzumab est un anticotorps monoclonal humanisé anti-CD52, une molécule exprimée par l'emsemble des populations lymphocytaires périphériques, il permet la déplétion massive de l'ensembles des lymphocytes circulants (Hanaway et al., 2011). Cependant, cette déplétion peut aboutir chez les patients à l'acquisition d'un état d'immunosupression sévère empéchant toutes réponses à des infections par des pathogènes.

Enfin le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20 qui va induire la déplétion des lymphocytes B, principallement utilisé pour traiter les épisodes de rejet à composante humorale (Faguer et al., 2007).

5. Le blocage de la migration des cellules effectrices

La migration des lymphocytes T vers la périphérie peut etre modulée par la molécule FTY720. Cette drogue, présentant une haute affinité pour le récepteur 1 à la sphigosine-1 phosphate (S1P1) (Brinkmann et al., 2004) va provoquer son internalisation, empéchant ainsi les lymphocytes T de quitter les organes lymphoïdes (Pinschewer et al., 2000). Cependant, son utilisation est faible car son administration entraine des complications rétiniennes.

6. Les effets délétères de l'immunosupression à long terme

Les progrès effectués ces dernièrers décennies à la fois dans la compatibilité donneur/receveur et dans les startégies d'immunsoupression des patients transplantés ont permis une augmentation très importante de la survie du greffon à court et moyen terme. En effet, aujourd'hui, la prévalence de rejets hyperaigus est très faible et la survenue de rejets aigus est contrôlée par les traitements immunosuppresseurs. Néanmoins, ces traitements, necessaires à l'inhibition de la réponse allo-immune, présentent de nombreux effets délétères. En effet, l'immunosupression d'un patient n'est pas sans risque et augmente sa susceptibilité aux infections virales (Bohl and Brennan, 2007) ainsi qu'au développement de cancers (Dantal and Soulillou, 2005). De plus, ces traitements sont à l'origine de perturbations métaboliques dont le diabiète pouvant aboutir au développement de pathologies cardiovasculaires (Heisel et al., 2004; Neale and Smith, 2015). Enfin, les inhibiteurs de la calcineurine, pierre angulaire des stratégies d'immunosupression actuelles, présentent une toxicité pour le rein (Jacquet et al., 2008; Nankivell et al., 2003). Ainsi, à long terme, leur utilisation peut aboutir à une dysfonction terminale du rein. Ces observations ont poussé de nombreux groupe de recherche à mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but de diminuer l'administration des traitement immunosupresseurs et donc diminuer leurs effets délétères.

F. La tolérance en transplantation : l'objectif ultime

L'induction d'une tolérance envers leur greffon chez les patients transplantés constitue aujourd'hui un objectif ultime en translantation. Historiquement, cet état de tolérance a été décrit et définit chez la souris pour la première fois en 1953 par Medawar, Brent et Billingham (Billingham et al., 1953) comme l'absence de réaction immune vis-à-vis des alloantigènes du greffon par le système immunitaire de l'hôte tout en conservant une réponse immune dirigée contre des antigènes étrangers. En effet, la mise en place d'un état de tolérance chez ces patients permettrait d'une part de maintenir un greffon fonctionel stable en absence de toute immunosupression leur permettant de répondre contre des antigènes étrangers et d'autre part de prévenir théoriquement la survenue de rejet chronique.

1. L'induction de tolérance en transplantation

Depuis cette première description, de nombreuses études ont été réalisées chez le petit animal ainsi que chez le primate non-humain afin d'indentifer un protocole d'induction de tolérance applicable en clinique chez l'Homme. Ces études se sont d'abord basées sur l'exploitation des mécanismes physiologiques de tolérance immunitaire chez l'Homme à savoir la tolérance centrale. L'idée étant de reprogrammer le système immunitaire afin que les lymphocytes T alloréactifs soit sujets à la délétion clonale. Cependant, il existe chez l'Homme un phénomène dit de tolérance opérationelle principallement retrouvé après transplantation rénale ou hépatique. Cette tolérance opérationnelle se définit par le maintien d'un greffon présentant une fonction stable, en l'absence de traitement immunosupresseurs chez des individus immunocompétents. Les études réalisées chez ces patients opérationellement tolérants ont montrés l'immunocompétence de ces patients suite à une immunisation au vaccin contre la grippe (Ballet et al., 2006) et suggèrent l'implication de mécanismes de tolérance périphérique, à savoir, une proportion acrrue de lymphocytes T et B régulateurs circulants, ainsi qu'une réponse immune diminuée des lymphocytes T conventionnels (Braza et al., 2015c; Brouard et al., 2005; Chesneau et al., 2015b; Louis et al., 2006).

Ainsi, aujourd'hui, les essais s'appuient à la fois sur les mécanismes de tolérance centrale et de tolérance périphérique pour induire une tolérance à l'allogreffe après transplantation. A ce jour, trois stratégies thérapeutiques sont principallement utilisées pour des essais d'induction de tolérance (Scalea et al., 2016) : (i) l'associtaion d'une greffe de cellules hématopoïétiques du donneur lors de la transplantation d'organe dans le but d'induire un chimérisme immunitaire chez le receveur (Kawai et al., 2014; Leventhal et al., 2012; Oura et al., 2017; Scandling et al., 2008; Sykes, 2017), (ii) l'utilisation des Tregs lors de la transplantation dans le but de moduler la réponse diriger contre l'allogreffe (Kawai et al., 2017; Whitehouse et al., 2017b), (iii) l'injection de cellules stromales mésenchymateuses, elles aussi capables de moduler l'immunité du patient receveur et de permettre l'établissement d'une balance pro-tolérogénique Tregs/lymphocytes T conventionels (Casiraghi et al., 2017; Franquesa et al., 2013).

Malgrés les résultats prometteurs de ces premiers essais, l'induction de tolérance après transplantation présente des risques et son application en routine clinique n'est pas encore envisageable (Scalea et al., 2016).

2. La tolérance opérationnelle après transplantation rénale

En regard des protocoles d'induction de tolérance lors de la transplantation, plusieurs études ont mis en évidence l'acquisition d'une tolérance opérationelle chez des patients transplantés en absence de traitement immunsosupresseur. Cet etat, mis en place spontanément, n'a été observé qu'après une transplantation hépatique chez 20 à 25% des patient et plus rarement après une transplantation rénale (Alex Bishop et al., 2012; Brouard et al., 2012; Liu et al., 2013; Massart et al., 2016; Sánchez-Fueyo and Strom, 2011). Cette observation suggère que tous les organes ne sont pas égaux devant ce phénomène (Madariaga et al., 2015). Cependant, quelques cas anecdotiques ont été décrit après une transplantation pulmonaire ou cardiaque (Chandrasekharan et al., 2013).

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressé à la tolérance opérationelle après transplantation rénale. Cet état de tolérance est observé chez une très faible proportion de patients. À ce jours, moins de 100 patients ont été identifés en Europe (Massart et al., 2016). Chez ces patients, l'accès à une biopsie n'est que rarement possible, ainsi, la tolérance est definie à l'aide de marqueurs non-invasifs, à savoir, une créatinémie stable et inférieure à 150 µmol/L et une protéinurie stable et inférieure à 1 g/24heures pendant plus d'un an après l'arret de leur traitement immunosupresseur (Brouard et al., 2012). Ces deux paramètres attestent d'une fonction stable de l'allogreffe rénale malgré l'absence de traitements. Après transplantation rénale, l'arrêt des traitements immunosupresseurs n'est pas réalisé dans le cadre d'un protocole de sevrage. Dans la majorité des cas les traitements immunosupresseurs ont été stoppés pour cause de non-compliance ou sur décision médicale pour pallier à leur effets délétères et à leur toxicité à long terme (Ashton-Chess et al., 2006; Roussey-Kesler et al., 2006). En effet, la survenue d'infections virales pouvant aboutir au développement de pathologies lymphoprolifératives post-transplantation necessite l'arret de l'immunosupression, empechant tout réaction immune de l'hôte contre le virus (Dantal and Soulillou, 2005).

Depuis l'identification de ces patients opérationellement tolérants, deux axes de recherche majeurs se sont développés autour de la tolérance opérationelle après transplantation rénale. Tout d'abord, l'existance de ces patients soulève la question de la proportion de patients traités ayant eux aussi les capacités de maintenir un greffon stable en absence de traitement. L'identification de biomarqueurs de la tolérance permetrait d'identifier ces patients et, à plus long-terme, de mettre en place des stratégies de minimisation des immunosupresseurs chez les patients présenant un profil clinique, immunitaire, ou transcriptomique semblable à celui des patients opérationellement tolérants (Braud et al., 2008; Brouard et al., 2007; Danger et al., 2016, 2017; Londoño et al., 2012; Naesens and Sarwal, 2010). Ensuite, ces patients réprésentent une opportunité unique d'étudier les mécanismes impliqués dans l'acquisition spontanée d'un état de tolérance à l'allogreffe après arrêt des traitement immunosupresseurs

Dans ce cadre, plusieurs études ont mis en évidence différentes modifications des compartiments lymphocytaires T et B circulants chez les patients tolérants comparés à des volontaires sains et d'autres patients transplantés présentant une fonction stable, et, ou des patients présentant un rejet chronique ou aigu de l'allogreffe rénale. Une première étude publiée en 2005, a mis en évidence chez ces patients tolérants une altération de la distribution de la taille des domaines hypervariables 3 (CDR3) de la chaîne alpha du TCR des lymphocytes T circulants (Brouard et al., 2005), ainsi qu'une présence faible de transcrits codants pour des cytokines Th1 et Th2 chez les lymphocytes T dont le repertoire du TCR est altéré chez les patients tolérants (Brouard et al., 2005). Les résultats de cette étude suggèrent donc une réponse immune diminuée chez les patients transplantés rénaux opérationellement tolérants. Cette première observation fut retrouvée dans deux études par analyse transcriptomique des cellules mononuclées du sang périphérique de différents groupes de patients transplantés rénaux (Braud et al., 2008; Brouard et al., 2007). En effet, une diminution des transcrits codant pour des marqueurs de l'activation lymphocytaire T, pour des molécules impliquées dans la cytotoxicité et pour des molécules caractérisant les réponses pro-inflammatoires Th1 et Th2 a été identifé chez les patients tolérants comparés a des patients stables sous traitements et des patients présentant un rejet

aigu d'allogreffe rénale (Brouard et al., 2007). Dans ce cadre, Becker et al., en 2012, ont démontré un infiltrat cellulaire dans le greffon équivalent chez des patients tolérants, des patients présentant un rejet interstitiel et des patients stables sous traitement (Becker et al., 2012).

Plus récemment, les résultats de l'étude de Chenouard et al., ont mis en évidence un défaut de lymphocytes T helper folliculaires (Tfh) circulants chez les patients tolérants (Chenouard et al., 2016). Comparés aux patients stables sous traitements, les patients tolérants présentent une plus faible proportion des Tfh et une diminution de leur fonction helper se traduisant par un défaut de secrétion d'IL-21 et un défaut d'induction de la secrétion d'IgG par les lymphocytes B naïfs (Chenouard et al., 2016). Ces résultats pourrait potentiellement expliquer la modification du profil lymphocytaire B identifiée chez ces patients tolérants (Chesneau et al., 2014; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010). En effet, en 2014, Chesneau et al., ont montré un défaut de la maturation des lymhocytes B circulants chez les patients tolérants comparés à des patients stables sous traitement (Chesneau et al., 2014).

L'altération du profil d'activation lymphocytaire T ou de maturation de lymphocytes B ne sont pas les seuls résultats pouvant potentiellement expliquer l'état de tolérance immune mis en place spontanément chez ces patients transplantés. En effet, plusieurs groupes de recherche ont identifiés chez ces patients un rôle potentiels des cellules lymphocytaire présentant des capacités régulatrices. Ces études rapportent à la fois un profil pro-B régulateurs (Chesneau et al., 2015b; Chong and Sciammas, 2011; Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010) mais aussi une proportion accrue de lymphocytes T régulateurs (Becker et al., 2012; Braza et al., 2015c; Brouard et al., 2007; Louis et al., 2006; Moraes-Vieira et al., 2012) pouvant être impliqués dans les mécanismes à l'origine de l'état de tolérance opérationelle.

Ayant plus particulièrement travaillé sur les mécanismes d'actions des lymphocytes Tregs dans le cadre de la tolérance opérationnelle après transplantation rénale, je traiterais dans la partie suivante de l'implication de ces Tregs à la fois dans la transplantation rénale et plus particulièrement dans la tolérance opérationelle sous la

forme d'une revue « Regulatory T cells in kidney Transplantation: New Directions ? » publiée en 2015.

3. Les lymphocytes T régulateurs, transplantation rénale et tolérance opérationelle – REVUE N°1

REVUE N°1

Lymphocytes T régulateurs en transplantation rénale : nouvelles directions ?

Regulatory T cells in kidney Transplantation: New Directions ?

F. Braza, M. Durand, N. Degauque, S. Brouard

(Revue publiée dans American Journal of Transplantation, e-Pub Juillet 2015)

La contribution des cellules T régulatrices (Tregs) dans le maintien de la survie des greffons rénaux est d'un intérêt majeur. Bien que de nombreux modèles expérimentaux suggèrent leur rôle dans l'induction de tolérance, la reproduction de ces résultats en clinique est moins claire. Alors que la modulation des reponses Tregs est un concept thérapeutique prometteur en transplantation, une meilleure compréhension de leur fonction, leur phénotype et de leurs mecanismes d'action est nécessaire pour pouvoir exploiter de manière optimale ces cellules afin d'induire une tolérance à l'allogreffe rénale. Dans cet esprit, nous rapportons ici la compréhension actuelle de la délimitation phénotype/fonction des Tregs et de la manière dont les Treg peuvent contribuer à la survie du greffon. Nous soulignons leur rôle potentiel dans la survie à long terme et dans la tolérance opérationnelle d'allogreffes renales. Nous discutons également des mécanismes nécessaires au développement des cellules T régulatrices: de la combinaison de partenaires moléculaires de FOXP3, des modifications épigénétiques, métaboliques et post-traductionnelles qui sont nécessaires pour générer des cellules T régulatrices fonctionnelles et stables. Nous discutons enfin de comment une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la survie des greffons rénaux.

American Journal of Transplantation 2015; 15: 2288–2300
Wiley Periodicals Inc.

© Copyright 2015 The American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/ajt.13395

Comprehensive Review

Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions?

F. Braza[1,2,3], M. Durand[1,2,3], N. Degauque[2,3] and S. Brouard[2,3,*]

[1]*Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F-44035, France*
[2]*INSERM, UMR 1064, Nantes F-44093, France*
[3]*CHU de Nantes, ITUN, Nantes F-44093, France*
[*]*Corresponding author: Sophie Brouard,*

The contribution of regulatory T cells in the maintenance of kidney graft survival is of major interest. Although many experimental models suggest a role in the induction of graft tolerance, reproducing these findings in clinic is less clear. While modulation of the regulatory T cell response is a promising therapeutic concept in transplantation, a better understanding of function, phenotype and biology is needed to be able to optimally exploit these cells in order to induce graft tolerance. With this in mind, we review here the current understanding of the phenotypic-functional delineation of Tregs and how Tregs can contribute to graft survival. We highlight their potential role in long-term graft survival and kidney operational tolerance. We also discuss the mechanisms needed for the molecular development of regulatory T cells: A combination of FOXP3 molecular partners, epigenetic, metabolic, and posttranslational modifications are necessary to generate well-functioning regulatory T cells and maintain their core identify. We discuss how an improved understanding of these mechanisms will permit the identification of new potent therapeutic strategies to improve kidney graft survival.

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; CNI, calcineurin inhibitors; CNS2, noncoding DNA sequence 2 of FOXP3; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4; eGFR, estimated glomerular filtration rate; FOXP3, forkhead box P3; GITR, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor; ITP, inhibitors of the mTOR pathway; Lag3, lymphocyte-activation gene 3; SCR, subclinical signs of rejection; TGF-ß, transforming grow factor beta; TIM-1, T cell immunoglobulin and mucin domain 1; TSDR, Treg-specific demethylated region

Received 09 March 2015, revised 03 May 2015 and accepted for publication 24 May 2015

Introduction

The initial description of suppressor T cells in the 1970s (1) was confirmed in the 1990s with the identification of a distinct $CD4^+$ $CD25^+$ T cell subset able to regulate inflammatory immune responses (2,3). This regulatory T cell subpopulation was later characterized by the expres- sion of FOXP3, a central transcription factor necessary for their survival and suppressive function (4–6). $FOXP3^+$ regulatory T cells (Tregs) were first evidenced in the control of autoimmunity. Mutational inactivation of the human gene FOXP3 causes the development of fatal autoimmune dysfunction (7). Beyond their role in the control of autoimmunity, many studies in rodents have now demonstrated the ability of Tregs to control peripheral inflammation toward nonself antigens, and notably alloantigens, giving evidence for their role in the establishment of transplanted organ tolerance (8–11). These findings, largely derived from rodent models, have provided new hope for the induction of allograft tolerance (12). However, although modulation of the Treg response remains a promising therapeutic concept in clinical transplantation, it presents many challenges as their function, phenotype and biology need to be more precisely defined. Recent studies have shown that human FOXP3-expressing T cells are not homogeneous in gene expression, phenotype, and suppressive function (13–16). The suppressive arsenal of Tregs is extremely varied and includes distinct cellular mechanisms such as production of suppressive cytokines, expression of inhibitory molecules and metabolite consumption (17). The recent identification of Tregs able to express T-helper–associated transcription factors and to secrete pro-inflammatory cytokines, raises the question of their heterogeneity and stability, under chronic inflammation or immunosuppressive therapy (16,18). Many studies on both rodents and humans have demonstrated (i) the ability of Tregs to switch to a pro-inflammatory phenotype under chronic inflammation (19) and (ii) the strong deleteri- ous or promoting effect of suppressive reagents on Treg stability (20,21). Consequently, understanding molecular mechanisms favoring or altering Treg lineage would enable us to modulate them in order to induce graft tolerance. In fact, it is now clear that FOXP3 does not function alone and that other molecular mechanisms such as DNA epigenetic modifications (13,22–25) and expression of additional transcription factors (26–28) are required to induce highly stable, functional Tregs.

In kidney transplantation, several studies have shown a positive correlation between the presence of Tregs and good clinical outcomes (29,30) but without fundamental insight into their phenotype, function and molecular profile. Consequently, we propose to give a comprehensive review of current knowledge of the biology of Tregs. We will present and discuss recent data concerning the phenotypic-functional delineation of Tregs and how Tregs can contribute to graft tolerance. We will give an update on the stability and heterogeneity of Tregs and discuss the molecular mechanisms necessary for the Treg lineage to function.

Identification of human FOXP3 regulatory T cells

The phenotypic identification of human Tregs has improved greatly in recent decades. From the initial study using solely the intensity of CD25 expression to identify $CD4^+CD25^{hi}$ regulatory T cells, the expression of transcription factor FOXP3 has been extensively used to identify and quantify these cells in many pathological situations (31). The absence of cell surface expression of IL-7 receptor (CD127) on $CD4^+$ Tregs allowed the purification of a T cell subset expressing high levels of Foxp3 T cells and thus to test their *in vitro* suppressive functions (32). Up to now the combined use of CD127, CD25 and FOXP3 has been a standard strategy to quantify and purify human circulating Tregs (33). However, the extensive use of FOXP3 has been challenged since nonregulatory FOXP3- expressing $CD4^+$ T cells are not able to suppress T cell activation *in vitro*, produce inflammatory cytokines after activation, and are thus similar to some activated effectors T cells (13).

The expression of differentiation markers for naive (CD45RA) and memory (CD45RO) T cells has been more recently investigated and two FOXP3-expressing T cell populations have been identified (13,15,34): one $CD45RA^+$ $CD45RO^-$ $Foxp3^+$ $CD25^+$ $CD127^{lo}$ population called naïve Treg (nTreg) and a second, $CD45RA^-$ $CD45RO^+$ $Foxp3^{hi}$ $CD25^{hi}$ $CD127^{lo}$ named memory Treg (mTreg) (13,15,34). Both are anergic, suppressive and display a complete demethylation of the noncoding DNA sequence 2 of FOXP3 (CNS2, also known as « TSDR » for Treg-specific demethylated region) (13).

The nTreg are characterized by a resting phenotype with a weak expression of Treg effector molecules (CTLA4, Lag3, GITR, IL-10, IL-35, granzyme-B) when compared to mTregs (14,34). They are also suspected of being recent thymic emigrants characterized by a high expression of CD31 (34) and the Helios, a marker described as essentially expressed by thymus-derived Tregs (34,35). Consistent with this, a recent comparative phenotypic and functional characterization of human $Helios^-$ and $Helios^+$ $Foxp3^+$ mTregs supports the idea that $Helios^-$ mTregs include peripherally induced Tregs, whereas $Helios^+Foxp3^+$ mTregs correspond to thymus-derived Tregs (36). Although these cells are suppressive they display some instability as they are able to produce IFN-y and IL-17 after *in vitro* activation (36). Most interestingly, they upregulate the IL-1R involved in the differentiation of human T_H17 cells (36). The IL-1R signaling pathway alters the suppressive function of $Helios^-$ mTregs, whereas it has no effect on $Helios^+$ mTregs (36). This observation evidences the utility of Helios as a marker to identify stable Tregs and probably thymus-derived Tregs in human.

Once activated, nTregs differentiate into $CD45RO^+$ mTregs and upregulate the expression of many Treg effector molecules (13,14) such as CD27 (37), CD39, CTLA4, GITR, Lag3 (14,38), and HLA-DR (39,40). The localization of nTregs and mTregs also differs as mTregs can be located in nonlymphoid tissues, suggesting a role for these cells in the regulation of tissue-localized immune responses (41). An significant enrichment of mTregs in the skin of healthy individuals has been reported (37), with a terminally differentiated-activated phenotype and a complete demethylation of TSDR supporting their full functionality (37). The coordinated expression of FOXP3 and Th-specific transcriptional factors, such as T-bet GATA-3 RORgt and Bcl6, has been shown to enable site-specific suppres- sive Tregs to efficiently regulate the $T_H1/T_H2/T_H17/T_{FH}$ cells (18,42).

It is now well-established that human Tregs can be divided into several subsets depending on their differentiation/ activation state and their location, but further analysis and investigation are clearly needed to find more specific markers to accurately identify human Treg subsets (31,41 (1); Figure 1).

Tregs in long-term graft survival: What the clinic says

Given their functional role in immune regulation, regulatory T cells rapidly captured attention in the field of organ transplantation. Several studies in rodents clearly demonstrated the role of Tregs in the prevention of graft rejection and the induction and maintenance of allograft tolerance (9–11). In clinic, the role of Tregs is less clear and essentially relies on correlation studies. In human renal transplantation, increased numbers of intra-graft $FOXP3^+$ Treg cells has been suggested as being important for predicting a favorable graft outcome in stable patients under immunosuppressive therapy (29,30,43–45). The presence of intragraft FOXP3 expressing T cells has been associated with a better graft outcome in stable recipients with subclinical signs of rejection (SCR) (29). Indeed, presence of FOXP3-expressing T cells distinguished harmless from deleterious infiltrates, evidenced by predicting better graft function 2 and 3 years post–kidney transplantation (29). In addition, an increased $FOXP3^+$ Treg/$CD3^+$ T cell ratio is positively correlated to kidney graft function 2 years after transplantation in stable patients with SCR (29). Interestingly, the presence of Tregs in the graft was associated with a overall donor-specific hyporesponsiveness of T cells

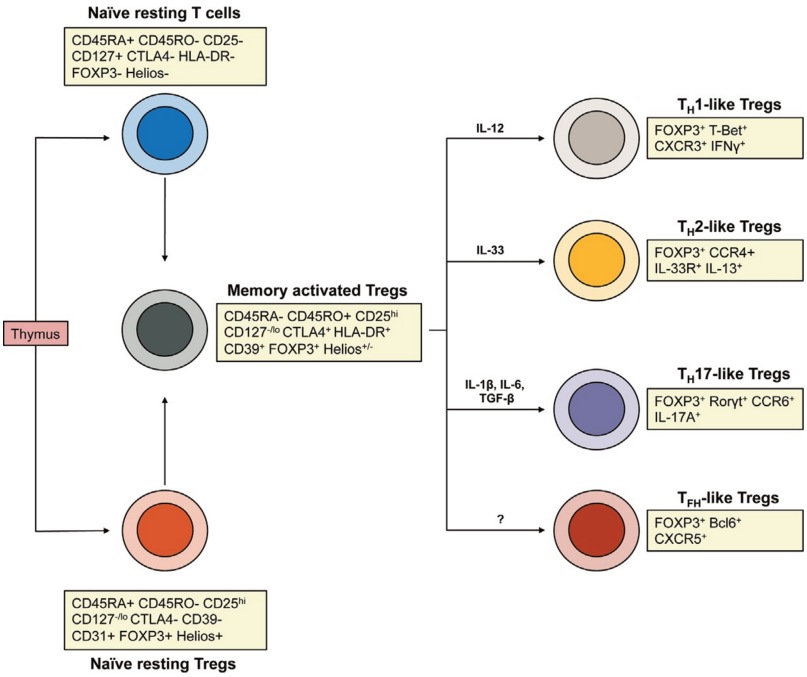


Figure 1: Identification of human regulatory T cell subset. Activated memory Tregs arise from thymic-derived natural Tregs or peripherally induced Tregs. Helios has been proposed as a marker to distinguish natural from peripherally induced Tregs. Recently, a functional specialization of Tregs has been described. Tregs can express distinct transcription factors, chemokine receptor to specifically inhibit T_H1, T_H2, T_H17, or T_{FH} responses.

toward alloantigens and expansion of peripheral $CD25^{hi}$ $Foxp3^{hi}$ Tregs in SCR patients (45). Supporting this finding, an increase in circulating $HLA\text{-}DR^+$ mTregs is associated with better outcome in stable recipients (40).

In contrast, other evidence from clinical studies demonstrates that (i) expression of FOXP3 in blood and graft is not sufficient to distinguish rejecting from nonrejecting patients (46), (ii) that $FOXP3^+$ cells can also be an inherent component of acute allograft rejection (47,48), and (iii) that the blood expression of FOXP3 may vary with time post-transplant and patient age and does not correlate with rejection/nonrejection (46). Assuming the accurate design of the study to take into account the time posttransplanta- tion, two things could explain these distinct results: First, acute rejection promotes a completely different immuno- logical environment that probably modulates Treg cells. If this is true, investigating the ratio between effector and regulatory cells has been suggested to more accurately distinguish rejecting from nonrejecting recipients (43,46). Indeed, the intra-graft expression ratio of granzyme-B and $FOXP3^+$ can distinguish renal allograft borderline change from acute rejection (43,46). The second explanation is more speculative. Are intra-graft $FOXP3^+$ T cells ''true'' Tregs? Indeed, we know that expression of FOXP3 alone is not sufficient to identify them as such as inflammatory activated T cells transiently express FOXP3 (49). A recent study demonstrated the possibilty of enumerating Tregs by evaluating the percentage of T cells with demethylated $FOXP3^+$ by quantitative PCR (50) as the demethylation of TSDR has been shown to be a major molecular mechanism for the acquisition of regulatory function (22,25). This approach demonstrates that SCR patients with intra-graft FOXP3 demethylation displayed a better graft function 5 years after transplantation (30). This evidences a protective role for Tregs and suggests their powerful function in the maintenance of a well-functioning graft.

Another important aspect of Tregs in human kidney transplantation is the influence of immunosuppressive treatment. An increase or decrease in circulating/intragraft Tregs could be the consequence of certain suppressive therapies (51). A number of studies on the effects of immunosuppressive drugs on Tregs have been carried out, but they provided conflicting results, notably in the case of calcineurin inhibitors (CNI) (51,52). Some experiments have shown the negative effects of CNI on the expression of FOXP3, on its demethylation and on the suppressive functions of Tregs in transplant recipients (51,53). In contrast, a recent report demonstrated that grafted recipients with CNI blood levels inferior to 3.6 ng/mL have functional Tregs, whereas patients with higher CNI blood levels have impaired Treg suppressive functions (53). It seems that these discrepancies may be due to different dose-dependent effects of the drugs. The question of dose is of particular interest and will have to be addressed in clinic. Recently, published *in vitro* studies reported an enhancement of Treg function using clinically relevant doses of CNI (52). Similar observations are found in clinical kidney transplantation when statistical analysis focuses only on patients treated with CNI (30). Indeed, CNI-treated patients with high levels of intra-graft $Foxp3^+$ Treg cells also display better graft function than those without at 4 and 5 years after transplantation contradicting the

accepted hypothesis that CNIs exert deleterious effects on Tregs (30). In contrast to CNI, inhibitors of the mTOR pathway (ITPs) are well-established pro-Treg factors (20,52,54,55). ITPs can increase and stabilize Treg phenotype and suppressive functions notably by maintaining a complete demethylation of FOXP3 (56). Given this, ITPs could be used as adjunctive therapy to enhance the ability of human Tregs to prevent transplant rejection (55). In line with the protolerogenic effect of ITPs, strong positive correlations were found in clinic between the use of ITPs, the stability of kidney graft function and the presence of Tregs (29,53). Understanding the impact of immunosup- pressive drugs on the function and generation of Tregs is an important step in the successful clinical implementation of Treg therapies.

Regulatory T cells in kidney operational tolerance and induced tolerance

In recent decades, there have been many studies describing the existence of subgroups of patients who naturally tolerate their allograft without the use of suppressive therapy (57–60). These patients are called operationally tolerant and provide a unique opportunity to study the immune mechanisms involved in allograft tolerance. In kidney transplantation, although tolerants are clinically very heterogeneous (58) previous studies have shed light on a common, specific, transcriptomic and cellular pattern (61). Notably, an immune quiescent profile was found (62) to be associated with a specific B cell (59,60,63,64) and Treg signature (15,59,62,65). The B cell biological pattern of tolerant patients is characterized by a higher number of naïve and immature B cells, a lower frequency of plasma cells and a preserved regulatory B cell compartment (59,63,66,67). Concerning Tregs, transcriptomic studies in operationally tolerant patients reveal overexpression of several genes involved in the regulatory function of Tregs (15,62). Recently, an extensive characterization of circulating Tregs in tolerant recipients demonstrated that the percentage of circulating $CD4^+$ T cells with demethy- lated FOXP3 was higher in tolerant recipients compared to stable recipients undergoing immunosuppression, healthy volunteers and patients under chronic rejection (15). This is consistent with previous reports demonstrating higher frequencies of circulating Tregs in tolerant patients (68,69). Interestingly, an increase in mTregs was found uniquely in operationally tolerant patients compared to other transplant recipients and healthy donors. In addition, mTregs of tolerant patients exhibit increased Foxp3 TSDR demethylation, express higher levels of CD39 and GITR, and have greater suppressive properties than mTregs from stable patients or those suffering from chronic rejection (15). Additionally the finding that FOXP3/HLA-DR expressing T cells infiltrate the kidney grafts of tolerant recipients suggests a central role for mTregs in long-term graft survival (70). In contrast with these results, data obtained from biopsies of operationally tolerant patients shows an absence of cellular infiltrate (71). However, given the difficulty in obtaining biopsies from tolerated graft for obvious ethical reasons, confirmation of these findings in larger cohort will be difficult. As an alternative solution, urine could be an interesting compartment for the study of local Treg responses in kidney transplantation. Although an overexpression of FOXP3 has been found in the urine of tolerant patients compared to stable recipients and healthy individuals (59), it would be interesting to investi- gate not only the expression but also the demethylated status of FOXP3 to accurately quantify urine Tregs in transplanted recipients. Another possibility, however, would be that operational tolerance could be an active peripheral mechanism, which would eplain the identification of such a peripheral biomarker specific for kidney transplant tolerance (59,60,62,64,72)

Many reports, both old and more recent, have demonstrated the therapeutic benefit of combining kidney and hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from the same donor to induce mixed-chimerism and graft toler- ance (12). The most recent attempts demonstrate an ability to induce kidney graft tolerance over several years (73,74). Although initial hypotheses suggested that mixed chimerism would be a critical mechanism for inducing tolerance, in particular by re-educating the immune system of the host, many induced-tolerance patients lost donor chime- rism but maintained a well-functioning graft in the absence of immunosuppression (73,74). Initially, studies showed an increase in the expression of FOXP3 in the graft of induced-tolerance recipients, suggesting a role for Tregs in these situations. Recent results have consistently demonstrated that these patients are characterized by donor-unresponsiveness and an increased circulation of $CD25^{hi}$ $CD127^{lo}$ $FOXP3^+$ Tregs (75). Recently, the introduction of a new protocol for mixed chimerism has given new hope of inducing kidney graft tolerance in patients (76,77). Based on experimental models, the studies demonstrate that combined kidney and stem cell transplantation using an engineered cellular product enriched in hematopoietic stem cells and tolerogenic graft facilitating cells was able to promote graft tolerance in mice by increasing Tregs. A role for plasmacytoid dendritic cells in the induction of Tregs has also been reported (78). The clinical translation of this approach has shown encouraging results in the induction of long-term graft survival without the use of suppressive therapy (76,77). In this case, donor chimerism seems to be a significant biological feature in good outcomes (77). For now, however, no data concerning a role of Tregs has been reported in this clinical trial.

Immunosuppressive mechanisms mediated by Tregs

The mechanisms by which Tregs regulate exacerbated inflammation and promote graft tolerance are a subject of great interest. Tregs can target both innate and adaptive immune components by employing a large diversity of mechanisms. *In vitro* experiments showed that Tregs need TCR stimulation and cell–cell contact to exhibit their

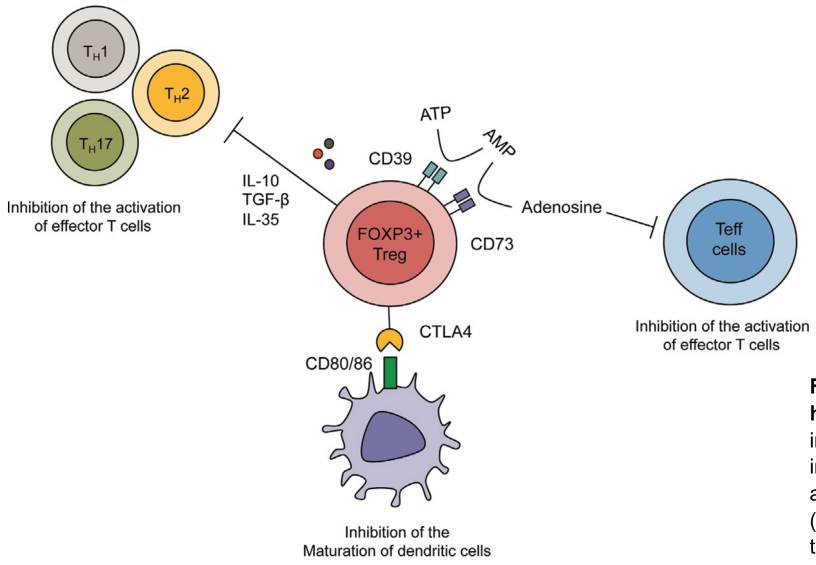


Figure 2: Immunosuppressive function of human Tregs. Regulatory T cells can inhibit inflammation through the production of immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- beta, and IL-35), the expression of inhibitory molecules (CTLA-4) and by the release of adenosine through the CD39-CD73 pathway.

suppressive functions (17). Distinct suppressive Treg-mediated mechanisms have been identified and described (Figure 2). First, by expressing inhibitory molecules such as CTLA4 and Lag3, Tregs can inhibit the maturation and activation of antigen-presenting cells (APCs). Lag3, a homolog of CD4, can bind MHC class II molecules expressed by immature dendritic cells (79). It is has been postulated that this interaction leads to the transduction of some inhibitory signals that block the activation and maturation of immature dendritic cells (79). However, that Tregs function in this way has been challenged by observations that depletion of $Lag3^+$ cells prolongs graft survival (80). The function of CTLA4 in the regulatory properties of Tregs is better established. It directly targets B7 costimulatory molecules (CD80 and CD86) expressed by APCs and precludes the increased expression of CD80 and CD86 induced by antigen-specific effector T cells and thus prevents the maturation of APCs. CTLA4 can directly remove surface CD80/CD86 proteins on APCs by trans-endocytosis and degradation and thus limits the ability of APCs to initiate or maintain T cell inflammatory responses (81).

The key role of CTLA4 in the regulatory functions of human Tregs has been recently clarified. Two independent studies identified a spectrum of autosomal dominant mutations of the CTLA4 protein that alter its expression and function and predispose patients to severe autoimmunity and immuno-deficiency (82,83). The penetration of these mutations is not complete, as some mutated patients do not develop any clinical manifestations. These patients display significant lymphopenia with a reduced frequency of B cells (82,83) but an accumulation of potent autoreactive $CD21^{lo}$ B cells in periphery, suggesting an altered selection of autoreactive B cell clones (82). The homeostasis of T cells is also an important influence with notably extremely low levels of peripheral naive T cells (82,83). Although the homeostasis of Tregs per se are not altered, their suppressive functions are significantly dampened (82,83). Notably, the efficiency of CD80 trans-endocytosis is impaired in patients with CTLA4 mutations, an observation that could explain their dampened suppressive functions (83). The altered Treg function is linked to a hyper-proliferation of effector T cells, demonstrating the critical role of CTLA4 in the homeostasis of T lymphocytes (82). Taken together, these studies clearly demonstrate a central role for $CTLA4^+$ Tregs in immune homeostasis and tolerance.

Tregs can also produce elevated amounts of suppressive cytokines, such as IL-10, IL-35, and TGF-ß, that are critical for the maintenance of tolerance and the control of inflammation (84) and that could induce transplantation tolerance in rodents (8–11). *In vitro* studies in humans demonstrate the role of IL-10, IL-35, and TGF-ß secreting FOXP3 Tregs in the control of T cell activation, however, these methods of investigating Treg function may not accurately reflect the suppressive capacity of Tregs *in vivo*, making the transfer of these findings to humans difficult (17). In kidney transplantation, graft acceptance in tolerant patients is associated with specific functional IL-10/TGF- *b* patterns (62,65,72,85). The establishment of this immune regulatory pattern seems to be dependent of the presence of regulatory B cells, which would favor the emergence of TGF-ß–producing Tregs (86). However, no data clearly report an increased production of IL-10 and TGF-ß by Tregs in the context of kidney transplantation tolerance.

Finally, Tregs can modulate immunity by metabolic disruption involving the degradation of adenosine triphosphate (ATP) a pro-inflammatory molecule into adenosine a suppressive metabolite through the CD39/CD73 pathway (87). This process has been shown to promote a switch

from an ATP-rich inflammatory to a more tolerogenic/ suppressive environment, as adenosine directly inhibits the activation of APCs and inflammatory T cells (87). CD39 and CD73 are highly expressed on activated mTregs (14,15,38), although the expression of CD73 seems to be essentially intra- cytoplasmic (88). $CD39^+$ Tregs can inhibit T cell proliferation and inflammation in humans (87,89), protect kidneys from ischemic lesions (90) and promote long-term graft survival in rodents (91). In clinical kidney transplantation, we reported on an increased expression of CD39 at the surface of mTregs of tolerant patients, suggesting a role for the adenosine pathway in kidney operational tolerance (15).

In several cases, the suppressive mechanisms employed by Tregs seem to depend on the target cell type, the local microenvironment and the tissue location. Considering this high heterogeneity, it is likely that distinct functional Treg subpopulations, which can ensure specific suppressive functions can be generated *in vivo*. The future challenge will be to determine in what particular settings such Treg subsets are generated and maintained *in vivo*.

Is a Treg always a Treg: Investigating the limit between stability and plasticity

Questions concerning the functionality of Tregs are further complicated because the suppressive function of Tregs may not be stable over time, especially under chronic inflammation. Animal models of autoimmunity show the ability of $FOXP3^+$ Tregs to switch to nonregulatory $FOXP3^-$ pathogenic T cells (92–94). Most interestingly, these ''exFOXP3'' cells can mediate pathological processes and promote inflammation in mouse models of type-1 diabetes and arthritis (93,94). Similar observations have been made in experimental transplantation where stimulation of the TIM-1 and OX40 pathways can deprogram Tregs and favors their conversion into inflammatory T cells, promoting allograft rejection (95,96). Stimulation of TIM-1 inhibits the expression of the Treg-associated molecules FOXP3, CTLA4, GITR, and IL-10 and dampens their suppressive function (95). Most interestingly, TIM-1 ligation prevents the induction of Tregs *in vitro* in the presence of TGF-ß but favors the induction of T_H17 and T_H1 T cells (95). In this study and others, the production of IL-6 was highlighted as an important destabilizing factor for Tregs (93,97) that can downregulate the expression of Eos, an important FOXP3 partner necessary for the maintenance of the Treg lineage (97). The reprogramming of Tregs into pathogenic T_H17 cells has been described recently in the context of autoimmune arthritis. Inflamed synovial tissues can promote the generation of IL-17 secreting exFOXP3 cells through IL-6 secretion (93). These exFOXP3-T_H17-like cells maintain an intrinsic weak Treg signature but also exhibit a unique T_H17 signature (93). The origin of these exFOXP3 cells is still a matter of debate (98), but recent evidence would support the hypothesis that pathogenic exFOXP3 could arise from peripherally induced Tregs under chronic inflammation (36,93,99).

In humans, the question of the stability of Tregs involves important goals notably in adoptive Treg therapy. It is absolutely necessary to understand and to control their stability to avoid the development of pathogenic cells after *in vivo* transfer. Comparative studies between naive and memory Tregs suggested that nTregs are more stable than mTregs *in vitro* after prolonged anti- CD3/CD28 activa- tion (100,101). In these settings, mTregs progressively lose their expression of FOXP3, increase their methylation of FOXP3 TSDR and begin to produce inflammatory cyto- kines (100,101). Pro-inflammatory cytokines can also inhibit the suppressive function of Tregs. Pro-T_H17 cytokines are strong destabilizers of Treg suppressive functions (36,102). In the presence of IL-6, IL-1ß, and TGF-ß a culture of nTregs or mTregs in the presence of IL-6, IL- 1*b*, and TGF-ß shows inhibited expression of FOXP3 and the emergence of exFOP3 RORgt^+ cells with poor suppressive capacities (102). T_H2 inflammation can also inhibit the induction of FOXP3 Tregs *in vitro*. IL-4 induces the expression of GATA-3, which can bind in the FOXP3 promoter limiting its transactivation and the generation of Tregs (103). More recently, a trans-differentiation of Tregs into T_H2-like cells has been reported in the skin of patients suffering from scleroderma. Interestingly, these T_H2-like Tregs are responsive to IL-33 and produce high amounts of IL-13 *in vitro*, suggesting that they could be pathogenic in this disease (104) (Figure 1). In patients with rheumatoid arthritis, TNF*a* impairs Treg cell function by inhibiting the phosphorylation of FOXP3, an important molecular event for its functionality (105). Interestingly, treatment of patients with infliximab (an anti-TNF*a* therapy) restores the function of Tregs and dampens T_H1 and T_H17 inflammation (105).

The stability of Tregs in human kidney transplantation has not yet been clearly addressed. Decreased FOXP3 demethylation has been found in $CD4^+$ T cells of stable patients and recipients experiencing chronic rejection. This suggests that ongoing allogenic responses could have deleterious effects on the stability of $FOXP3^+$ Tregs (15). Similarly, lower levels of *bona fide* Tregs are associated with early rejection independent of suppressive therapy, suggesting that local inflammation could influence the intragraft Treg response (30). What are signals that significantly alter Treg stability in kidney grafts? Some recent studies give an indication. A study of immune responses in explanted human kidney grafts emphasized the importance of the inflammatory environment, with a break in B cell tolerance and the production of high levels of IL-6, IL-1ß and TGF-ß, three combined cytokines that can reprogram Tregs into pathogenic T_H17-like cells (Figure 1) (106). This microenvironment could likely contribute to the generation of pathogenic ''exFOXP3'' T cells and could lead to shorter graft survival.

However, to what extent this heterogeneity could be pathogenic in human diseases has not yet been defined. Indeed, many reports in humans demonstrate the ability of

FOXP3$^+$ Tregs to produce inflammatory cytokines and express other T-helper–associated transcription factors while maintaining their full suppressive function and an optimal expression and demethylation of FOXP3 TSDR (16,107) (Figure 1). This heterogeneity is observed in healthy volunteers, but seems exacerbated in autoimmune diseases (108,109). Moreover, it is important to note that Tregs exhibit an intrinsic plasticity that allows them to express a hybrid phenotype in sync with their local environment for effective control of immune responses (16,18) (Figure 1). This particularity is suspected of being part of a functional specialization of Tregs as they can express the respective T-helper transcription factors to specifically suppress T_H1, T_H2, or T_H17 inflammation (16,18). Although this concept has been well-defined in mice models, it has to be better defined in humans, where only one study has demonstrated the functional specialization of a CXCR3$^+$ T_H1-like Treg subset that specifically inhibits T_H1 inflammation, in ovarian cancer in this case (110).

Collectively, these recent data perfectly illustrate the high adaptability but also the potent fragility of Tregs in changing microenvironments. On the one hand, Tregs are mutable and can adapt their function and phenotype to suppress different immune responses. On the other hand, Tregs can lose their core identity (Foxp3 demethylation/expression and suppressive functions), allowing their conversion into pathogenic effector cells in response to inflammatory signals. A major challenge in Treg biology will be to exactly define and distinguish those signals that promote stability, while maintaining some plasticity, rather than instability. This is of vital importance to the development of suitable FOXP3 Tregs, therapies particularly in the field of organ transplantation (111).

Role of FOXP3 partners and epigenetic programming in the generation of Tregs

Foxp3 has long been considered as the ‘‘central regulator’’ for the generation of Treg cells. However, genomic wide analysis and proteomic studies have identified a specific Treg signature composed of a number of up- and down-regulated factors (14,26,27,112). Recently, a proteomic approach with a T cell hybridoma allowed the identification of the Foxp3 interactome in an unbiased and comprehensive manner. They induced the expression of the prokaryotic biotin ligase BirA and Foxp3 protein fused with an *in vivo* biotinylation tag suitable for affinity purification (26). Proteome profiling in the FOXP3-transduced T cell line showed that FOXP3 was involved in large transcriptional complexes, including hundred of interacting protein partners (26). These interacting partners are implicated in transcriptional regulation (e.g. NFAT, Runx1, Foxp1, GATA3, Stat3, IEts, Cnot3) and some of them are direct Foxp3 targets (Gata3, Stat3, Runx1). Recently, DNAseI hypersensitivity (which evaluates chromatin accessibility) and CHIP-seq analysis have revealed that FOXP3, in concert with its cofactors, can efficiently bind to pre- existing enhancers in the whole genome and not just in some Tregs-specific regions (112). Interestingly, several FOXP3-binding sites were enriched for Ets, Cnot, and Runx motifs, confirming the interaction of these factors with Foxp3 to bind DNA (112). Data obtained from the FANTOM consortium showed similar results where regions around the Foxp3 binding sites were highly sensitive to DNase I and enriched for Runx1 and Ets1 motifs in both Treg and conventional T cells (14,23).

In a recent computational approach, Helios, Eos, Gata1, and Xbp1 were described as critical co-partners for FOXP3 (27). However, the lack of one of these factors in transgenic mice does not affect the Treg signature or the expression of their respective targets. In contrast, forced expression of FOXP3 and one of these factors in human naive FOXP3$^-$ T cells allows a recapitulation of the Treg transcriptomic signature. Surprisingly, forced expression of each of these factors together with Foxp3, regulated the same set of genes (27). The authors suggest that the Treg signature is maintained and regulated by a redundant genetic ‘‘lock in’’ that likely permits Tregs to reach the same transcriptional state independently of its molecular partner (27). This result is interesting and suggests that the Foxp3 complexes incorporate different partners in different immune environments to ensure the high adaptability of Tregs.

DNA hypomethylation of the CNS2 region of the FOXP3 gene is a another critical event for the stability of Tregs (22). In mice, the genetic deletion of CNS2 leads to the loss of FOXP3 expression in proliferating Tregs, confirming its importance for Treg generation (113). Genome-wide DNA methylation analysis shows that the DNA methylation pattern in conventional T cells and Tregs are very similar. Only 0.2% of the total DNA showed TSDRs (23). Interestingly DNA methylation status was correlated with the DNaseI hypersensitive regions found specifically in Tregs and this was associated with the upregulation of certain FOXP3 dependent (e.g. CTLA4, IL-2RA) and independent genes (e.g. Eos, Helios) (23,24,112). The epigenetic programming of Tregs is not FOXP3 centered, but includes many other parts of the genome of these cells (23,24,114). Interestingly, the majority of demethylated DNA regions found in Tregs were located outside promoter regions and notably upstream of transcriptional start sites, suggesting that TSDRs act as enhancer regions that probably contribute to the expression of Treg molecules (23). Of note, TSDRs were not enriched for FOXP3 binding sites excepted for the CNS2 region, supporting the idea that the establish- ment of TSDRs is FOXP3 independent (23). Backing this up, Tregs of FOXP3-deficient mice display a similar TSDR signature to wild- type Tregs. Moreover, retroviral FOXP3 over-expression in conventional T cells and induction of Tregs with TGF-ß *in vitro* fail to induce this epigenetic signature (24).

Given the importance of demethylation in the programming of Tregs, administration of DNA methyl-transferase inhibitors has been suggested as an alternative strategy to generate highly stable Tregs *in vitro* (115). This hypothesis has been challenged by results demonstrating that DNA methyl-transferase–deficient mice develop fatal autoimmunity similar to that observed in FOXP3-deficient animals. In fact, type 1 DNA methyl-transferase (Dnmt1) regulates the methylation status of several Treg-associated molecules but not the demethylated status of FOXP3 directly (116). As a consequence, the inhibition of Dnmt1 completely alters the epigenetic landscape of Tregs, disrupts their suppressive function and, most notably, promotes the expression of inflammatory cytokines (116). The methylation/demethylation status of FOXP3 and its associated regulatory genes is tightly regulated and the manipulation of DNA methylation to enhance Treg function will be more challenging than might be expected.

Collectively, these data show that (i) Treg cells possess a highly TSDR DNA hypomethylation pattern, which is not confined to the Foxp3 gene but distributed genome-wide, and (ii) that the establishment of the Treg epigenome and transcriptome/proteome signature are two complementary and synchronized processes resulting in the generation of fully functional Tregs.

Interplay between Tregs and metabolism: A way to maintain tissue homeostasis?

Treg stability is not only regulated at the epigenetic level or in line with the expression of FOXP3 partners. The integrity of stable Tregs requires a fine tuning of the signals received upon T cell activation, including signals derived from TCR, CD28, and PI3K/Akt pathways, as well as the regulation of energy metabolites (117). The signaling programs regulating T cell responses to canonical stimulation and to metabolic clues are inter-connected, as recently reviewed by Pollizzi and Powell (118). As mentioned previously, regulatory T cells are long-lived cells and it is not surprising that memory and Tregs are metabolically alike. In contrast to effector T cells, which preferentially rely on glycolysis to sustain their effector function, Tregs rely on fatty acid metabolism to generate energy (119). Glycolysis is promoted by the upregulation of MYC and hypoxia- inducible factor 1*a* (HIF1*a*). The expression of HIF1*a* is not only regulated by the level of oxygen but also by the integration of external clues by the mTOR complex. Direct inhibition of glycolysis has been shown to favor the development of Tregs, a result that has been also obtained with the deletion of *HIF1*a (120). Contradictorily, HIF1*a* has been shown to favor the generation of Treg. Foxp3 expression is enhanced under hypoxic conditions in a HIF1*a*-dependent manner (121). HIF1*a*-deficient Tregs fail to protect mice from colitis. The role of the integration of mTOR-derived signals is less controversial. The differentia- tion of $T_H1/T_H2/T_H17$ cells is defective when mTOR deficient CD4 T cells are used and a differentiation of FOXP3$^+$ Treg is observed (122). In contrast, the activation of the AKT–mTOR pathway prevents the thymic generation of Tregs and instead favors the generation of T_H1 cells (123). These results suggest the favorable action of rapamycin on Treg function and generation could be in part explained by the modification of the metabolic pathways. It is clear now that targeting the metabolic process may in coming years be a promising way to control the effector/regulator balance.

The interaction between metabolism and Tregs seems to be bidirectional. Although metabolically derived signals can finely tune Treg biology, these cells can also directly influence metabolic processes contributing to tissue homeostasis. One very interesting example is the recent description of an amphiregulin-secreting Treg subset involved in muscle repair and regeneration (124). These findings evidence the ability of Tregs to influence the cells that are directly responsible for the repair of injured muscles. Another well- documented example is the role of Tregs in visceral adipocyte tissues, notably in the context of obesity (125–127). Adipocyte tissue–resident Tregs display a particular phenotype and are regulated by IL-33 (128,129). Injection of IL-33 in mice promotes an increase in adipocyte Tregs and can play a role in reversing obesity (130). As recently suggested, the role of Tregs in obesity regulation can have a significant impact in organ transplantation as obese individuals can experience poorer outcomes following transplantation, having a higher inci- dence of acute rejection and eventual graft loss (127).

In light of these new results it is reasonable to ask to what extent kidney-derived metabolites can regulate Treg function and identity. Can kidney graft damage mediate signals, which then influence Treg function during the clinical course of kidney transplantation? Can Tregs directly modulate renal tissue homeostasis and participate in tissue repair and generation? The answers to these questions are currently unknown and it would be fertile ground for future investigations.

Posttranslational regulation of FOXP3: New hopes for graft tolerance?

Posttranslational modification is another molecular mechanism involved in the stability of FOXP3. It has been shown that acetylation of FOXP3 prevents its proteosomal degradation (131) and enhances its binding in the IL-2 promoter; contributing to Treg anergy (132). Thus, therapeutic inhibition of histone deacethylase (HDACi) in mice increases the number of peripheral Treg cells, enhances the expression Treg-associated markers with functional activity such as Foxp3, GITR, and CTLA4, increases Treg-suppressive ability and can promote transplantation tolerance (132). In line with this, recent results obtained from clinical trials report the clinical efficacy of vorinostat (inhibitors of type 1 and 2 HDAC) in conjunction with mycophenolate for the prevention of graft-versus-host disease in patients with

hematological diseases undergoing hematopoietic stem cell transplantation (133). Interestingly, FOXP3 expression and demethylation, frequency of Tregs, and suppressive functions are higher in vorinostat-treated patients (133,134). However, given the ubiquitous expression of HDACs and the potent toxic side effects of this type of treatment, future challenges should focus on the identification of selective inhibitors that can promote Treg responses. A recent study points out the possibility of enhancing the Treg response by selectively inhibiting HDAC6 (135) and HDAC3 (136). Inhibition of HDAC6 increases Treg numbers and function in murine models and acts in synergy with sirolimus to suppress alloimmunity and promote long-term graft survival (135). A complete alteration of the Treg physiology, resulting in lethal autoimmune diseases, is obtained when HDAC3 is specifically deleted in FOXP3 Tregs (136). HDAC3 is necessary for thymic development of Tregs and plays an important role in the conversion of conven- tional T cells into Tregs in the presence of TGF-ß (136). Collectively, these data demonstrate the therapeutic potential of HDACi. By sustaining FOXP3 acetylation, they promote the survival and generation of Tregs and enhance their function both *in vitro* and *in vivo*. Conse- quently, selective HDACi may provide an alternate phar- macologic approach in human organ transplantation and could improve the management of transplant rejection.

Conclusions

The therapeutic potential of Tregs in organ transplantation is wide and very promising. A number of clinical trials are currently taking place and will evaluate the safety and efficacy of FOXP3 Treg cellular therapy in kidney transplant recipients (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02088931; https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02129881). However, the basic biology of Tregs has to be thoroughly studied to decipher the mechanisms that influence their stability and functions if we want to effectively and safely exploit these cells and propose them as a suitable therapeutic alternative for kidney transplant patients. A better understanding of how different promoting or inhibiting factors regulate Treg stability, under homeostatic and inflammatory settings, could lead to the emergence of alternative strategies for enhancing Treg stability and inducing long-term graft survival. The availability of operationally, tolerant patients and patients with induced tolerance is necessary for the study of the molecular profile of well-functioning Tregs in transplantation settings. More studies are needed to further characterize these cells and bring to light the molecular factors and signaling pathways that play a major role in graft tolerance.

Acknowledgments

This work was carried out in the context of a CENTAURE foundation grant and under the auspices of the IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via the ‘‘Investment into the Future‘‘ program ANR-10-IBHU-005 and IGO (Immune Graft Oncology) labex.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

References

1. Janeway CA, Jr., Sharrow SO, Simpson E. T cell populations with different functions. Nature 1975; 253: 544–546.
2. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995; 155: 1151–1164.
3. Hall BM, Pearce NW, Gurley KE, Dorsch SE. Specificunrespon- siveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action. J Exp Med 1990; 171: 141–157.
4. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003; 299: 1057–1061.
5. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003; 4: 330–336.
6. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat Immunol 2003; 4: 337–342.
7. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syn- drome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet 2001; 27: 20–21.
8. Waldmann H, Graca L, Cobbold S, Adams E, Tone M, Tone Y. Regulatory T cells and organ transplantation. Semin Immunol 2004; 16: 119–126.
9. Waldmann H, Hilbrands R, Howie D, Cobbold S. Harnessing FOXP3+ regulatory T cells for transplantation tolerance. J Clin Invest 2014; 124: 1439–1445.
10. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 2003; 3: 199–210.
11. Ferrer IR, Hester J, Bushell A, Wood KJ. Induction of transplanta- tion tolerance through regulatory cells: From mice to men. Immunol Rev 2014; 258: 102–116.
12. Fuchs EJ. Transplantation tolerance: From theory to clinic. Immunol Rev 2014; 258: 64–79.
13. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity 2009; 30: 899–911.
14. Schmidl C, Hansmann L, Lassmann T, et al. The enhancer and promoter landscape of human regulatory and conventional T cell subpopulations. Blood 2014; 123: e68–e78.
15. Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. J Am Soc Nephrol 2015. doi: 10.1681/ASN.2014050480
16. Duhen T, Duhen R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that

phenotypically mirror effector Th cells. Blood 2012; 119: 4430–4440.
17. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity 2009; 30: 636–645.
18. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. Nat Rev Immunol 2011; 11: 119–130.
19. Sawant DV, Vignali DA. Once a Treg, always a Treg? Immunol Rev 2014; 259: 173–191.
20. Coenen JJ, Koenen HJ, van Rijssen E, Hilbrands LB, Joosten I. Rapamycin and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells. Blood 2006; 107: 1018–1023.
21. Kawai M, Kitade H, Mathieu C, Waer M, Pirenne J. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. Transplantation 2005; 79: 1073–1077.
22. Floess S, Freyer J, Siewert C, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. PLoS Biol 2007; 5: e38.
23. Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, et al. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. Proc Natl Acad Sci USA 2014; 111: 5289–5294.
24. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. Immunity 2012; 37: 785–799.
25. Baron U, Floess S, Wieczorek G, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. Eur J Immunol 2007; 37: 2378- 2389.
26. Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, et al. Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. Nat Immunol 2012; 13: 1010–1019.
27. Fu W, Ergun A, Lu T, et al. A multiply redundant genetic switch 'locks in' the transcriptional signature of regulatory T cells. Nat Immunol 2012; 13: 972–980.
28. Ouyang W, Liao W, Luo CT, et al. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. Nature 2012; 491: 554–559.
29. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. J Am Soc Nephrol 2008; 19: 2020–2026.
30. Bestard O, Cunetti L, Cruzado JM, et al. Intragraft regulatory T cells in protocol biopsies retain foxp3 demethylation and are protective biomarkers for kidney graft outcome. Am J Transplant 2011; 11: 2162–2172.
31. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. Nat Rev Immunol 2010; 10: 490–500.
32. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 2006; 203: 1701–1711.
33. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol 2012; 12: 191–200.
34. Valmori D, Merlo A, Souleimanian NE, Hesdorffer CS, Ayyoub M. A peripheral circulating compartment of natural naive CD4 Tregs. J Clin Invest 2005; 115: 1953–1962.
35. Ayyoub M, Raffin C, Valmori D. Comment on ''helios+ and helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans''. J Immunol 2013; 190: 4439–4440.
36. Raffin C, Pignon P, Celse C, Debien E, Valmori D, Ayyoub M. Human memory Helios- FOXP3+ regulatory T cells (Tregs) encompass induced Tregs that express Aiolos and respond to IL-1beta by downregulating their suppressor functions. J Immunol 2013; 191: 4619–4627.
37. Sanchez Rodriguez R, Pauli ML, Neuhaus IM, et al. Memory regulatory T cells reside in human skin. J Clin Invest 2014; 124: 1027–1036.
38. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. Am J Transplant 2010; 10: 2410–2420.
39. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. J Immunol 2006; 176: 4622–4631.
40. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, et al. DR(high+)CD45RA(-)-Tregs potentially affect the suppressive activity of the total Treg pool in renal transplant patients. PLoS ONE 2012; 7: e34208.
41. Pesenacker AM, Broady R, Levings MK. Control of tissue-localized immune responses by human regulatory T cells. Eur J Immunol 2015; 45: 333–343.
42. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, et al. Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. Nat Med 2011; 17: 975–982.
43. Grimbert P, Mansour H, Desvaux D, et al. The regulatory/cytotoxic graft-infiltrating T cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. Transplantation 2007; 83: 341- 346.
44. Mansour H, Homs S, Desvaux D, et al. Intragraft levels of Foxp3 mRNA predict progression in renal transplants with borderline change. J Am Soc Nephrol 2008; 19: 2277–2281.
45. Bestard O, Cruzado JM, Mestre M, et al. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. J Immunol 2007; 179: 4901–4909.
46. Ashton-Chess J, Dugast E, Colvin RB, et al. Regulatory, effector, and cytotoxic T cell profiles in long-term kidney transplant patients. J Am Soc Nephrol 2009; 20: 1113–1122.
47. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. N Engl J Med 2005; 353: 2342–2351.
48. Veronese F, Rotman S, Smith RN, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. Am J Transplant 2007; 7: 914–922.
49. Ziegler SF. FOXP3: Not just for regulatory T cells anymore. Eur J Immunol 2007; 37: 21–23.
50. Wieczorek G, Asemissen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. Cancer Res 2009; 69: 599–608.
51. De Serres SA, Sayegh MH, Najafian N. Immunosuppressive drugs and Tregs: A critical evaluation! Clin. J Am Soc Nephrol 2009; 4: 1661–1669.
52. Fanigliulo D, Lazzerini PE, Capecchi PL, Ulivieri C, Baldari CT, Laghi-Pasini F. Clinically-relevant cyclosporin and rapamycin concentrations enhance regulatory T cell function to a similar extent but with different mechanisms: An in-vitro study in healthy humans. Int Immunopharmacol 2014; 24: 276–284.
53. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW, et al. Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. Am J Transplant 2012; 12: 3449–3461.
54. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. Blood 2005; 105: 4743–4748.

55. Hester J, Schiopu A, Nadig SN, Wood KJ. Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. Am J Transplant 2012; 12: 2008- 2016.
56. Rossetti M, Spreafico R, Saidin S, et al. Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region. J Immunol 2015; 194: 113–124.
57. Orlando G, Hematti P, Stratta RJ, et al. Clinical operational tolerance after renal transplantation: Current status and future challenges. Ann Surg 2010; 252: 915–928.
58. Brouard S, Pallier A, Renaudin K, et al. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. Am J Transplant 2012; 12: 3296–3307.
59. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest 2010; 120: 1836–1847.
60. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest 2010; 120: 1848–1861.
61. Braza F, Soulillou JP, Brouard S. Gene expression signature in transplantation tolerance. Clin Chim Acta 2012; 413: 1414–1418.
62. Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 15448–15453.
63. Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. Kidney Int 2010; 78: 503–513.
64. Baron D, Ramstein G, Chesneau M, et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. Kidney Int 2015; 87: 984–995.
65. Moraes-Vieira PM, Takenaka MC, Silva HM, et al. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. Clin Immunol 2012; 142: 117–126.
66. Chesneau M, Pallier A, Braza F, et al. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. Am J Transplant 2014; 14: 144–155.
67. Silva HM, Takenaka MC, Moraes- Vieira PM, et al. Preserving the B cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. Mol Med 2012; 18: 733–743.
68. Braudeau C, Racape M, Giral M, et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. Transpl Int 2007; 20: 845–855.
69. Louis S, Braudeau C, Giral M, et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. Transplantation 2006; 81: 398–407.
70. Becker LE, de Oliveira Biazotto F, Conrad H, et al. Cellular infiltrates and NFkappaB subunit c-Rel signaling in kidney allografts of patients with clinical operational tolerance. Transplantation 2012; 94: 729–737.
71. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. Am J Transplant 2006; 6: 736–746.
72. Danger R, Pallier A, Giral M, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 597–606.
Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, et al. Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. Am J Transplant 2012; 12: 1133–1145.
73. Kawai T, Sachs DH, Sykes M, Cosimi AB. Immune Tolerance N. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. N Engl J Med 2013; 368: 1850- 1852.
74. Andreola G, Chittenden M, Shaffer J, et al. Mechanisms of donor-specific tolerance in recipients of haploidentical combined bone marrow/kidney transplantation. Am J Transplant 2011; 11: 1236–1247.
75. Leventhal J, Abecassis M, Miller J, et al. Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. Sci Transl Med 2012; 4: 124ra 28.
76. Leventhal J, Abecassis M, Miller J, et al. Tolerance induction in HLA disparate living donor kidney transplantation by donor stem cell infusion: Durable chimerism predicts outcome. Transplantation 2013; 95: 169–176.
77. Huang Y, Bozulic LD, Miller T, Xu H, Hussain LR, Ildstad ST. CD8*a*+ plasmacytoid precursor DCs induce antigen-specific regulatory T cells that enhance HSC engraftment in vivo. Blood 2011; 117: 2494–2505.
78. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J Immunol 2008; 180: 5916–5926.
79. Haudebourg T, Dugast AS, Coulon F, Usal C, Triebel F, Vanhove B. Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance. Transplantation 2007; 84: 1500–1506.
80. Krummey SM, Ford ML. Braking bad: Novel mechanisms of CTLA-4 inhibition of T cell responses. Am J Transplant 2014; 14: 2685–2690.
81. Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. Science 2014; 345: 1623–1627.
82. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, et al. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. Nat Med 2014; 20: 1410–1416.
83. Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. Curr Opin Immunol 2009; 21: 612–618.
84. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. J Clin Invest 2000; 106: 145–155.
85. Haynes LD, Jankowska-Gan E, Sheka A, et al. Donor-specific indirect pathway analysis reveals a B cell-independent signature which reflects outcomes in kidney transplant recipients. Am J Transplant 2012; 12: 640–648.
86. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood 2007; 110: 1225–1232.
87. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. J Biol Chem 2010; 285: 7176–7186.
88. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. J Immunol 2009; 183: 7602– 7610.
89. Kinsey GR, Huang L, Jaworska K, et al. Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 1528–1537.

90. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med 2007; 204: 1257–1265.
91. Bailey-Bucktrout SL, Martinez-Llordella M, Zhou X, et al. Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. Immunity 2013; 39: 949–962.
92. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, et al. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. Nat Med 2014; 20: 62–68.
93. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of patho- genic memory T cells in vivo. Nat Immunol 2009; 10: 1000– 1007.
94. Degauque N, Mariat C, Kenny J, et al. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. J Clin Invest 2008; 118: 735–741.
95. Vu MD, Xiao X, Gao W, et al. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. Blood 2007; 110: 2501–2510.
96. Sharma MD, Huang L, Choi JH, et al. An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. Immunity 2013; 38: 998–1012.
97. Sakaguchi S, Vignali DA, Rudensky AY, Niec RE, Waldmann H. The plasticity and stability of regulatory T cells. Nat Rev Immunol 2013; 13: 461–467.
98. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. Immunity 2012; 36: 262–275.
99. Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. Eur J Immunol 2009; 39: 1088- 1097.
100. Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homoge-neous regulatory T cell lines upon in vitro expansion. Blood 2006; 108: 4260–4267.
101. Valmori D, Raffin C, Raimbaud I, Ayyoub M. Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107: 19402–19407.
102. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, et al. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-ßeta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. PLoS Biol 2007; 5: e329.
103. MacDonald KG, Dawson NA, Huang Q, Dunne JV, Levings MK, Broady R. Regulatory T cells produce profibrotic cytokines in the skin of patients with systemic sclerosis. J Allergy Clin Immunol 2015; 135: 946–e9.
104. Nie H, Zheng Y, Li R, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. Nat Med 2013; 19: 322–328.
105. Thaunat O, Graff-Dubois S, Fabien N, et al. A stepwise breakdown of B cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. Kidney Int 2012; 81: 207–219.
106. Beriou G, Costantino CM, Ashley CW, et al. IL-17-producing human peripheral regulatory T cells retain suppressive function. Blood 2009; 113: 4240–4249.
107. Dominguez-Villar M, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Identification of T helper type 1- like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. Nat Med 2011; 17: 673–675.
108. McClymont SA, Putnam AL, Lee MR, et al. Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes. J Immunol 2011; 186: 3918–3926.
109. Redjimi N, Raffin C, Raimbaud I, et al. CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. Cancer Res 2012; 72: 4351–4360.
110. Juvet SC, Whatcott AG, Bushell AR, Wood KJ. Harnessing regulatory T cells for clinical use in transplantation: The end of the beginning. Am J Transplant 2014; 14: 750–763.
111. Samstein RM, Arvey A, Josefowicz SZ, et al. Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. Cell 2012; 151: 153–166.
112. Feng Y, Arvey A, Chinen T, van der Veeken J, Gasteiger G, Rudensky AY. Control of the inheritance of regulatory T cell identity by a cis element in the Foxp3 locus. Cell 2014; 158: 749–763.
113. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, et al. Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. Genome Res 2009; 19: 1165–1174.
114. Hippen KL, Riley JL, June CH, Blazar BR. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. Semin Immunol 2011; 23: 462–468.
115. Wang L, Liu Y, Beier UH, et al. Foxp3+ T-regulatory cells require DNA methyltransferase 1 expression to prevent development of lethal autoimmunity. Blood 2013; 121: 3631–3639.
116. Huynh A, Zhang R, Turka LA. Signals and pathways controlling regulatory T cells. Immunol Rev 2014; 258: 117–131.
117. Pollizzi KN, Powell JD. Integrating canonical and metabolic signalling programmes in the regulation of T cell responses. Nat Rev Immunol 2014; 14: 435–446.
118. Dang EV, Barbi J, Yang HY, et al. Control of T(H) 17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell 2011; 146: 772–784.
119. Shi LZ, Wang R, Huang G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentia-tion of TH17 and Treg cells. J Exp Med 2011; 208: 1367–1376.
120. Clambey ET, McNamee EN, Westrich JA, et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: E2784–E2793.
121. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. Immunity 2009; 30: 832–844.
122. Liu G, Yang K, Burns S, Shrestha S, Chi H. The S1P(1)-mTOR axis directs the reciprocal differentiation of T(H) 1 and T(reg) cells. Nat Immunol 2010; 11: 1047–1056.
123. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. Cell 2013; 155: 1282–1295.
124. Cipolletta D, Kolodin D, Benoist C, Mathis D. Tissular T(regs): A unique population of adipose-tissue-resident Foxp3+CD4+ T cells that impacts organismal metabolism. Semin Immunol 2011; 23: 431–437.
125. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. J Endocrinol 2014; 223: R41–R48.
126. Ford ML. Literature Watch Implications for transplantation. Am J Transplant 2015; 15: 853.
127. Kolodin D, van Panhuys N, Li C, et al. Antigen-and cytokine-driven accumulation of regulatory T cells in visceral adipose tissue of lean mice. Cell Metab 2015; 21: 543–557.
128. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue- resident regulatory T cells. Nat Immunol 2015; 16: 276–285.
129. Han JM, Wu D, Denroche HC, Yao Y, Verchere CB, Levings MK. IL-33 reverses an obesity-induced deficit in visceral adipose

tissue ST2+ T regulatory cells and ameliorates adipose tissue inflammation and insulin resistance. J Immunol 2015; 194: 4777– 4783.
130. van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, et al. Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabili- zation. Blood 2010; 115: 965–974.
131. Tao R, de Zoeten EF, Ozkaynak E, et al. Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells. Nat Med 2007; 13: 1299–1307.
132. Choi SW, Braun T, Chang L, et al. Vorinostat plus tacrolimus and mycophenolate to prevent graft-versus-host disease after relat- ed-donor reduced-intensity conditioning allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: A phase 1/2 trial. Lancet Oncol 2014; 15: 87–95.
133. Choi SW, Gatza E, Hou G, et al. Histone deacetylase inhibition regulates inflammation and enhances Tregs after allogeneic hematopoietic cell transplantation in humans. Blood 2015; 125: 815–819.
134. de Zoeten EF, Wang L, Butler K, et al. Histone deacetylase 6 and heat shock protein 90 control the functions of Foxp3(+) T-regulatory cells. Mol Cell Biol 2011; 31: 2066–2078.
135. Wang L, Liu Y, Han R, et al. FOXP3+ regulatory T cell development and function require histone/protein deacetylase 3. J Clin Invest 2015; 125: 1111–1123.

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DE LA THÈSE

La transplantation reste aujourd'hui l'unique traitement efficace lors de dysfonction terminale d'organes vitaux. Depuis plusieurs années, de nombreuses réflexions ont été mises en place afin d'identifier les enjeux de recherche nécessaires à une meilleure survie des greffons et prise en charge des patients transplantés. Parmi les enjeux, deux tiennent une place importante et sont au cœur des études actuelles : (i) diminuer voire supprimer l'immunosuppression et (ii) éviter la survenue de rejet, de dysfonction chronique à long terme chez les patients transplantés. En 2008, dans le cadre d'une expertise collective initiée par l'INSERM, un groupe d'experts a identifié les connaissances actuelles et les besoins nécessaires pour répondre à ces deux enjeux. Ainsi, dans l'ouvrage « Transplantation d'organes. Quelles voies de recherches ? », ce groupe d'expert a mis en évidence les besoins :

1. de mieux comprendre les mécanismes de tolérance centrale et périphérique afin de les appliquer en vue de diminuer l'immunosuppression.
2. d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour déplacer l'équilibre tolérance versus rejet en faveur de la tolérance.
3. d'identifier les mécanismes immunologiques et non immunologiques et les facteurs entrant en jeu dans le rejet à long terme.
4. d'identifier des marqueurs de la défaillance chronique du greffon.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur deux objectifs principaux. Dans un premier temps, mon premier objectif a été de **mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le phénomène de tolérance opérationnelle chez des patients transplantés rénaux**. Dans ce contexte, des précédentes études de notre équipe et d'autres laboratoires ont mis en évidence l'implication potentielle des lymphocytes T régulateurs. De plus, nous avons identifié une expression plus importante de la molécule CD39, une ectonucléotidase membranaire, à la surface des lymphocytes T régulateurs mémoires de patients tolérants comparés à des patients stables sous traitement. Ainsi, dans un premier temps, j'ai cherché à déterminer si la fonction ATPasique des lymphocytes T régulateurs était modifiée chez les patients tolérants comparés aux patients stables. Dans un second temps, mon but fut d'étudier l'effet des traitements immunosuppresseurs sur cette fonction impliquée dans l'inhibition des

réponses T conventionnelles par les lymphocytes T régulateurs (Article 1). L'objectif ultime étant **d'identifier les voies de régulation mises en place spontanément chez les patients opérationnellement tolérants pouvant être impliquées dans l'équilibre pro-tolérogénique de la balance tolérance/rejet chez ces patients.**

Mon second objectif de thèse s'articule autour de la nécessité **d'identifier des marqueurs prédictifs et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le rejet, la dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire**. En effet, le poumon est un organe plus immunogène que le rein et lors d'une transplantation pulmonaire, près de 50% des patients développent un rejet chronique dans les 5 ans post-transplantation. J'ai réalisé chez ces patients une analyse longitudinale du profil lymphocytaire T CD4 et CD8 et identifié la proportion de lymphocytes T régulateurs $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$ comme marqueur discriminant les patients à risque de rejet chronique (Article 2). L'objectif étant à la fois de mieux comprendre la dynamique des cellules T chez les patients atteints de rejet chronique, mais surtout **d'identifier un marqueur prédictif du rejet chronique à long terme pouvant permettre de prévenir la survenue du rejet en adaptant la stratégie thérapeutique des patients transplantés pulmonaires**.

Ces deux études sont développées dans la partie « Résultats » de ma thèse :

- Article n°1 : Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance
- Article n°2 : High circulating CD4+ CD25hi Foxp3+ T cell subpopulation early after lung transplantation is associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

I. ARTICLE N°1

Augmentation de l'activité de dégradation de l'ATP extracellulaire par les lymphocytes T régulateurs mémoires en tolérance opérationnelle après transplantation rénale

Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance

M. Durand, F. Dubois, C. Déjou, E. Durand, R. Danger, M. Chesneau, C. Brosseau, P. Guerif, J.P. Soulillou, N. Degauque, J.F. Eliaou, M. Giral, N. Bonnefoy, S. Brouard

(Article In Press dans Kidney International, Décembre 2017)

Bien que les données de la littérature suggèrent un lien entre Tregs et la tolérance opérationelle après transplantation rénale, leur role reste aujourd'hui une question ouverte. Les patients transplantés rénaux opérationellement tolérants présentent une fréquence accrue de lymphocytes T régulateurs mémoires (mTregs) circulants comparés aux patients stables. Chez ces mêmes patients, les mTregs possèdent un statut de déméthylation des TSDR, une capacité suppressive *in vitro* et une expression de l'ectonucleotidase CD39 plus importants que ceux des patients stables. Cependant, dans ce contexte particulier, les mécanismes impliqués dans le gain de fonction des mTregs chez les patients tolérants n'ont pas été identifés. Etant donnée l'expression accrue de la molécule CD39 à leur surface, nous avons analysé la capacité des mTregs à dégrader l'ATP extracellulaire chez des patients tolérants, des volontaires sains et des patients stables sous traitements immunosupresseurs. Nous nous sommes aussi intéressé au rôle des traitements immunosuppresseurs dans cette fonction de dégradation de l'ATP extracellulaire par les mTregs. Nous avons mis en évidence une fréquence de mTregs identique chez les patients tolérants comparés aux volontaires sains. Chez les patients tolérants, les mTregs possèdent une activité ATPasique et ADPasique physiologique. En revanche, chez les patients stables sous traitements, nous avons identifié un défaut dans cette fonction de dégradation de l'ATP extracellulaire par les mTregs, suggerant ainsi une balance « protolerogenique » chez les patients tolérants. Finallement, nous rapportons, *in vitro*, que les traitements immunosupresseurs favorisent la diminution de la proportion de mTregs identifiée chez les patients stables, mais que ces traitements n'ont pas d'effet sur la dégradation de l'ATP par la molécule CD39 et n'expliquent donc pas le défaut de fonction ATPasique des mTregs retrouvé chez les patients stables. Les résultats de cette étude suggèrent que des mécanismes actifs de régulation immune subsitent longtemps après arret des traitement immunosupresseurs chez les patients tolérants et que la fonction ATPasique des mTregs pourrait contribuer au maintien d'un greffon fonctionnel et l'absence de traitement immunosupresseur.

Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance

Maxim DURAND[1,2,3,4], Florian DUBOIS[1,2,3,4], Cecile DEJOU[5,6], Eugénie DURAND[1,2,4], Richard DANGER, PhD[1,2,4], Mélanie CHESNEAU, PhD[1,2,4], Carole BROSSEAU, PhD[1,2,4], Pierrick GUERIF[2,7], Jean Paul SOULILLOU[1,2,4], MD, PhD, Nicolas DEGAUQUE, PhD[1,2,4], Jean-François ELIAOU, MD, PhD[6,8], Magali GIRAL, MD, PhD[2,7], Nathalie BONNEFOY, PhD[6], Sophie BROUARD, PhD[1,2,4,7]

[1] Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.
[2] Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France.
[3] Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France
[4] LabEx IGO "Immunotherapy, Graft, Oncology", Nantes, France,
[5] OREGA Biotech, Ecully, France.
[6] IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier ; INSERM, U1194 ; Université Montpellier ; Institut Régional du Cancer de Montpellier, F-34298 Montpellier, F-34298, France.
[7] Centre d'Investigation Clinique (CIC) Biothérapie, CHU Nantes, Nantes, France.
[8] Département d'Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier et Faculté de Médecine, Université de Montpellier, Hôpital Saint-Eloi, 34295 Montpellier cedex 5, France.

Corresponding author: Sophie Brouard, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes CEDEX 1, France, Phone: +33 2 40 08 78 42, E-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

Supports: This work was conducted in the context of the "Fondation Centaure" (RTRS), which supports a French transplantation research network, the DHU Oncogreffe and the LABEX TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX- 0070_TRANSPLANTEX). This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d'Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This research was also supported by INSERM and IHU-CESTI institutes receiving financial support from the French Government managed by the National Research Agency (Investment into the Future Program ANR-10-IBHU-005), Nantes Metropole, and the Pays de la Loire Region. MD was supported by grants from the French Research Ministry, the "Fondation Centaure" and the LabEx IGO. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the of the official views of the National Institutes of Health.

Running headline: High Treg ATPase activity in operational tolerance

ABSTRACT

Regulatory T cells were recently proposed as the central actor in operational tolerance after renal transplantation. Tolerant patients harbor increased FoxP3^{hi} memory Treg frequency and higher Foxp3 Treg-specific demethylated region demethylation level when compared to stable kidney recipients and exhibit greater memory Treg suppressive capacities and higher expression of the ectonucleotidase CD39. In this particular and unique situation, however, the mechanisms of action of Tregs were not identified. Thus, we analyzed the memory Tregs ability to degrade extracellular ATP in tolerant patients, healthy volunteers, and patients with stable graft function under immunosuppression and the role of immunosuppressive drugs on this process. We report on the conserved proportion of memory Tregs leading to the establishment of pro-tolerogenic balance in operationally tolerant patients. We show that these memory Tregs in tolerant patients display normal capacity to degrade extracellular ATP/ADP. In contrast, memory Tregs from patients with stable graft function do not have this ability. Finally, we report that *in vitro,* immunosuppressive drugs may favor the lower proportion of memory Tregs in stable patients, but they have no effect on CD39-dependent ATP degradation and do not explain memory Treg lack of extracellular ATP/ADP degradation ability. Taken together, our findings suggest that intrinsic active regulatory mechanisms may act long after immunosuppressive drug arrest in operationally tolerant patients and may contribute to kidney allograft tolerance via the maintenance of CD39 Treg function.

Key words: Tolerance, Lymphocyte, Calcineurin Inhibitors

INTRODUCTION

Extracellular delivery of adenosine triphosphate (ATP) and adenosine diphosphate (ADP), by injured and necrotic cells, has long been known as a key factor responsible for inflammation through purinergic P2 receptor activation on immune cells. [1] In contrast, the expression of ectonucleotidases CD39 and CD73 controlling ATP and ADP degradation in adenosine monophosphate (AMP) and adenosine was identified as a pro-tolerogenic mediator dampening inflammation. [1] Immune cell subsets expressing CD39 interfere with the immune activation process through ATP consumption. [2] Interestingly, ATP degradation and adenosine production are abolished in regulatory T cells (Tregs) from IL-$10^{-/-}$ mice which fail to suppress contact hypersensitivity reactions. [3] Moreover, CD39 expression was described as a fundamental determinant for human Treg function and stability, both *in vitro* and in a xenograft versus host disease model *in vivo.* [4] Consistently, recent studies showed that only human memory Tregs (mTregs), the most stable and suppressive subset of CD4 Tregs, [5] express CD39 and showed immune suppression through the production of adenosine. [6–8]

We recently investigated this Treg subset in kidney transplanted patients with stable graft function (STA, proteinuria < 1 g for 24 hours and creatinemia < 150 µmol/L) under immunosuppressive treatment and tolerant patients with a stable kidney graft function and immunosuppressive treatment withdrawal since at least one year (TOL). We reported an increased proportion of mTregs in drug-free TOL patients, whereas the mTreg proportion remains low in STA patients. [9] Higher proportion of mTregs in blood from TOL is associated with a significant increase of FoxP3 Treg-specific demethylated region (TSDR) demethylation, a higher suppressive function, and CD39 expression by mTregs. [9] The mechanisms responsible for the gain of suppressive capacities within the complete arsenal of Tregs, as well as their potential involvement in the transplantation tolerance process, remains unclear. In this study, we investigated the ATP degradation capacities of mTregs in both TOL and STA. Our study demonstrates for the first time a pro-tolerogenic T cell balance with conserved mTregs extracellular ATP/ADP degradation capacities associated with increased mTreg frequency in TOL, whereas mTregs from STA are not able to degrade such amount of extracellular ATP/ADP. Finally, whereas *in vitro* immunosuppressive drug treatment affects mTreg proportion, it has no effect on the CD39-dependent ATP degradation pathway. This suggests that mTregs ATPase activity may take place long after immunosuppressive drugs arrest and favor establishment of a pro-tolerogenic state as an intrinsic active regulatory mechanism.

RESULTS

Clinical characteristics of transplant patients

Two groups of kidney recipients were included in the study: 13 TOL and 19 STA. Twenty-three healthy volunteers (HV) were also included as controls. The criteria for operational tolerance were previously described in detail.[10] In TOL, immunosuppressive drugs were stopped due to noncompliance (n = 9) or for cause of medical conditions (n = 4). STA were treated with calcineurin inhibitors: tacrolimus (n = 17) or cyclosporine A (CsA, n = 1), costimulation blocker belatacept (n = 1), mycophenolate mofetil/mycophenolate acids (n = 17), and corticotherapy (n = 2) at the date of blood sampling. After transplantation, 1 STA and 5 TOL (before they developed their tolerance state) experienced acute rejection episodes. Apart for recipient age at transplantation, donor age and time post-transplantation that are clearly dependent on the TOL state,[10] there were no significant differences in donor type, infections, and human leukocytes antigen mismatches among the two groups of kidney recipients. All clinical parameters are provided in Table 1.

Operationally tolerant patients display a pro-tolerogenic environment

We previously reported an increased frequency and regulatory capacities of mTregs expressing an elevated level of CD39 in the blood of TOL compared to STA. [9] We confirmed the increased proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}CD127^-FoxP3^+$ Tregs among CD4 T cells in HV and TOL compared to STA ($P < 0.05$ TOL vs. STA, $P < 0.0001$ HV vs. STA; Figure 1A). We report no correlation between circulating $CD4^+CD25^{hi}CD127^-FoxP3^+$ Tregs proportion and age, time post-transplantation, serum creatinine and human leucocyte antigen (HLA) mismatch at transplantation (Supplementary Figure 1A). In analyzing Treg homeostasis, we did not note any significant modification in the proportion of each subsets among total Tregs between TOL, STA and HV (Supplementary Figure 1C). We also confirmed that among CD4 T cells, only mTreg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD45RA^-FoxP3^{hi}$) frequency was significantly increased in TOL and HV compared to STA ($P < 0.05$ TOL vs. STA and $P < 0.0001$ HV vs. STA; Figure 1B, supplementary Figure 1B, C). We found no correlation between age, serum creatinine, HLA mismatch at transplantation, time after drug cessation and mTreg frequency in the two groups of transplanted patients (Figure 1C, D, E). When analyzed for all kidney recipients, we found a correlation between time post-transplantation and mTreg frequency, which was not found when we analyzed separately TOL and STA (Figure 1C). We found in TOL, like HV, a higher proportion of mTregs which was associated with a higher mTreg/$CD4^+CD25^-$ effector T cell ratio compared to STA ($P < 0.05$ TOL vs. STA; $P < 0.0001$ HV vs. STA; Figure 1F, Supplementary Figure 1 D) whereas mTregs/$CD8^+CD25^-$ effector T cell ratio was higher in HV compared to STA and TOL ($P < 0.00001$ STA vs. HV; $P < 0.05$ TOL vs. STA; Figure 1F). We also analyzed cytokine secretion of the different subsets of regulatory T cells (Supplementary

Figure 2A) and reported the same proportion of IL-10 secreting cells among mTregs and nonTregs for TOL, STA and HV, whereas we observed an increased proportion of IL-10 positive cells among nTregs in TOL compared to HV (P < 0.01 TOL vs. HV; Figure 1G). Concerning the other cytokines, we reported no significant modification of IL-17A, IL-4 and IL-13 secretion by mTregs, nTregs and nnTregs between TOL, STA and HV, whereas IFNg secretion is significantly increased in mTregs from STA compared to HV (P < 0.05 for STA vs. HV; Figure 1H, Supplementary Figure 2B).

Circulating mTregs from operationally tolerant patients maintain capabilities to degrade extracellular ATP

Because the expression of CD39 is increased at the surface of mTregs of TOL compared to STA, [9] we analyzed the mTreg's ability to degrade extracellular pro-inflammatory ATP and to release tolerogenic mediators AMP and adenosine. We observed a significantly higher ATP degradation by mTregs from TOL and HV compared to STA (*P* < 0.05 TOL vs. STA and *P* < 0.005 STA vs. HV; Figure 2A). We then quantified AMP and adenosine production by using mass spectrometry. Only mTregs from TOL and HV were able to degrade substantial amounts of ATP to AMP (4.46% and 12.03% respectively) whereas mTregs from STA only degrade small amounts of ATP and ADP (0.87%; *P* < 0.005 HV vs. STA; Figure 2B). For adenosine production through CD73 activity we observed an important production by HV mTregs, whereas low and almost no ADO production by TOL and STA mTregs respectively (0.251% in TOL, 0.003% in STA, and 1.018% in HV; *P* = 0.2767 for HV vs. TOL; *P* < 0.05 for HV vs. STA; Figure 2B). We found no difference in the expression of CD73, which degrades AMP into adenosine, or CD26, which degrades adenosine into inosine, between TOL, STA, and HV (Supplementary Figure 3). At the end of the culture, the remaining ATP, AMP, adenosine and other degradation products (i.e., ADP or inosine) profiles are in favor of ATP degradation in HV and TOL compared to STA (Figure 2C, D). These data demonstrate that circulating mTregs from TOL, express a higher level of CD39 compared to STA, and maintain their ability to degrade extracellular ATP in the same manner as in HV; whereas mTregs from STA are unable to do so. These findings also indicate that mTregs from TOL and HV mainly act as extracellular ATP consumers, releasing AMP, more than adenosine producers. Because ATP acts as pro-inflammatory mediator through purinergic receptors activation and ADO acts as pro-tolerogenic mediator through ADORA receptors activation on both effector and regulatory T cells, we analyzed P2RX1, P2RX4, P2RX7, P2RY11, ADORA2A and ADORA2B expression in sorted $CD4^+CD25^-$ effector T cells, nTregs and mTregs. First, we highlight almost no expression of P2RX1, P2RY11 and ADORA2B on these three cell subsets (data not shown). On effector T cells, we reported only P2RX7 expression is significantly increased in STA compared to HV (P < 0.05 STA vs. HV, P = 0.113 for TOL vs. HV; Figure 2E). The disparity

in purinergic receptor expression on nTregs from STA and TOL does not allow to conclude about their differential expression level compared to HV (Supplementary Figure 3C). We report no significant difference in P2RX7, P2RX4 and ADORA2A expression by mTregs between TOL, STA and HV (Figure 2F). This suggests that, in term of purinergic receptor expression, memory Tregs TOL, STA and HV are all able to bind to extracellular ATP and ADO. Interestingly, on effector T cells, P2RX7 expression is higher in STA compared to HV (3.26 and 1.07 for STA and HV respectively; $P < 0.05$ for STA vs. HV). This receptor is known to be crucial in the pro-inflammatory function of extracellular ATP. Then in STA, ATP which is not degraded by mTregs could bind its P2RX7 receptor on effector $CD4^+CD25^-$ T cells and increase their survival and proliferation.

CD39/CD73 mTreg expression is not affected by calcineurin inhibitor treatments

The Treg profile and function are similar in TOL and HV but different in STA, suggesting a possible effect of immunosuppressive drugs. STA were taking tacrolimus (n = 17), CsA (n = 1), and MMF (n = 17). Thus, we investigated the effect of these three drugs on (i) total Tregs and Treg subset frequencies, (ii) CD39 and CD73 expression by mTregs, and (iii) their ability to degrade extracellular ATP. Peripheral blood mononuclear cells were cultured overnight with tacrolimus, CsA, or MMF. [11,12] The impact on Treg subsets and expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases was analyzed by flow cytometry. None of the three treatments significantly affected the frequency of total Tregs after 16 hours of culture (Figure 3A). Under CsA and tacrolimus, a significant decrease of mTreg (fold change of 0.6815 and 0.8450 respectively) and an increase of non-Treg (fold change of 1.207 and 1.137 respectively) frequencies were observed (Figure 3A). A decrease in FoxP3 expression was observed only for total CD4 T cells under CsA (Figure 3B), a significant decrease in the expression of FoxP3 by mTregs was observed for both CsA and tacrolimus treatments and CD25 expression by mTregs is significantly decreased in CsA condition exclusively (Figure 3C). Neither mTreg CD39 nor CD73 expression levels and ATP degradation capacities were affected by treatments *in vitro* (Figure 3C, D). These data show that, the decreased mTreg frequency in STA may be due to immunosuppressive drug treatment, their lack of CD39 expression and ATP degradation capacity are not affected, at least *in vitro*.

DISCUSSION

One of the main challenges in transplantation remains the improvement of therapeutic strategies to avoid rejection while limiting drug side-effects and comorbidities. [13] Operational tolerance, observed in kidney recipients who maintain a stable graft function after immunosuppressive drug treatment withdrawal, [10,14] offers a unique model for the identification of immune regulation pathways that may lead to the limitation of these treatments. We and

others previously reported the presence of lymphocyte populations with regulatory capacities in these patients [9,15–19] and rodent models of tolerance induction [20,21]. But the translation of these observations to the clinic remains to be clearly established.

We initially highlighted an increased number of Tregs and FoxP3 mRNA expression in the blood of kidney transplanted tolerant patients compared to patients with chronic rejection. [15,16,22] This was also described in the context of liver transplantation : after treatment withdrawal a higher proportion of circulating and intragraft Tregs was shown in the patients who develop a tolerance state, before downregulation of the liver pro-inflammatory signature indicating an active mechanism of regulation. [23] Lately, in kidney transplanted tolerant patients, we characterized these Treg subpopulations according to their expression of CD45RA/RO, FoxP3 and their regulatory functions. [9] We reported a higher proportion of $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$ $CD45RA^-FoxP3^{hi}$ mTregs in the blood of TOL with higher suppressive properties and a specific pattern of FoxP3 TSDR demethylation. In this study, and in accordance with our previous results, [15,16] we report that TOL harbor a physiological mTreg/$CD4^+CD25^-$ effector T cell ratio similar to HV, which is not seen in STA. Whereas cytokine secretion from mTregs is not altered between TOL, STA and HV, we reported an higher level of IL-10 secretion among total CD4 T cells in TOL compared to STA which is mainly due to an increase in IL-10 secretion by nTregs, known to be more prone to secrete IL-10 compared to mTregs. Moreover, mTregs from TOL are able to degrade ATP/ADP in the same manner as in HV. This suggests that TOL exhibit conserved physiological mechanisms of regulation that may be altered by immunosuppression in STA. In accordance, mTreg CD39 expression is altered on mTregs from STA, which partially lack extracellular ATP/ADP degradation capacity.

Despite growing evidence on the function of Treg expressing CD39 in the control of immune responses through the degradation of the pro-inflammatory mediator ATP, [6–8] its role in the field of transplantation remains unclear. [24] Here, we provide the first evidence for a Treg/ectonuleotidase-CD39 pathway as a potential actor in kidney allograft tolerance. In human, and in accordance with our results, CD39 expression was shown to be restricted to Tregs with a memory phenotype, $CD45RO^+CCR6^+$ and $CD45RA^-CD45RO^+$, [7] and to be correlated with FoxP3 expression among $CD4^+CD25^{hi}$ T cells. [6] Moreover, in an inflammatory context, such as graft attack by the immune system, tissue injury results in ATP release by necrotic cells acting as a damage-associated molecular pattern and exhibits pro-inflammatory function. [1] The decline of extracellular ATP level through its degradation into ADP and AMP by CD39 is now considered as an immunomodulatory mechanism. [4,6,8,25] Further degradation of AMP by the CD73 molecule leads to the generation of adenosine which has its own anti-inflammatory function through adenosine 2A receptor binding, resulting in an increase of Treg activity, [26,27] a decrease of effector T cells function, [27–29] and the induction of tolerogenic antigen-presenting cells. [30] In human, the regulatory T cell–dependent purinergic signaling is

associated with treatment-dependent remission of inflammatory bowel disease, [31] pathogenic Th17 suppression in multiple sclerosis, [32] and Th17 control in autoimmune hepatitis. [33] Then, CD39 acts as a negative feedback mechanism to reduce the inflammatory process and immune responses to restore physiological conditions and cell homeostasis. [26–30,34–39] In the setting of transplantation, our work demonstrated that mTregs from both HV and TOL are able to degrade substantial quantities of extracellular ATP, whereas mTregs of STA only degrade small amounts. ATP degradation in TOL and HV leads to AMP and, to a lesser extent, adenosine production. The absence of a differential CD73 expression profile between TOL, STA and HV is not surprising. In contrast with what is observed in mice, CD73 is not always co-expressed with CD39 on human mTregs. [7]

Based on the known role of ATP as an effector T cell proliferation enhancer, [40] the ability of mTregs from TOL and HV to degrade ATP is concordant with their higher suppressive function on effector CD4 T cells compared to STA. [9] Moreover, we show that these effector T cells in STA express high level of the P2X7 receptor, involved in ATP-dependent pro-inflammatory response, compared to HV. These data suggest a role of the ATP degradation function of CD39-expressing mTregs in human after kidney transplantation, maintaining a pro-tolerogenic environment leading to the modulation of effector T cell function. In this context, CD39 expression has been shown to be modulated by the milieu. In particular, chronic inflammation, with continuous antigen stimulation increased levels of IL-2 or TGFß, may lead to activation and expansion of $CD39^+$ Tregs. [41–43] In contrast to $CD39^{lo}$ Tregs, $CD39^{hi}$ Tregs sustain their suppressive abilities and exhibit higher FoxP3 expression within an inflammatory environment [4]. TOL offer a such a milieu with permanent graft antigen stimulation and a TGFß environment [44] that is not controlled by immunosuppressive drugs and that may result in Foxp3 TSDR demethylation, increased CD39 expression, and mTreg suppressive activity to help alleviate inflammation.

The fact that STA harbor a lower proportion of mTregs with a defect in their capacity to degrade extracellular ATP raises the issue of the effects of immunosuppressive drugs. We demonstrate here that total $CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^+$ Treg frequency does not differ depending on immunosuppressive treatment but is associated with a decreased proportion of highly suppressive $CD45RA^-FoxP3^{hi}$ mTregs and an increase proportion of non-suppressive $CD45RA^-FoxP3^{lo}$ non-regulatory $FoxP3^+$ T cells in calcineurin inhibitor-based treatments. These data are in agreement with another study describing the role of calcineurin inhibitors on Tregs and subpopulations which reported a decrease proportion of Tregs after 3 days of treatments which is mainly due to the decrease of memory $CD45RA^-$ $FoxP3^{hi}$ Tregs [45]. Then, we highlight that this decrease in highly suppressive mTregs occurs only after 16 hours of calcineurin inhibitors treatments. Previous studies also reported a decreased expression of FoxP3 in CD4 T cells and Tregs exposed to CsA [46,47] and an increased proportion of $FoxP3^-$

"ex Tregs" after tacrolimus treatments, [48,49] whereas MMF does not modify Treg homeostasis and FoxP3 expression pattern *in vitro.* [50] Accordingly, we report here a decrease of CD25 and FoxP3 expression in mTregs under CsA and tacrolimus treatments. Because all STA included in our study were taking one of these two drugs, these data suggest that both the decreased frequency of mTregs and the lack of FoxP3 Treg expression in stable kidney recipients may be due to these treatments. In parallel, we also assessed the potential role of immunosuppressive drugs on CD39/CD73 expression and ATP degradation. Neither calcineurin inhibitors (tacrolimus and CsA) nor MMF significantly affect the expression of the ectonucleotidases CD39 and CD73 on total CD4 T cells and mTregs and their ATP degradation capacities. This suggests that the mTreg CD39 expression level and ATP degradation differences observed between the kidney recipients are not directly linked to immunosuppressive drug treatments. The fact that CD39-dependent function of mTregs, with all the limitations of an artificial *in vitro* model, is not dependent on treatments is instrumental and suggests that active mechanisms may be involved or maintained in TOL but not in STA.

Finally, several studies illustrate the extensive role of CD39 expression with ATP/adenosine independent suppressive function and a role in the stability of Tregs *per se*. In accordance with our previous observations on a higher mTregs demethylation level of the FoxP3 TSDR and higher suppressive capacities in TOL, these data suggest a strong stability of Tregs in these patients. [4]

In summary, we report new findings on the metabolic function of Tregs and potential immune regulatory pathways involved in operational tolerance, with a higher proportion of mTregs harboring a higher ATP degradation function. Our findings also highlight the role of calcineurin inhibitor treatments in the modification of the Treg homeostasis, with a lower proportion of the highly suppressive mTreg subset in patients with stable graft function under immunosuppressive drugs, whereas treatments *per se* have no effect on the ATP degradation function of mTreg.

Our previous findings and those of this study prompt us to question on the dynamic of mTregs and involvement of CD39/ATP pathway in operational tolerance. It would be interesting to know if this pro-tolerogenic environment is already present early after transplantation and/or how it is acquired during the time. Another interesting question would be if this ATPase function is also found in the transplanted kidney. Moreover, expression of ATP, AMP and adenosine receptors on T cells infiltrating the graft would be of interest knowing that their expression could be modulated according to the inflammation environmenet. However, because these patients are discovered fortuitously, we are limited in terms of biological samples early after transplantation and access to graft biopsies, which for such patients is ethically difficult. Moreover, operational tolerance status remains a rare clinical situation which limit us in the number of patients and studies. Finally, in this study, the

modification of the CD39 expression on mTregs between TOL and STA prompt us to investigate immunosuppressive drugs effect *in vitro*. We think analyzing mTregs ATPase activity in transplanted patients under different treatments and dosage would be of interest.

METHODS

Patients and study cohorts

The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study. All patients who participated gave written informed consent. A total of 32 kidney transplant patients were included: 13 TOL and 19 STA. Twenty-three HV were added as a control. A summary of the clinical data is presented in Table 1. The criteria for operational tolerance were previously described in detail. [10] Operational tolerance is defined as stable kidney graft function in the absence of immunosuppressive treatments for at least 1 year. [10,14] Stable kidney graft function is defined by creatinine level < 150 µmol/L and proteinuria < 1 g/24 hours for at least 1 year. For all experiments, patients were selected for sex and age at sample collection to obtain homogeneous groups.

Antibodies, flow cytometry, and cell sorting

For memory Treg cell proportion analysis, peripheral blood mononuclear cells were thawed and rested one night in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 1 million/mL). The following antibodies and reagents were used for flow cytometry and cell sorting: CD3-BUV395 (UCHT1), CD25-BV786 (M-A251), CD4-BV650 (SK3), CD39-PECF594 (TU66), CD127-BV450 (HIL-7R-M21), CD73-BV605 (AD2), CD73-APC (AD2), CD45RA-PE (HI100), CD4-FITC (RPA-T4), (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), CD45RA-APCeFluor780 (HI-100), FoxP3-PercpCy5.5 (PCH101) (eBioscience, San Diego, CA, USA), CD26-PE Cy5 (BA5b) (Biolegend, San Diego, CA, USA) and CD25-AlexaFluor647 (Immunotech, Marseille, France). For intracellular staining, FoxP3 Fixation/Permeabilization kit was used (eBioscience, San Diego, CA). LIVE/DEAD Fixable Yellow kit were used to exclude dead cells during staining (Life Technologies, Carlsbad, USA). $CD4^+$ T Cell Isolation Kit was used for CD4 T cells enrichment before mTreg cell sorting (Mitlenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). BD LSRFORTESSA X20, Myltenyi autoMACS pro Separator and BD FACSARIA II were used for analysis, cell enrichment and cell sorting respectively. The cell sorting strategy of $CD4^+CD25^{hi}CD45RA^-$ mTregs, $CD4^+CD25^{lo}CD45RA^+$ nTregs, $CD4^+CD25^-$ effector T cells and validation of the mTregs makers after sorting are presented in Supplementary Figure 4A, B, C and D.

Cytokine secretion assay

For CD4 T cells subset secretion assay, peripheral blood mononuclear cells were thawed and rested one night in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 1 million/mL). $CD4^+$ T Cell Isolation Kit was used for CD4 T cells enrichment (Mitlenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD4 T cells were then cultured at 1 million/mL in complete medium and activated for 5 hours with PMA (50 ng/mL), Ionomycine (1 µg/mL) with Brefeldin A (1X) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) to block intracellular trafficking. The following antibodies and reagents were used for flow cytometry: CD3-BUV395 (UCHT1), CD25-BV786 (M-A251), CD4-BV650 (SK3), IL-10-APC (JES3-19F1), IL-17A-PE (SCPL1362), IL-13-PE (JES10-5A2), IL-4-APC (MP4-25D2) and IfnG-FITC (B27) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), CD45RA-APCeFluor780 (HI-100), FoxP3-PercpCy5.5 (PCH101) (eBioscience, San Diego, CA, USA). For cytokine secretion assay, FoxP3 Fixation/Permeabilization kit was used (eBioscience, San Diego, CA). LIVE/DEAD Fixable Yellow kit were used to exclude dead cells during staining (Life Technologies, Carlsbad, USA). BD LSRFORTESSA X20 and Myltenyi autoMACS pro Separator were used for analysis and cell enrichment respectively. The CD4 T cells cytokine secretion analysis is presented in Supplementary Figure 2A.

Quantitative PCR gene analysis

Sorted mTregs, nTregs and effector T cells from thawed peripheral blood mononuclear cells of TOL, STA and HV were frozen in TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at -80°C. qPCR was performed on a StepOnePlus instrument (Thermo Fisher Scientific) using commercially available primer and probe sets (Taqman, Thermo Fisher Scientific) for the 6 tested genes (P2RX1, P2RX4, P2RX7, P2RY11, ADORA2A, ADORA2B) and 1 reference gene (B2M).

ATPase activity measured by ATP hydrolysis

Sorted mTregs from fresh peripheral blood mononuclear cells of TOL, STA and HV were cultured in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 1 million/mL) for 16 hours. Then, there were washed and cultured in PBS (0.4 million/mL) for 30 minutes with 10 µM ATP at 37°C. The concentration of unhydrolyzed extracellular ATP was determined in the supernatant using the ATPlite luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. A calibration curve obtained with pure ATP (0–10 µmol/L) was used to calculate the ATP concentration in each sample. Experiments were performed using Spark 10M (TECAN, Männedorf, Switzerland).

For immunosuppressive drugs effects, fresh peripheral blood mononuclear cells from HV were cultured in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 1 million/mL) for 16 hours in the presence or absence of tacrolimus (1 ng/mL), CsA (100 ng/mL), or MMF (100 ng/mL). Then mTregs were sorted, washed with cold PBS and cultured in PBS (0.4 million/mL) for 30 minutes with 10 µM ATP at 37°C. The concentration of unhydrolyzed extracellular ATP was determined using the ATPlite luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. A calibration curve obtained with pure ATP (0–10 µmol/L) was used to calculate the ATP concentration in each sample. Experiments were performed using Spark 10M (TECAN, Männedorf, Switzerland).

All ATP lite assay validations in term of biochemical linearity in initial ATP concentration, time, cell concentration and CD39 inhibitor assays (ARL 67156; Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) are presented in Supplementary Figure 5A, B, C and D respectively.

AMP and adenosine measurement by mass spectrometry

Sorted mTregs from fresh peripheral blood mononuclear cells of TOL, STA and HV were cultured in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 1 million/mL) for 16 hours. As above, cells were culture with known concentration of extracellular ATP. After centrifugation, AMP and adenosine levels within cell supernatants were analyzed by mass spectrometry as previously described. [51] Briefly, an internal standard working solution was prepared by mixing guanosine (m/z=284.09) and guanosine monophosphate (m/z=364.06) with matrix solution (5 mg/mL α-cyano-4-hydroxycinnamic dissolved in 70% acetonitrile/0.1% TFA). Equal volumes of analyte and internal standard solutions were mixed and 2 µL spotted onto the MALDI-TOF target plate. For each spot 40 mass spectra (50 shots/spectrum) were acquired in positive reflector ion mode in the m/z 250 to 370 range with a 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Proteomics Analyzer (ABSciex, Villebon sur Yvette, France). The spectra were averaged and the analyte/internal standard peak area ratios were calculated as response factors. A calibration curve obtained with pure adenosine (0–50 µmol/L) and AMP (0–50 µmol/L) was used to calculate the concentration in each sample.

Statistical analysis

Non-parametric Kruskal-Wallis tests with Dunn's ad hoc pairwise comparisons, non-parametric Spearman tests, non-parametric Friedman tests with Dunn's multiple comparison tests, Two Way ANOVA tests with Tukey's multiple comparisons tests, Two Way RM ANOVA test with Dunnett's multiple comparisons test, Mann-Whitney tests and Chi-squared tests for categorical

variables were performed using Prism software version 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients who participated in this study and the physicians who helped us recruit patients: G. Blancho, L. Braun, D. Cantarovitch, R. Crochette, J. Dantal, A. Garnier, M. Hourmant, B. Hurault de Ligny, H. Janbon, G. Lefrancois, C. Legendre, B. Le Mauff, H. Le Monies De Sagazan, A. Meurette, M.-C. Moal, C. Noel, E. Pillebout, M. Rabant, J.F. Subra, A. Testa, D. Ribes, F. Villemain, and J. Zuber. We also thank Pr Antoine Magnan for his scientific advices and his involvement in this study and Yodit Feseha for manuscript revision. Finally, we thank J. Desfrancois-Noel, N. Marec, and L. Haro from the Cytocell Cytometry Facility in Nantes, C. Laroque and N. Bec from the PP2I Facility at the Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier and the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Nantes for expert technical assistance.

This work was conducted in the context of the “Fondation Centaure” (RTRS), which supports a French transplantation research network, the DHU Oncogreffe and the LABEX TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX- 0070_TRANSPLANTEX). This work has been carried out thanks to the support of the LabEx IGO program (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the «Investissements d’Avenir» French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This research was also supported by INSERM and IHU-CESTI institutes receiving financial support from the French Government managed by the National Research Agency (Investment into the Future Program ANR-10-IBHU-005), Nantes Metropole, and the Pays de la Loire Region. MD was supported by grants from the French Research Ministry, the “Fondation Centaure” and the LabEx IGO. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the of the official views of the National Institutes of Health.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors have no significant competing financial, professional or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this manuscript.

REFERENCES

1. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F *et al.* Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 2006; **112**: 358–404.

2. Leal DB, Streher CA, Neu TN *et al.* Characterization of NTPDase (NTPDase1; ecto-apyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; **1721**: 9–15.

3. Ring S, Enk AH, Mahnke K. Regulatory T cells from IL-10-deficient mice fail to suppress contact hypersensitivity reactions due to lack of adenosine production. *J. Invest. Dermatol.* 2011; **131**: 1494–502.

4. Gu J, Ni X, Pan X *et al.* Human CD39(hi) regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cell. Mol. Immunol.* 2016.

5. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; **30**: 899–911.

6. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007; **110**: 1225–32.

7. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P *et al.* Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am. J. Transplant.* 2010; **10**: 2410–20.

8. Schuler PJ, Saze Z, Hong C-SS *et al.* Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2014; **177**: 531–43.

9. Braza F, Dugast E, Panov I *et al.* Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; **26**: 1795–805.

10. Brouard S, Pallier A, Renaudin K *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am. J. Transplant.* 2012; **12**: 3296–307.

11. Matz M, Lehnert M, Lorkowski C *et al.* Combined standard and novel immunosuppressive substances affect B-lymphocyte function. *Int. Immunopharmacol.* 2013; **15**: 718–25.

12. Arroyo Hornero R, Betts GJ, Sawitzki B *et al.* CD45RA Distinguishes CD4+CD25+CD127-/low TSDR Demethylated Regulatory T Cell Subpopulations With Differential Stability and Susceptibility to Tacrolimus-Mediated Inhibition of Suppression. *Transplantation* 2017; **101**: 302–309.

13. Dantal J, Soulillou J-PP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2005; **352**: 1371–3.

14. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A *et al.* Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 2006; **6**: 736–46.
15. Louis S, Braudeau C, Giral M *et al.* Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; **81**: 398–407.
16. Braudeau C, Racape M, Giral M *et al.* Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int.* 2007; **20**: 845–55.
17. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B *et al.* Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**: 1848–61.
18. Chesneau M, Michel L, Dugast E *et al.* Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2015; **26**: 2588–98.
19. Newell KA, Asare A, Kirk AD *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 2010; **120**: 1836–47.
20. Scalea JR, Tomita Y, Lindholm CR *et al.* Transplantation Tolerance Induction: Cell Therapies and Their Mechanisms. *Front Immunol* 2016; **7**: 87.
21. Braza F, Durand M, Degauque N *et al.* Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? *Am. J. Transplant.* 2015; **15**: 2288–300.
22. Brouard S, Le Bars A, Dufay A *et al.* Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients. *Transpl. Int.* 2011; **24**: 536–47.
23. Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G *et al.* Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2007; **7**: 309–19.
24. Salcido-Ochoa F, Tsang J, Tam P *et al.* Regulatory T cells in transplantation: does extracellular adenosine triphosphate metabolism through CD39 play a crucial role? *Transplant Rev (Orlando)* 2010; **24**: 52–66.
25. Goepfert C, Imai M, Brouard S *et al.* CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol. Med.* 2000; **6**: 591–603.
26. Naganuma M, Wiznerowicz EB, Lappas CM *et al.* Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J. Immunol.* 2006; **177**: 2765–9.
27. Ohta A, Ohta A, Madasu M *et al.* A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J. Immunol.* 2009; **183**: 5487–93.
28. Sevigny CP, Li L, Awad AS *et al.* Activation of adenosine 2A receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. *J. Immunol.* 2007; **178**: 4240–9.
29. Zarek PE, Huang C-TT, Lutz ER *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*

2008; **111**: 251–9.
30. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R *et al.* Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 2008; **112**: 1822–31.
31. Gibson DJ, Elliott L, McDermott E *et al.* Heightened Expression of CD39 by Regulatory T Lymphocytes Is Associated with Therapeutic Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; **21**: 2806–14.
32. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L *et al.* CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2009; **183**: 7602–10.
33. Grant CR, Liberal R, Holder BS *et al.* Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2014; **59**: 1007–15.
34. Wan P, Liu X, Xiong Y *et al.* Extracellular ATP mediates inflammatory responses in colitis via P2 × 7 receptor signaling. *Sci Rep* 2016; **6**: 19108.
35. Matsukawa T, Izawa K, Isobe M *et al.* Ceramide-CD300f binding suppresses experimental colitis by inhibiting ATP-mediated mast cell activation. *Gut* 2016; **65**: 777–87.
36. Imai M, Takigami K, Guckelberger O *et al.* Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival. *Transplantation* 2000; **70**: 864–70.
37. Imai M, Takigami K, Guckelberger O *et al.* CD39/vascular ATP diphosphohydrolase modulates xenograft survival. *Transplant. Proc.* 2000; **32**: 969.
38. Kinsey GR, Huang L, Jaworska K *et al.* Autocrine adenosine signaling promotes regulatory T cell-mediated renal protection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2012; **23**: 1528–37.
39. Koo TY, Lee J-GG, Yan J-JJ *et al.* The P2X7 receptor antagonist, oxidized adenosine triphosphate, ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by expansion of regulatory T cells. *Kidney Int.* 2017.
40. Trabanelli S, Ocadlíková D, Gulinelli S *et al.* Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation. *J. Immunol.* 2012; **189**: 1303–10.
41. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y *et al.* High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J. Immunol.* 2010; **185**: 134–43.
42. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E *et al.* Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J. Immunol. Methods* 2009; **346**: 55–63.
43. Rissiek A, Baumann I, Cuapio A *et al.* The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.* 2015; **58**: 12–20.

44. Brouard S, Mansfield E, Braud C *et al.* Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; **104**: 15448–53.
45. Whitehouse G, Gray E, Mastoridis S *et al.* IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2017.
46. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A *et al.* Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 2006; **108**: 390–9.
47. Hijnen D, Haeck I, van Kraats AA *et al.* Cyclosporin A reduces CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009; **124**: 856–8.
48. Akimova T, Kamath BM, Goebel JW *et al.* Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. *Am. J. Transplant.* 2012; **12**: 3449–61.
49. Gallon L, Traitanon O, Yu Y *et al.* Differential Effects of Calcineurin and Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors on Alloreactive Th1, Th17, and Regulatory T Cells. *Transplantation* 2015; **99**: 1774–84.
50. Lim D-GG, Joe I-YY, Park Y-HH *et al.* Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl. Immunol.* 2007; **18**: 94–100.
51. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N *et al.* Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer Immunol Res* 2015; **3**: 254–65.

FIGURES

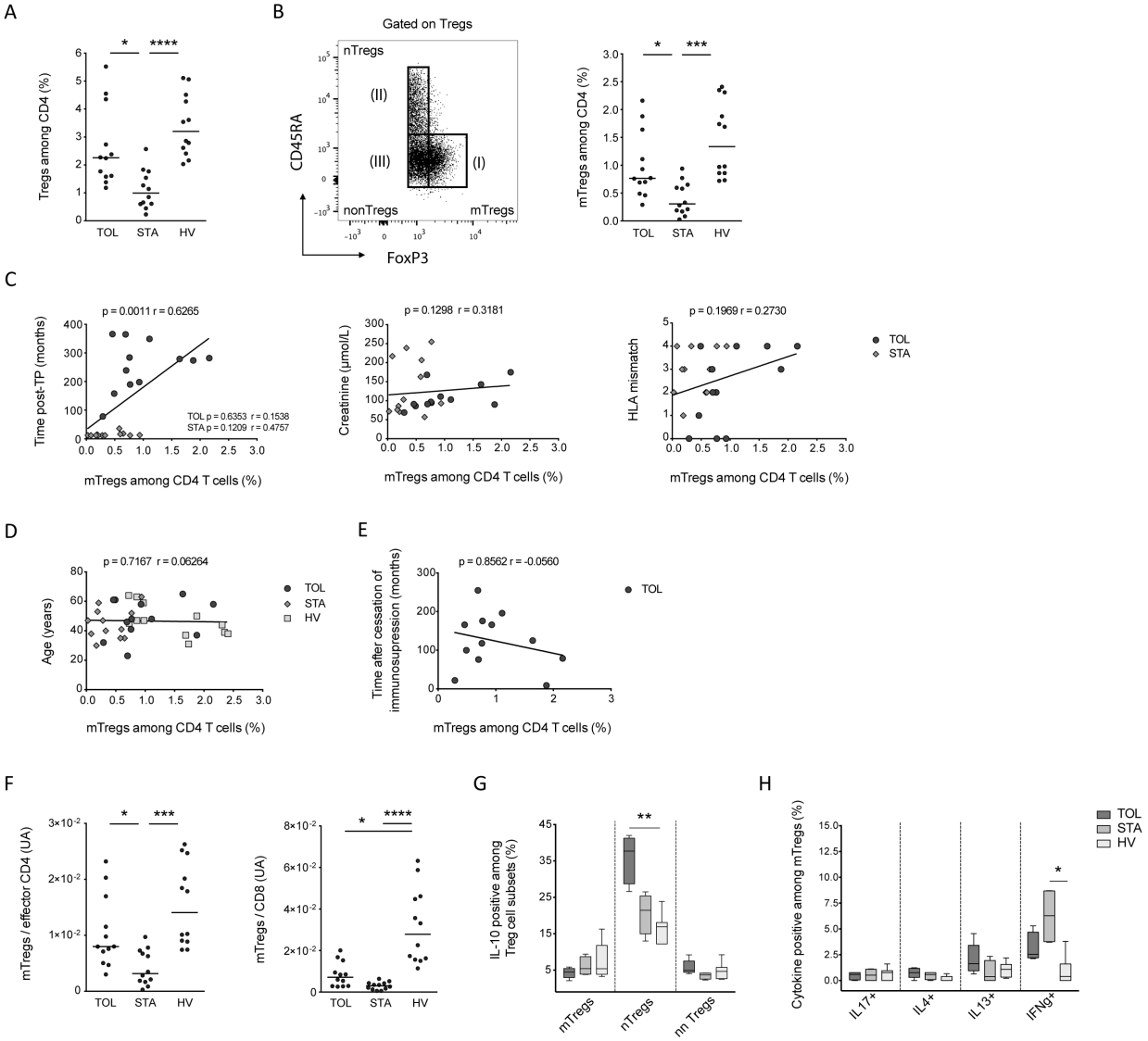


Figure 1: Unlike STA, TOL exhibit a memory Treg-related T cells pro-tolerogenic environment with a higher proportion of circulating mTregs. (A) Percentage of $CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^{+}$ Tregs in the blood of TOL (n=12), STA (n=12), and HV (n=12). (B) Gating strategy for the identification of (I) memory Tregs, (II) naive Tregs, (III) non-Tregs $FoxP3^{+}$ and proportion of memory Tregs in the blood of TOL (n=12), STA (n=12), and HV (n=12) individuals. (C) Correlations between the proportion of memory Tregs in CD4+ T cells and the time post-transplantation, the creatinine level and HLA mismatch at transplantation for TOL (n=12) and STA (n=12). (D) Correlation between the proportion of memory Tregs in CD4+ T cells and the age at sample collection for TOL (n=12), STA (n=12), and HV (n=12) individuals. (E) Correlations between the proportion of memory Tregs in CD4+ T cells and the time after immunosuppressive drugs cessation for TOL (n=12). (F) Ratio of the proportion of mTregs with effector $CD25^{-}$ CD4 T cells and CD8 T cells among CD3+ T cells. (G) Proportion of IL-10

secreting cells among mTregs, nTregs and nnTregs in HV (n=7), STA (n=4) and TOL (n=5). (H) IL-17, IL-4, IL-13 and IFNg positive cells among mTregs in HV (n=7), STA (n=4) and TOL (n=5). The results are expressed as medians *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001

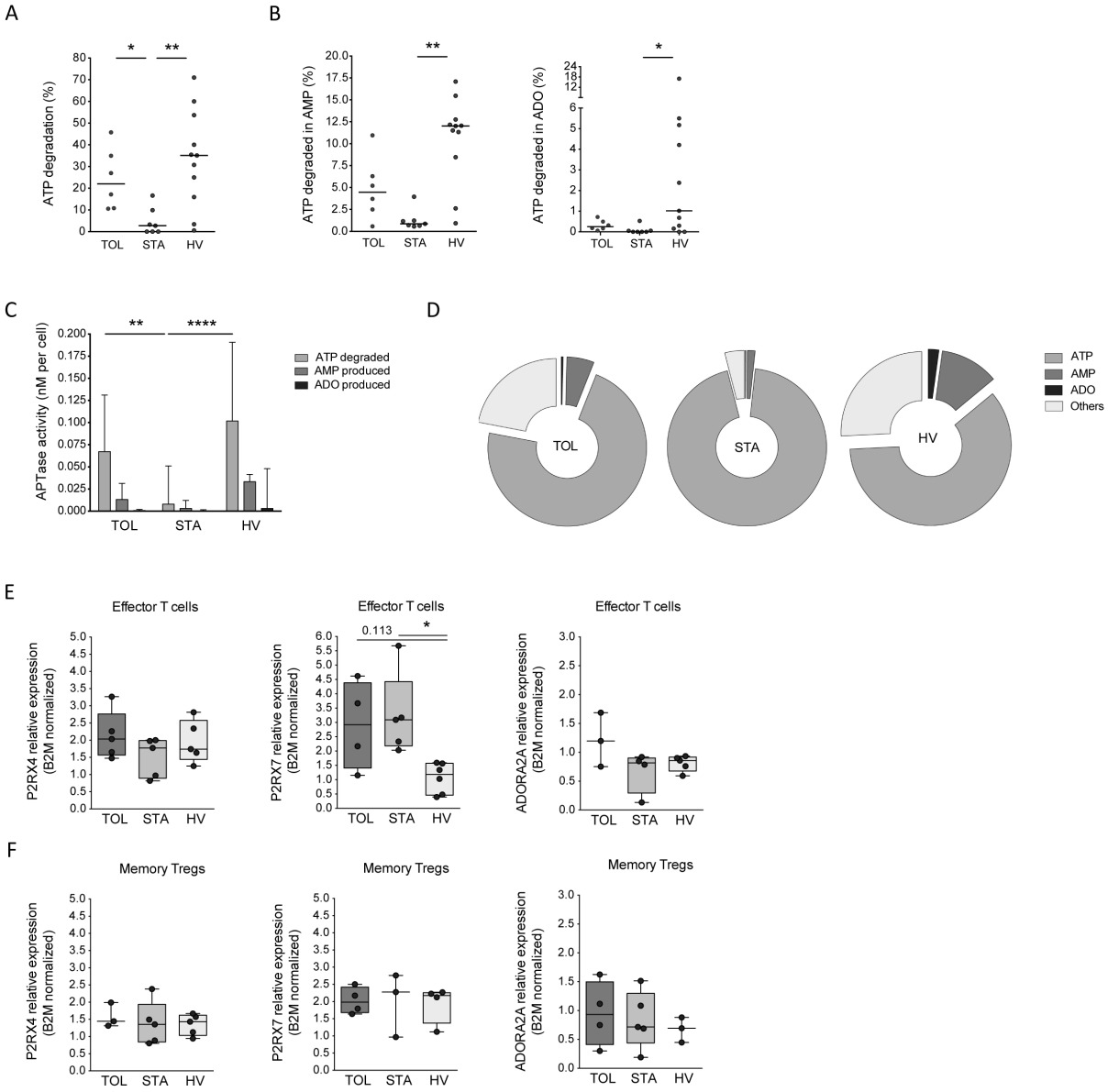


Figure 2: ATPase activity of mTregs from HV and kidney transplanted patients (A) *In vitro* ATP degradation percentage by sorted mTregs cultured for 30 min in the presence of 10 µM ATP for TOL (n = 6), STA (n = 7), and HV (n = 11). (B) ATP degradation in AMP and adenosine (ADO) by mTregs after culture with 10 µM ATP for TOL (n = 6), STA (n = 7), and HV (n = 11). The concentrations of AMP and adenosine were determined by mass spectrometry. (C) Per-cell basis concentration of degraded ATP, produced AMP, and produced adenosine after culture. (D) Representative diagram of ATP remaining and degradation products after mTreg culture with ATP. (E) ATP and adenosine receptors expression on effector T cells from HV, STA and TOL. (F) ATP and adenosine receptors expression on mTregs from HV, STA and TOL. The results are expressed as medians **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001

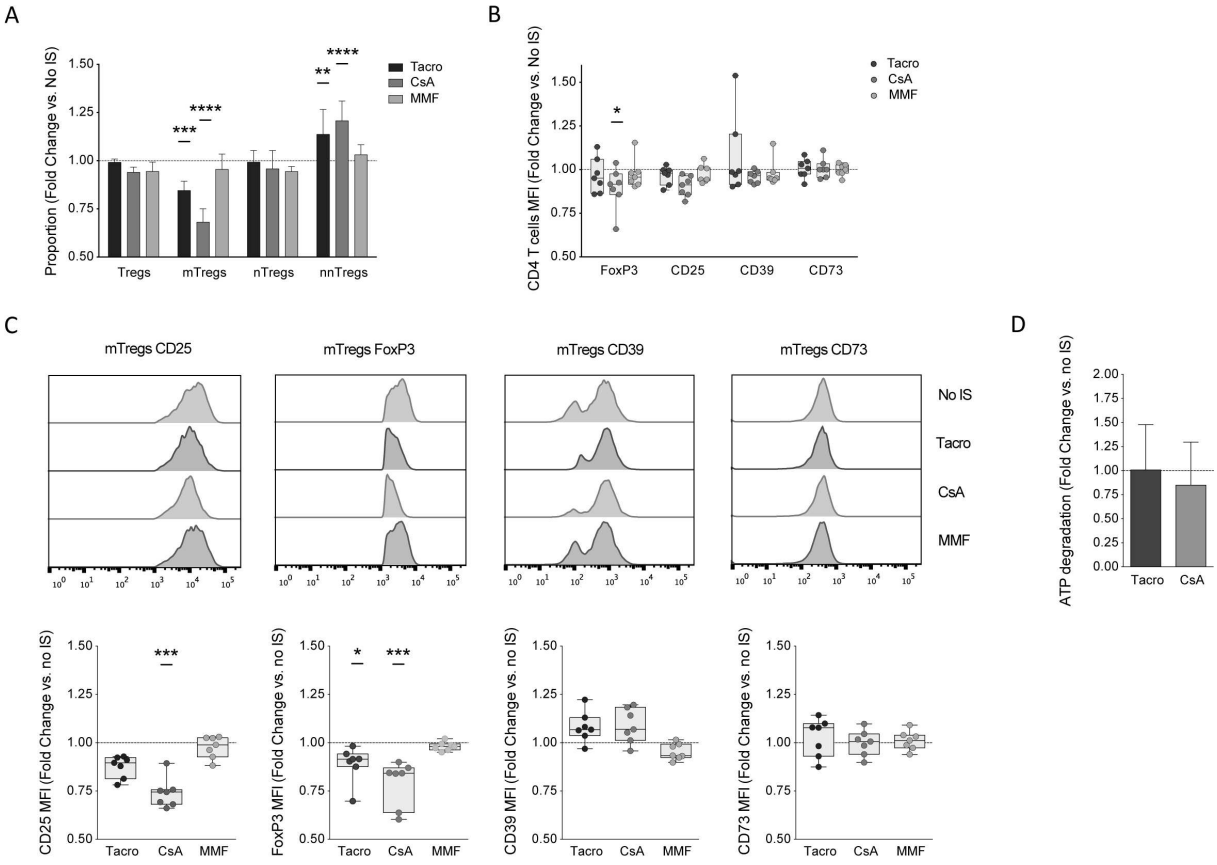
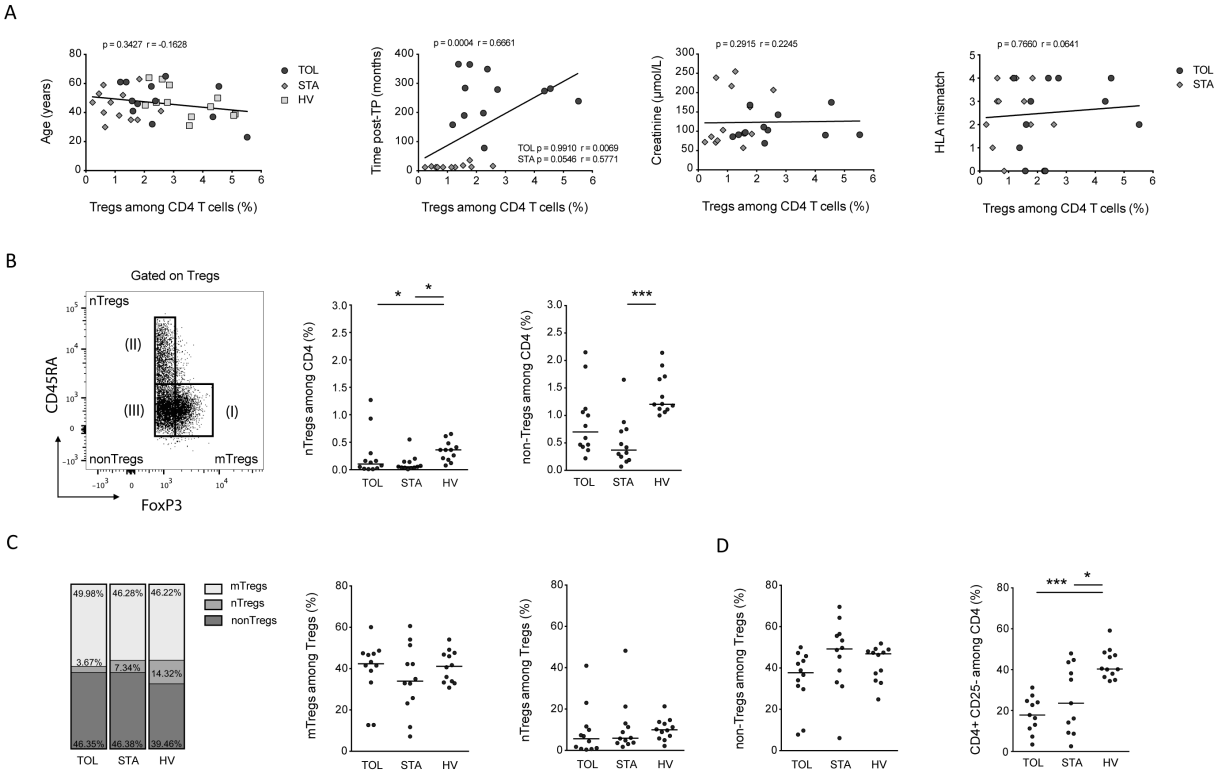
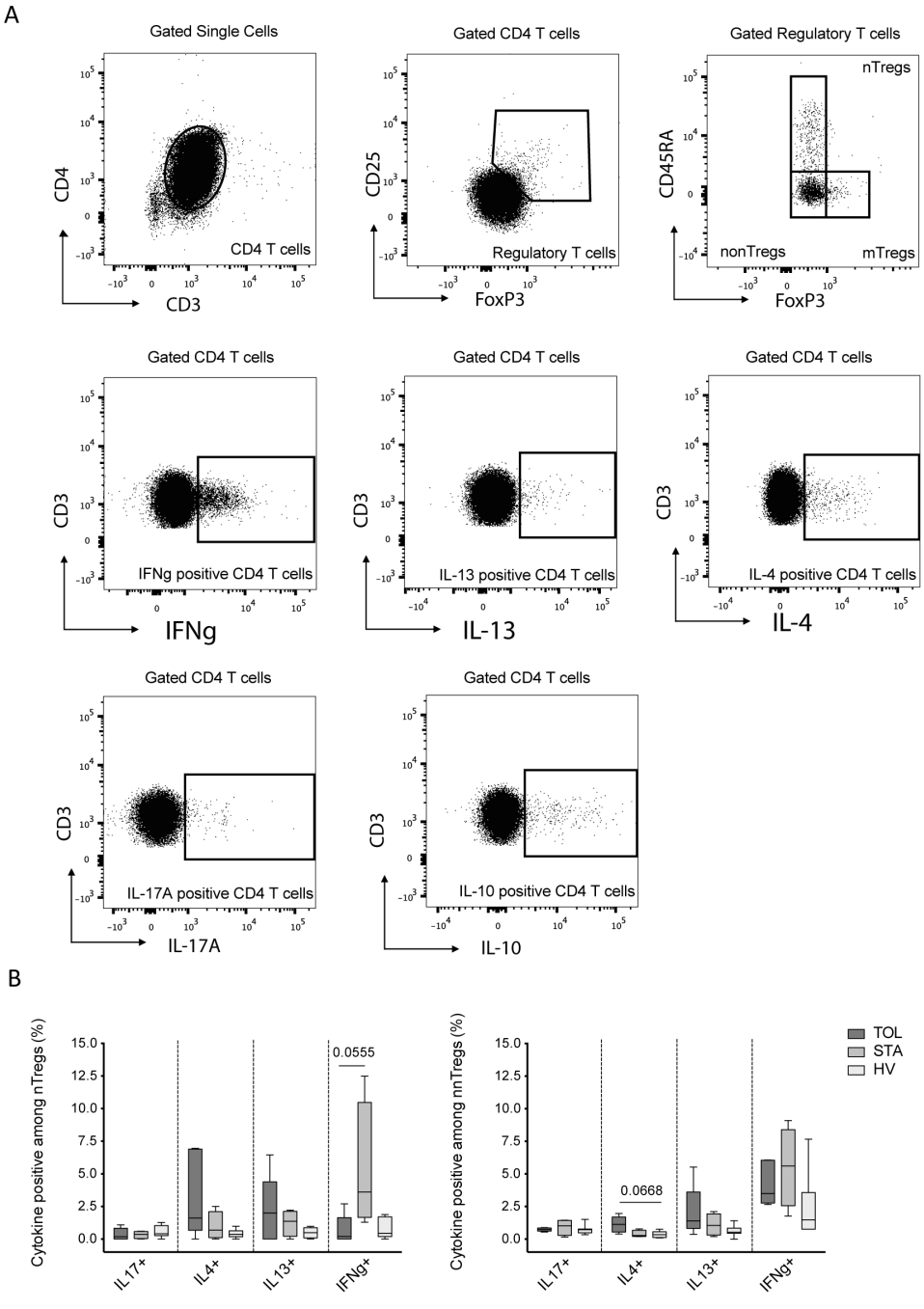


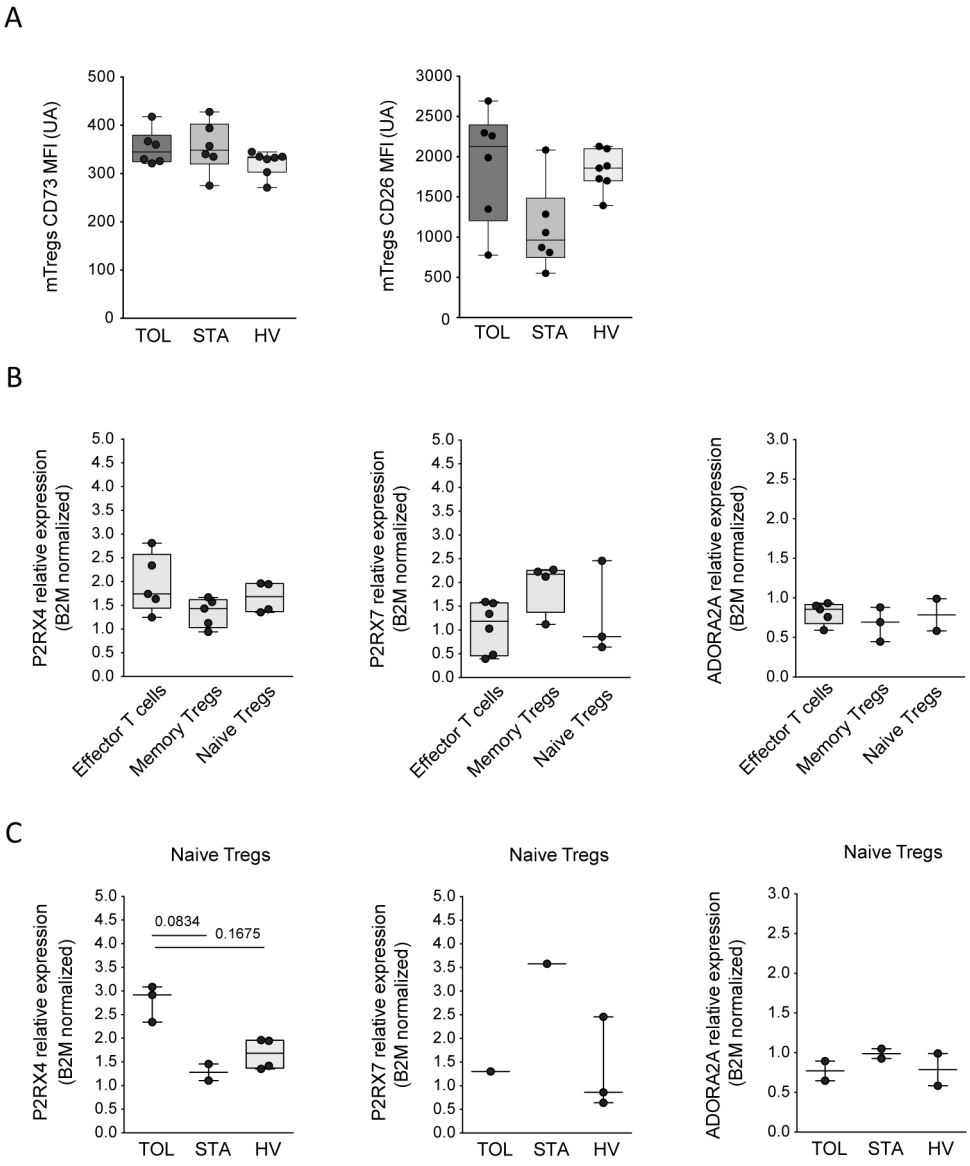
Figure 3: Effect of immunosuppressive drugs (IS) on regulatory T cells subsets and expression profile and memory Tregs ATPase activity. (A) *In vitro* culture of healthy donors peripheral blood mononuclear cells with tacrolimus (n = 7), CsA (n = 7), MMF (n = 7) or no IS (n = 7) and analysis of total Tregs and Treg subpopulation proportions. (B) Analysis of the Tregs and ATPase activity-related molecules in CD4 T cells after culture with and without immunosuppressive drugs. (C) Expression profile of memory Tregs according to immunosuppressive drugs treatments. (D) *In vitro* ATP degradation percentage by sorted mTregs after 16h of culture with tacrolimus and CsA or no immunosuppressive drug. The concentration of remaining extracellular ATP was determined using the ATPlite assay. The results are represented as fold changes vs. no immunosuppressive drug and expressed as medians. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001 for treatments vs. cultured in medium without immunosuppressive drugs.



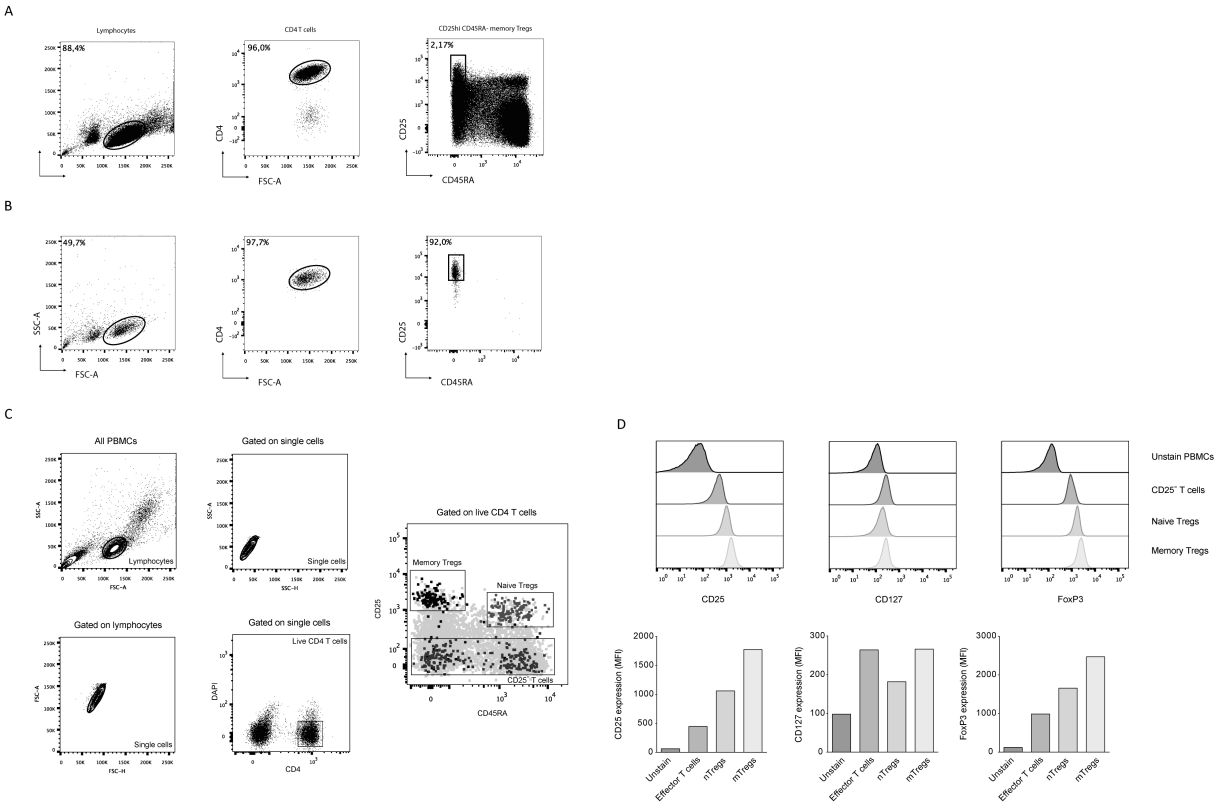
Supplementary Figure 1: Analysis of total Treg correlation with clinical data and Treg subpopulation homeostasis. (A) Correlation between the proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{lo}FoxP3^{+}$ Tregs in CD4+ T cells and the age at sample collection, the time post-transplantation, the creatinemia, and the HLA mismatch at transplantation. (B) Gating strategy for the identification of (I) memory Tregs, (II) naive Tregs, (III) non-Treg $FoxP3^{+}$ cells and proportion of naive Tregs and non-Tregs among CD4 in the blood of TOL (n = 12), STA (n = 12) and HV (n = 12) individuals. (C) Representative plot of Treg subpopulation homeostasis among total Tregs and proportions of mTregs, nTregs and non-Tregs among Tregs in the blood of TOL (n = 12), STA (n = 12), and HV (n = 12). (D) Proportion of effector CD4+ $CD25^{-}$ T cells among CD4 T cells in the blood of TOL (n = 12), STA (n = 12), and HV (n = 12). The results are expressed as medians. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001.



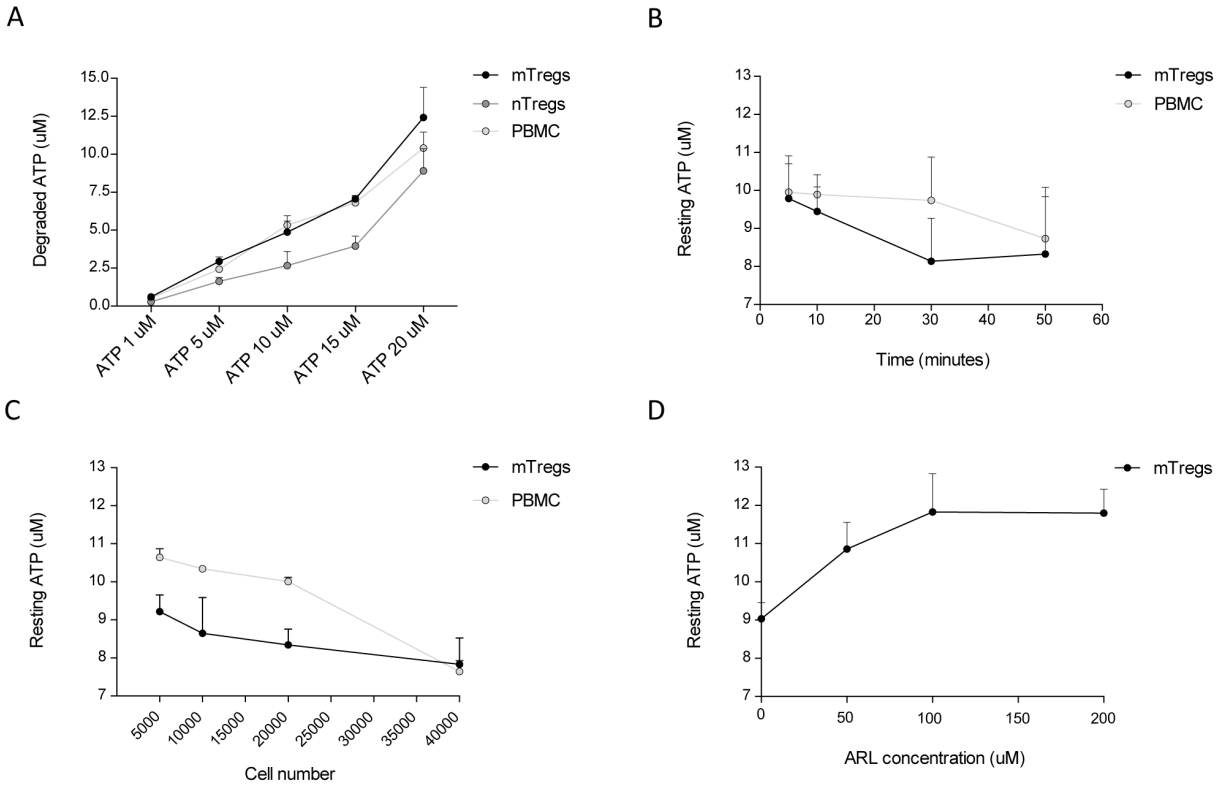
Supplementary Figure 2: Analysis of the cytokine secretion by Tregs subsets. (A) Gating strategy for the analysis of IFNg, IL-4, IL-13, IL-10 and IL-17A expression on total CD4 T cells, nTregs, nnTregs and mTregs. (B) Proportion of cytokines secreting cells among nTregs in HV (n=7), STA (n=4) and TOL (n=5). The results are expressed as medians with range. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001.



Supplementary Figure 3: Expression profile of T cells subsets in TOL, STA and HV. (A) Expression of CD73 and CD26 by mTregs from TOL (n = 6), STA (n = 6), and HV (n = 7) individuals. (B) P2RX4, P2RX7, and ADORA2A expression by $CD4^{+}CD25^{-}$ effector T cells, mTregs and nTregs from healthy volunteers. (C) P2RX4, P2RX7, and ADORA2A expression by naive Tregs from TOL, STA and HV. The results are expressed as the medians ± range



Supplementary Figure 4: (A) Gating strategy for memory Treg cell sorting after CD4 enrichment using Miltenyi magnetic sorting. (B) Representative plots of memory Treg sorting purity. (C) Gating strategy for the validation of the Treg markers expression on sorted cells. (D) Analysis of CD25, CD127 and FoxP3 expression by sorted $CD4^+$ effector T cells, mTregs and nTregs from HV.



Supplementary Figure 5: Biochemical validation of the ATPase assay. (A) Analysis of the ATP degradation by mTregs, nTregs and PBMCs according to the initial concentration of ATP. Culture 30 minutes at 4°C with 40 000 cells in 200 µL of PBS. (B) Analysis of the ATP degradation by mTregs and PBMCs according to time of culture. Culture at 4°C with 40 000 cells in 200 µL of PBS and 10 µM of ATP. (C) Analysis of the ATP degradation by mTregs and PBMCs according to the initial number of cells. Culture 30 minutes at 4°C, in 200 µL of PBS with 10 µM of ATP. (D) Analysis of the ATP degradation by mTregs according to concentration in CD39 inhibitor; Culture 30 minutes at 4°C, with 40 000 cells in 200 µL of PBS with 10 µM of ATP. The results are expressed as the means ± SEM.

TABLE

Table 1: Demographic and clinical characteristics of the patients and healthy volunteers.

Demographic and transplant Characteristics	Groups			P value
	HV	TOL	STA	
Participants, *n*	23	13	19	
Sex, *n*				*0.5452*
Women	5 (21.7)	5 (38.5)	6 (31.6)	
Men	18 (78.3)	8 (61.5)	13 (68.4)	
Age, *yr*	45 (30-64)	50.5 (22-70)	49 (30-69)	*0.4259*
Age at transplantation, *yr*	_	30 (3-48)	46 (29-61)	***< 0.0005***
Donor type, *n*				*0.3141*
Cadaveric	_	9 (69.2)	16 (84.2)	
Living	_	4 (30.8)	3 (15.8)	
Donor age, *yr*	_	23.5 (6-41)	45 (26-64)	***< 0.0005***
Donor sex, *n*				*0.5984*
Women	_	6 (46.2)	7 (36.8)	
Men	_	7 (53.8)	12 (63.2)	
HLA Missmatch, *n*	_	2 (0-4)	3 (0-5)	*0.1737*
HLA-A	_	1 (0-2)	1 (0-2)	
HLA-B	_	1 (0-2)	1 (0-2)	
HLA-DR	_	0 (0-2)	1 (0-2)	
Time after transplantation, *mo*	_	276.5 (77-412)	16 (11-192)	***< 0.0001***
Creatinine level, *µmol/L*	_	101.5 (57-282)	97 (66-168)	*0.4120*
Infections after transplantation, *n*				*0.1975*
Bacteria	_	3 (23.1)	10 (52.6)	
Virus	_	2 (15.4)	3 (15.8)	
Acute rejection episodes, n	_	5 (38.5)	1 (5.3)	**< 0.05**
Time of immunosupression cessation, *mo*	_	166 (22-302)	_	
Reason for cesation, *n*				
Medical condition	_	4 (30.8)	_	
Noncompliance	_	9 (69.2)	_	
Immunosuppressive therapy, n				
Tacrolimus	_	_	17 (89.5)	
Cyclosporin A	_	_	1 (5.3)	
Belatacept	_	_	1 (5.3)	
Mycophenolate mofetil / mycophenolate acids	_	_	17 (89.5)	
Corticotherapy	_	_	2 (10.5)	

Data are given as median (range) or n (%), unless otherwise indicated

HV: Healthy Volunteers TOL: Tolerant kidney Transplanted Patients STA: Stable kidney Transplanted Patients

II. ARTICLE N°2

Une proportion importante de lymphocytes T CD4+ CD25hi FoxP3+ circulants peu de temps après transplantation pulmonaire est associée à la survenue de Syndrome de Bronchiolite Oblitérante

High circulating CD4+ CD25hi Foxp3+ T cell subpopulation early after lung transplantation is associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome

M. Durand, P. Lacoste*, R. Danger, L. Jacquemont, C. Brosseau, E. Durand, G. Tilly, J. Loy, A. Fourreau, P.J. Royer, A. Tissot, A. Roux, M. Reynaud-Gaubert, R. Kessler, S. Mussot, C. Dromer, O. Brugière, J.F. Mornex, R. Guillemain, J. Claustre, N. Degauque, A. Magnan, S. Brouard, COLT and SysCLAD consortia*

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

(Article in press dans Journal of Heart and Lung Transplantation, janvier 2018)

Le Syndrome de Bronchiolite Oblitérante (BOS) reste aujourd'hui une limitation majeure pour la survie à long terme des greffons après une transplantation pulmonaire. Un des enjeux actuels reste donc la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la survenue du BOS ainsi que l'identification de biomarqueurs prédictifs. Ce travail a pour objectif l'étude du profil lymphocytaire T circulant de patients transplantés pulmonaires afin d'identifier un potentiel biomarqueur prédicitif de la survenue du BOS. Une analyse longitudinale approfondie du profil lymphocytaire T CD4 et T CD8 a été réalisée sur des échantillons sanguins de patients ayant développé un BOS et de patients stables 3 ans après transplantation. Les profils lymphocytaires T ont été phénotypés a 1 mois et 6 mois post-transplantation, au moment du diagnostic du BOS et 6 à 12 mois avant le diagnostic du BOS. Nous n'avons mis en évidence aucune différence entre les patients ayant développé un BOS et les patients stables au moment du diagnostic du BOS et dans les mois qui précèdent le diagnostic. Cependant nous montrons une augmentation de la fréquence de lymphocytes T CD4+CD25hiFoxP3+ (Tregs) circulants dans les 6 premiers mois après transplantation chez les patients BOS comparés aux patients stables. En effet, un seuil de 2.4% de Tregs dès un mois post-transplantation permet de discrimer les patients BOS des patients stables. Nous avons ensuite validé ce seuil sur un second groupe de patients transplantés à 6 mois post-transplantation. Les patients présentant une fréquence de Tregs supérieure à 2.4% dans les 6 premiers mois après transplantation présentent un risque deux fois plus élevé de développer un BOS dans les 3 ans. Cette étude est la première a montrer une augmentation de la proportion de Tregs circulants chez les patients transplantés pulmonaires développant un BOS et suggére son interet en tant que biomarqueur prédictif de la survenue du BOS.

HIGH CIRCULATING $CD4^{+}CD25^{hi}FOXP3^{+}$ T CELL SUBPOPULATION EARLY AFTER LUNG TRANSPLANTATION IS ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT OF BRONCHIOLITIS OBLITERANS SYNDROME

Maxim Durand[1,2,3†], Philippe Lacoste, MD, PhD[4,5†], Richard Danger, PhD[1,2], Lola Jacquemont, MD[1,2], Carole Brosseau, PhD[1,2], Eugénie Durand[1,2], Gaelle Tilly[1,2], Jennifer Loy[4,5], Aurore Foureau[4,5], Pierre-Joseph Royer, PhD[4,5], Adrien Tissot, MD[1–5], Antoine Roux, MD, PhD[6], Martine Reynaud-Gaubert, MD, PhD[7], Romain Kessler, MD, PhD[8], Sacha Mussot, MD[9], Claire Dromer, MD[10], Olivier Brugière, MD, PhD[11], Jean François Mornex, MD, PhD[12], Romain Guillemain, MD[13], Johanna Claustre, MD[14], Nicolas Degauque, PhD[1,2], Antoine Magnan, MD[4,5,$], Sophie Brouard, DVM, PhD[1,2,15,$] & COLT and SysCLAD Consortia*

[1] Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.
[2] Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France.
[3] Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France
[4] Institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291, Université de Nantes, Nantes, France
[5] Institut du thorax, CHU de Nantes, Nantes, France
[6] Hôpital Foch, Suresnes, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France
[7] CHU de Marseille, Aix Marseille Université, Marseille, France
[8] CHU de Strasbourg, Strasbourg, France
[9] Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardiopulmonaire, Le Plessis Robinson, France
[10] CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
[11] Hôpital Bichat, Service de Pneumologie et Transplantation Pulmonaire, Paris, France
[12] Université de Lyon, INRA, UMR754, Lyon, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
[13] Hôpital Européen George Pompidou, Paris, France
[14] Clinique Universitaire de Pneumologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes, Inserm U1055, Grenoble, France
[15] Centre d'Investigation Clinique (CIC) Biothérapie, CHU Nantes, Nantes, France

* A complete list of members of the COLT and SysCLAD Consortia can be found in the acknowledgements.
† First authors contributed equally to this work.
$ Last authors contributed equally to this work.

Corresponding author / Reprint request
Sophie BROUARD, DVM, PhD. Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, 30, Boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes CEDEX 1, France.
Phone: +33 2 40 08 78 42, e-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

Short title
Increased Treg proportion associated with BOS development

ABSTRACT

Background: Chronic Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS) remains a major limitation for long-term survival after lung transplantation. The immune mechanisms involved and predictive biomarkers have still to be identified.

Objectives: The purpose of this study was to assess whether the peripheral blood T-lymphocyte profile could predict BOS in lung transplant recipients.

Methods: An in-depth profiling of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells was prospectively performed on blood cells from stable and BOS patients with a longitudinal follow-up. Samples were analyzed at 1 and 6 months after transplantation, at the time of BOS diagnosis, and at an intermediate time point at 6 to 12 months before BOS diagnosis.

Results: Whereas no significant difference was found for T cell compartments at BOS diagnosis or several months before, we report an increase in the $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell subpopulation in BOS patients at 1 and 6 months after transplantation (3.39%±0.40 vs 1.67%±0.22 in STA, $P<0.001$). A $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell threshold of 2.4% discriminated BOS and stable patients at 1 month post-transplantation. This was validated on a second set of patients at 6 months post-transplantation. Patients with a proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells up to 2.4% in the 6 months following transplantation had a 2-fold higher risk of developing BOS.

Conclusions: This study is the first to report an increased proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells early post-transplantation in lung recipients who will develop BOS within 3 years, and support for its use as a BOS predictive biomarker.

Key words: Chronic Lung Allograft Dysfunction; Bronchiolitis Obliterans Syndrome; Regulatory T lymphocyte; T lymphocyte; Biomarker.

INTRODUCTION

Lung transplantation is a validated option for patients with end-stage lung diseases. However, patient survival is compromised by Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD). The obstructive form of CLAD, the Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS), is the most prevalent phenotype and affects up to 50% of lung transplant recipients (LTR) in the five years post-transplantation [1] . BOS development involves irreversible fibrotic processes which result in lung allograft obstruction, damage and progressive loss of function [1,2] .BOS diagnosis is currently based on a pulmonary function test and is defined as a decrease of at least 20% of the FEV_1 (forced expiratory volume in one second) from the baseline [3] . This FEV_1 decrease represents a clinical surrogate marker with low clinical interest as it is evidenced only when irreversible BOS has already developed [4] . There is therefore a need for early predictive biomarkers for preventing BOS initiation and development, especially within the first months and year post-transplantation where BOS carries the worst prognosis [5,6] . In this study, we assessed whether the circulating T cell profile would allow biomarkers associated with BOS development to be identified in patients from follow-up up to 3 years post-transplantation.

This is the first study reporting an increased proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells early post-transplantation in lung recipients who will develop BOS within 3 years, and its possible use as a BOS predictive biomarker.

METHODS

Patients

The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study. All patients were informed of the final use of their blood and signed an informed consent. This study was performed in the strict compliance of the ISHLT ethics statement. Blood samples were selected from lung transplant recipients enrolled in the multicentric longitudinal COLT study (COhort in Lung Transplantation, NCT00980967). Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS) is defined by a decrease of at least 20% of the maximum FEV_1 value recorded after transplantation. STA and BOS status were confirmed by repeated sessions of an ad hoc adjudication multidisciplinary committee using pulmonary function tests, computerized tomography, and after elimination of confounding factors in line with the ISHLT/ERS/ATS clinical practice guideline [7] as described elsewhere [8] . In this study, 82 lung transplant recipients (LTR) were enrolled and followed up to 3 years after transplantation. Fifty remained stable throughout the study whereas 32 developed BOS. These patients were selected according to the availibility of blood samples and to obtain homogeneous groups. Patients were sampled before transplantation, at 1 and 6 months after transplantation and every 6 months thereafter. Samples were therefore available at 1 and 6 months after transplantation but also 6 months to 1 year before the diagnosis of BOS

depending on the date of occurrence of FEV1 decline. Supplementary Figure 1 summarizes the patients chosen for $CD8^+$, $CD4^+$ and $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ analyses. Table 1 and Supplementary Table 1 describes the baseline characteristics of the whole cohort and the three groups of patients respectively.

Cell isolation and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation, frozen and stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Nantes. PBMCs were rapidly thawed by placing cryovials at 37°C, washed and stained. The antibodies used for staining CD8, CD4 and regulatory T cells are detailed in Supplementary Table 2. A FoxP3 Fixation/Permeabilization kit and Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (eBioscience, Santa Clara, USA) were used for intracellular staining of FoxP3 and Granzyme B (GZMB), Perforin (PERF) and Tbet respectively. Dead cells were excluded using the Zombie NIR™ Fixable Viability kit (BioLegend, San Diego, USA) or LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (eBioscience, Santa Clara, USA). The analysis of the different T cell subsets is described in Supplementary Table 3. BD LSRFORTESSA X20, BD LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and FlowJo were used for acquisition and analysis respectively.

Cytokine secretion assay

For Tregs secretion assay, peripheral blood mononuclear cells were thawed and rested one night in complete medium (RPMI-160, 10% FBS, 1% Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin; 5 million/mL). PBMCs were then cultured at 5 million/mL in complete medium and activated for 5 hours with PMA (50 ng/mL), Ionomycine (1 µg/mL) with Brefeldin A (1X) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MI, USA) to block intracellular trafficking. The following antibodies and reagents were used for flow cytometry: CD3-BUV395 (UCHT1), CD25-BV786 (M-A251), CD4-BV650 (SK3), CD127-BV450 (HIL-7R-M21), IL-10-APC (JES3-19F1), IL-17A-PE (SCPL1362), IL-13-PE (JES10-5A2), IL-4-APC (MP4-25D2) and IfnG-FITC (B27) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), CD45RA-APCeFluor780 (HI-100), FoxP3-PercpCy5.5 (PCH101) (eBioscience, San Diego, CA, USA). For cytokine secretion assay, FoxP3 Fixation/Permeabilization kit was used (eBioscience, San Diego, CA). LIVE/DEAD Fixable Aqua Blue kit were used to exclude dead cells during staining (Life Technologies, Carlsbad, USA). BD LSRFORTESSA X20 was used for analysis.

In vitro CD8 T cell stimulation

PBMCs were thawed by placing cryovials at 37°C and washed. After overnight culture, 5 million PBMCs were stimulated with anti CD3 (OKT3, 1µg/mL), anti-CD28 (28.2, 1µg/mL) and IL-15 (10ng/mL, Miltenyi) for 2 hours in complete RPMI medium (FBS 10%, Penicillin Streptomycin 100 U/mL, Glutamine 2 µM, Sodium Pyruvate 10 µM). Cellular activation was assessed using anti-CD25-FITC (M-A251; BD Biosciences) and anti-CD69-PerCP Cy5.5 (SK7; BD Biosciences) staining. BD LSR II (BD Biosciences) and FlowJo were used for acquisition and analysis respectively.

Statistical analysis

Longitudinal analysis was performed using two-way ANOVA followed by a Sidak's multiple comparisons test. Non-parametric Mann-Whitney tests and Kruskal-Wallis tests with Dunn's ad hoc pairwise comparisons were used to compare BOS and STA, and BOS, STA and HV T cell subset proportions at specific time-points. Non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were used to compare paired BOS and STA $CD8^+$ T cell subset proportions at BOS diagnosis and the immediate months before. Correlations were assessed using the Pearson test (for $n>30$) and non-parametric Spearman test (for $n<30$). Thresholds were determined using ROC curve analysis, as the value maximizing sensibility and specificity. BOS-free survival analyses were performed using the Kaplan-Meier Log-rank test. Cox proportional analysis was used for univariate time-to-event analysis between clinical, biological parameters and time to BOS with the R *survival* package (*Coxph* function, R software v. 3.3.2). Parameters with p value of Wald test < 0.2 were enterend into the multivariate analysis. Mann-Whitney tests and Chi-squared tests for categorical variables were performed using Prism software version 6 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Patient characteristics

Eighty-two LTR were enrolled in this study. After three years of follow-up 50 remained stable, whereas 32 developed BOS. Eight healthy volunteers were also included as controls (See "patients" in the Methods section). None of the already known risk factors of BOS significantly differed between the two groups of patients. Most of the patients received double lung transplantation and other transplant types (single lung, lobar and heart-lung) are equally represented among both groups. Recipient ages were not significantly different and no significant difference regarding acute rejection episodes, ischemic time, immunosuppressive treatment regimen and induction agents was apparent.

CD8 T cell immune profile analysis in the months preceding BOS and at the BOS event

To evaluate how the T cell profile could be associated with long-term BOS development, we analyzed $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell subset frequencies in the blood of STA and BOS patients at 6 and 12 months before the BOS and at the BOS diagnosis. We analyzed the distribution of $CD8^+$ subsets according to the expression of CD45RA and CCR7. The frequencies of $CD45RA^+CCR7^+$ naive, $CD45RA^-CCR7^-$ effector memory (EM), $CD45RA^-CCR7^+$ central memory (CM), and $CD45RA^+CCR7^-$ effector memory $CD45RA^+$ (TEMRA) $CD8^+$ T cells were not different between BOS and paired STA patients at the diagnosis of BOS or in the months before (Figure 1A, B). Since a modification of the CD8 compartment could also result in the alteration of functional markers related to their activation, such as CD28 or T-bet expression, or to their cytotoxic potential through the secretion of granzyme B (GZMB) and perforin (PERF), we analyzed the differentiation profile of memory EM and TEMRA $CD8^+$ T cells. At the time of diagnosis and in the months before, the activation status of memory $CD8^+$ T cells remained stable between the 2 groups of patients with no difference, as was the case for CD28 or T-bet expression or cytotoxic functions (GZMB and PERF expression) (Figure 1A, B). Finally, we tested the ability of $CD8^+$ T cells from BOS and STA patients to respond to short-term stimulation with anti-CD3, anti-CD28 and IL-15 with no difference for the regulation of CD25 and CD69 across both groups (Figure 1C).

Circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell proportions are increased in the early months post-transplantation in BOS patients

We analyzed the distribution of $CD4^+$ T cell subsets according to the expression of CD45RA, CXCR5, FoxP3 and CD25. Whereas no difference was found for $CD45RA^+CXCR5^-$ naive, $CD45RA^-CXCR5^-$ memory and $CD25^{hi}FoxP3^+$ subsets, we observed a trend for an increased proportion of $CD45RA^-CXCR5^+$ follicular helper $CD4^+$ T cells in BOS patients at 6 months before BOS diagnosis compared to STA at 18 months post-transplantation (BOS/STA fold change of 2.54, Figure 2A, Supplementary Figure 2B, C). Because of a trend in an increased proportion of $CD45RA^-CXCR5^+$ follicular helper $CD4^+$ T cells in the 6 months before the BOS diagnosis, we further analyzed $CD4^+$ T cell phenotypes earlier after lung transplantation (1 and 6 months) in order to identify early predictive biomarkers of BOS development. Despite a more variable $CD4^+$ T cell profile at 1 month post-transplantation than at BOS diagnosis and the months immediately before (Figure 2A, B), we did not observe a significant difference in total $CD4^+$, naïve $CD4^+$, memory $CD4^+$, or follicular helper $CD4^+$ T cells blood frequencies between BOS and STA patients (Supplementary Figure 2A). Interestingly, only circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells were significantly increased at 1 month post-transplantation in BOS compared to STA patients (3.36% ± 0.75 and 0.85% ± 0.28 respectively, $P<0.05$; Figure 2C). Because $CD4^+$ T cells expressing FoxP3 and CD25 are mainly known as regulatory T cells

(Tregs), we further analyzed this compartment according to the expression of CD45RA, FoxP3, CD15s and CD39. No specific enrichment was observed for $CD45RA^{-}FoxP3^{low}$ non-Tregs, $CD45RA^{-}FoxP3^{hi}$ memory Tregs, $CD45RA^{+}FoxP3^{low}$, naive Tregs, $CD15s^{+}FoxP3^{+}$ activated effector Tregs, or $CD39^{+}FoxP3^{+}$ Tregs between BOS, STA and HV patients (Figure 2D, E, Supplementary Figure 3A, B, C). These observations suggest that a global increase in the entire $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell compartment at 1 month post-transplantation is associated with BOS development within the 3 years following lung transplantation. This profile is stable over the 6 first months post-transplantation with an average proportion of 3.39% ± 0.40 and 1.67% ± 0.22 of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among $CD4^{+}$ T cells for BOS and STA respectively ($P<0.005$; Figure 3A, B, C). In order to better characterize suppressive capacities of these $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells, we analyzed their cytokine secretion profile. We report the same expression of IL-10 by Tregs for BOS, STA and HV (Figure 3D). Concerning the other cytokines, we report no significant difference in IL-17A, IL-4, IL-13 and IFNg secretion by $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells between BOS, STA and HV (Supplementary Figure 4). This suggest, that $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells, shown increased in proportion in the blood of BOS patients are effective regulatory T cells as in STA and HV with an equivalent cytokine secretion profile.

Circulating $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell proportion increased in BOS patients is not related to confounding factors

We analyzed induction and immunosuppressive drug effects, as well as recipient age, HLA mismatches, FEV_1 at blood sampling, primary graft dysfunction and acute rejection episodes association with CD4+CD25hiFoxP3+ proportion in transplanted patients. We show that this early increase of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells is not correlated with age, FEV_1 at blood sampling or HLA A, B and DR mismatch (Figure 3E). Among the whole cohort of lung transplanted patients, there is no significant difference in CD4+CD25hiFoxP3+ proportion in the 6 months post-transplantation according to the induction treatment (No Induction, ATG or Basiliximab) apart for ATG treated patients vs. no induction ($p < 0.05$) (Figure 3F). Because more BOS patients are treated with ATG compared to STA, we did the same analysis in BOS and STA independently. We report no significant difference of CD4+CD25hiFoxP3+ proportion in the 6 months post-transplantation according to the induction treatment (No Induction, ATG or Basiliximab) (Figure 3F). Immunosuppressive therapies at the blood sampling (Tacrolimus, Cyclosporin A, MMF and Corticotherapy) do not impact CD4+CD25hiFoxP3+ proportion in the 6 months post-transplantation in lung transplanted patients (Figure 3G). Finally, we report that $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells proportion early post transplantation is not significantly different between patients who experienced primary graft dysfunction or acute rejection episodes and those who did not (Figure 3H, I). These results suggest that the increased proportion of

$CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells in the 6 months post-transplantation in the blood of BOS patients compared to STA is not due to clinical confounding factors.

Lung recipients with $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells higher than a 2.4% threshold in the 6 first months after transplantation are at higher risk of BOS

Since circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells are elevated in the 6 months following lung transplantation in patients who will develop BOS, we investigated whether the proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells could be associated with BOS severity and/or BOS-free survival. First, we analyzed the correlation between the proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells in the 6 months after lung transplantation and FEV_1% decrease at BOS diagnosis which is the first clinical marker to stratify mild, moderate or severe BOS. We report no association between BOS severity and proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells early post-transplantation (r=0.076, p=0.756) (Figure 4A). Next, we analyzed how $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell proportions early post-transplantation could discriminate between patients who will maintain stable graft function and those who will develop BOS. We identified that at 1 month post-transplantation (8 BOS and 6 STA), a threshold of 2.4% of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells allowed to identified patients who would develop BOS or not in the 3 years of follow-up (ROC curve analysis, area under the curve=0.875, standard error=0.097 and p=0.020) with a sensitivity of 100% and a specificity of 75% (Figure 4B). Lung recipients with a proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells ≥2.4 % at 1 month after transplantation had a higher risk of developing BOS within 3 years (log-rank, P=0.0073, Figure 4C). Because assessment at 1 month after lung transplantation may be too early to draw definitive conclusions due to the effects of surgery or concomitant inflammatory events, we validated this threshold at 6 months post-transplantation in a prospective study on 24 STA and 11 BOS independent patients. Proportions of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells at 6 months post-transplantation still allowed sufficient discrimination between BOS and STA patients (area under the curve=0.786, standard error=0.087 and P=0.0073; Figure 4D) and lung recipients with $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells ≥2.4 % at 6 months after transplantation had a higher risk of developing BOS in the 3 years (specificity: 62%, sensitivity: 78%, log-rank, P=0.0418, Figure 4E). Altogether, this data shows that this threshold allows to distinguish as soon as 1 and 6 months post-transplantation the patients who will maintain stable graft function and those who will develop BOS within 3 years, with good specificity (69%), sensitivity (76%), and positive and negative predictive values of 57% and 85% respectively.

$CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells proportion higher than 2.4% in the 6 first months after transplantation is an independent risk factor for the development of BOS

Because we identified $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells proportion as a possible predictive biomarker of BOS development, we investigated how this parameter could be helpful to risk stratify patients as soon as 6 months post transplantation independently to other risk factors. To this end univariate time-to-event analysis was performed between clinical, demographical and biological parameters and time to BOS (Supplementary Table 4). Multivariate analysis highlighted that only CD4+$CD25^{hi}$FoxP3+ T cells proportion higher than 2.4% in the 6 first months post-transplantation (Wald test p value = 0.0012, HR = 0.17) and time-post transplantation at testing time (Wald test p value = 0.016, HR = 0.99) are significantly associated with BOS occurrence during time (likelihood ratio test p.value <0.0001) (Table 2).

DISCUSSION

The pathogenesis of BOS is still unknown and no satisfying biomarker is available so far. The recent identification of specific cellular subsets among the main immune cell populations offers the opportunity to deeply decipher the immune system at a time close to both transplantation and BOS development, and propose new potential biomarkers. We identified that the $CD8^+$ and $CD4^+$ compartments are not biased in BOS patients, neither at the time of BOS diagnosis nor in the 6 or 12 months prior. However, the proportion of the $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell subset was significantly increased in patients who will develop BOS within 3 years as early as 1 month post-transplantation.

Whilst the early infiltration of $CD8^+$ memory T cells into heart, kidney or liver grafts, has been shown to accelerate rejection and therefore represents a major barrier to long-term allograft survival [9–11] , the absence of modification in the $CD8^+$ T cell compartment may be surprising. However, results obtained in animal models of lung transplantation showed that immune responses differ to those observed for other organs, and lung infiltration by central memory $CD8^+$ T cells is critical for graft acceptance [12] . In humans, contradictory reports have been published regarding the modification of $CD8^+$ T cell compartment in BOS. Cytotoxic and pro-inflammatory $CD8^+$ T cells may be detected in broncho-alveolar lavage during chronic rejection [13–15] , whilst Budding et al. reported a similar proportion of naïve, effector memory and terminally differentiated effector $CD8^+$ T cells 5 months post-transplantation in BOS vs. STA patients [16] . In agreement with this report, we found no modification in the distribution of $CD8^+$ subsets or characteristics (differentiation profile, cytotoxic functions), neither at the time of diagnosis nor before. Accordingly, a comparison of the $CD8^+$ profile in blood and broncho-alveolar lavage would be of interest to decipher where active immune responses takes place during the pathophysiological development of BOS.

Whilst the global T cell profile was not different at the time of BOS or months before, we reported a modification of this profile at 1 month post-transplantation in patients who will develop BOS compared to STA. This observation, supported by the identification of early factor specific of BOS [17], suggests that the immune mechanisms leading to BOS development are already established immediately post-transplantation and that biomarkers may be identified earlier. We show an increased proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells in BOS patients as soon as 1 month after transplantation, which remains stable over the first 6 months post-transplantation. We report that this $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells increased proportion in BOS patients is not due to confounding factors such as induction treatments, immunosuppressive drugs, primary graft dysfunction or acute rejection episodes and is stable whatever the BOS severity at the diagnosis. Interestingly, $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells were mainly characterized as Tregs. Different research groups have reported Treg subsets with distinct regulatory/non-regulatory functions and stability in inflammatory contexts. Memory $CD45RA^-FoxP3^{hi}$ Tregs as opposed to naive $CD45RA^+FoxP3^{lo}$ Tregs and $CD45RA^-FoxP3^{lo}$ non-Tregs are described as a subset with high suppressive capacities [18] . $CD39^+$ Tregs have been characterized as memory Tregs [19,20] with a more stable and functional state under inflammatory conditions [21] . Finally, CD15s expression identified highly differentiated and suppressive Tregs in humans [22] . We found no bias toward a particular Treg subset between BOS and STA patients. Moreover, we assessed $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells cytokine profile at 6 months post-transplantation in BOS, STA and HV and report equivalent secretion of the pro-tolerogenic cytokine IL-10 and more generally the same cytokine secretion profile between the three groups of patients. The fact that highly suppressive Treg subsets (i.e. memory and $CD39^+$ Tregs) are increased, and that BOS $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells exhibit equivalent cytokine profile compared to STA and HV may suggest a regulatory phenotype and function.

Why this concomitant $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell increase is only detected in blood from patients who will develop a BOS years later and not in stable patients is an interesting question. Are these specific Tregs counteracting subclinical early inflammation and rejection processes that are not controlled effectively by immunosuppressive treatments, leading to an imprinted phenotype resulting in the development of BOS? The fact that these elevated $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells in BOS patients could be regulatory T cells may appear challenging because Tregs were described as potential regulators in an operational tolerance state [23,24] and were reported to favor good outcomes after solid organ transplantation [25] . However, they are also present in acute rejection and increased in response to immune activation [26–30] . In accordance with this hypothesis, studies reported that inflammatory episodes after transplantation such as acute rejection [31–36] , ischemia-reperfusion injuries [37] or primary graft dysfunction [38] are risk factors for BOS development. Furthermore, early post-transplant increase in pro-inflammatory serum chemokines and cytokines were found in the blood of BOS

compared to non-BOS patients [39]. Interestingly, in the context of lung transplantation, Greenland et al. reported that the proportion of $CD4^+CD25^+$ Tregs was significantly increased in the broncho-alveolar lavage of patients with acute rejection of grade > A1 who will develop BOS [40] , suggesting that this increase in Tregs could also be found in the target graft long before BOS development. This point nevertheless remains to be clarified and contradictory reports have been published. Whilst blood $CD4^+CD25^{hi}$ Tregs are significantly higher in STA compared to BOS patients at the time of diagnosis [41] , others found no difference in blood, or low BAL Tregs proportions being associated with BOS development in several independent studies [16,42–44] . Then, given the literature and our data showing this increase in circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$, with a regulatory phenotype, in BOS patients only early post-transplantation, we can think that these cells act as negative regulators of chronic dysfunction which are present to counter sub-clinical inflammation events directed toward the graft and prevent rejection. But, they could be not sufficient in number to be effective enough or even may display defective suppressive function a long time after transplantation. This hypothesis is reinforced by the fact that this regulatory $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ cells proportion is even more decreased as we get closer to the BOS event. Then, $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ cells are likely not deleterious and do not contribute to the BOS development and it appears their proportion in the 6 months following transplantation can be used as an early marker of the BOS development.

Indeed, we wondered if the $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ profile could be predictive of the occurrence of BOS and/or BOS-free survival for helping risk-stratifying lung recipients. Previous studies have already identified an association with CLAD markers [17,45–47] , but none of them demonstrated sufficient robustness to achieve clinical acceptance, mainly because of limitations or confounding variables that did not allow their link to BOS or other immune events to be conclusive. Here, we determined a $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell threshold at 1 month post-transplantation of 2.4%, allowing discrimination of BOS and STA patients with high sensitivity and specificity. Patients with a high proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells (up to 2.4%) presented a significantly higher risk of BOS development. This threshold was determined on a first set of 14 lung recipients at 1 month post-transplantation, and subsequently validated on another independent set of 35 lung recipients at 6 months post-transplantation. This threshold is sufficient to stratify patients with high or low risk of BOS-development. Patients with a threshold up to 2.4% of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ cells among CD4 T cells at 1 or 6 months present a significantly higher risk (2 fold) of developing BOS within 3 years post-transplantation. We finally reported that, contrary to the other known risk factors for BOS development, proportion of $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ up to 2.4% is an independent predictive risk factor for BOS event during time, from the 6 first months after transplantation.

In conclusion, while regulatory $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells may act as negative regulator of BOS development not efficient enough in the time to prevent chronic dysfunction, the use of their proportion in the 6 first months after transplantation as predictive biomarker is very encouraging. Although it was validated on two independent groups of lung transplanted patients, further studies and validation on larger cohorts are now necessary to know if this $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell profile, identified on frozen blood cells, may be used as a predictive biomarker of risk of BOS development using routinely collected fresh blood samples. Moreover, the underlying mechanisms leading to this increased proportion of regulatory $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cell in BOS patients remain to be identified. In this context, investigate the antigene specificity and, or alloreactivity of this cell subset would be of great interest. Unfortunately, it requires allograft-derived donor cells, from lung biopsies of BOS patients, that we do not have through this protocol. Also, although it cannot be performed for the same reason, the analysis of what is occurring in the target tissue could help to better understand the distribution and the contribution of these $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells in the BOS development regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients whose trust, support and cooperation were essential for the collection of the data in this study. We also thank J. Desfrancois-Noel, N. Marec, and L. Haro from the Cytocell Cytometry Facility in Nantes (SFR Bonamy) and the CIC Biotherapie for expert technical assistance.

STATEMENT OF CONFLICT OF INTEREST

The authors have no significant competing financial, professional or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this manuscript.

FUNDING SOURCES

This work was supported by grants from Vaincre La Mucoviscidose, l'Association Grégory Lemarchal. This research was also supported by French Research Ministry, Fondation Centaure (for M.D.), Société Française de Transplantation (for L.J.), INSERM, Labex IGO, University Hospital Institute (IHU)-European Center for Transplantation and Immunotherapy Services (CESTI) project (for C.B.), which received French Government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment in the Future" program (ANR-10-IBHU-005). The IHU-CESTI project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. We are indebted to Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2008 (Paris, France) Vaincre La Mucoviscidose (Paris, France) and Association Gregory Lemarchal

in launching the project within the 11 French lung transplantation centers and the Belgian lung transplantation center within COhort in Lung Transplantation (COLT), Programme transplantation 2008, PRTP-13, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00980967. SysCLAD study is an EU-funded project, HEALTH-F5-2012; grant agreement No. 305457 under the Seventh Framework Program (FP7). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The content is solely the responsibility of the authors.

COLT Consortium

Cohort of Lung Transplantation-COLT (associating surgeons; anesthetists-intensivists; physicians; research staff) **Bordeaux**: J. Jougon, J.-F. Velly, H. Rozé, E. Blanchard, C. Dromer; **Bruxelles**: M. Antoine, M. Cappello, M. Ruiz, Y. Sokolow, F. Vanden Eynden, G. Van Nooten, L. Barvais, J. Berré, S. Brimioulle, D. De Backer, J. Créteur, E. Engelman, I. Huybrechts, B. Ickx, T.J.C. Preiser, T. Tuna, L. Van Obberghe, N. Vancutsem, J.-L. Vincent, P. De Vuyst, I. Etienne, F. Féry, F. Jacobs, C. Knoop, J.L. Vachiéry, P. Van den Borne, I. Wellemans, G. Amand, L. Collignon, M. Giroux; **Grenoble**: D. Angelescu, O. Chavanon, R. Hacini, C. Martin, A. Pirvu, P. Porcu; P. Albaladejo, C. Allègre, A. Bataillard, D. Bedague, E. Briot, M. Casez-Brasseur, D. Colas, G. Dessertaine, M. Durand, G. Francony, A. Hebrard, M.R. Marino, D. Protar, D. Rehm, S. Robin, M. Rossi-Blancher; C. Augier, P. Bedouch, A. Boignard, H. Bouvaist, A. Briault, B. Camara, J. Claustre, S. Chanoine, M. Dubuc, S. Quétant, J. Maurizi, P. Pavèse, C. Pison, C. Saint-Raymond, N. Wion; C. Chérion; **Lyon**: R. Grima, O. Jegaden, J.-M. Maury, F. Tronc, C. Flamens, S. Paulus, J.-F. Mornex, F. Philit, A. Senechal, J.-C. Glérant, S. Turquier, D. Gamondes, L. Chalabresse, F. Thivolet-Bejui, C Barnel, C. Dubois, A. Tiberghien; **Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou**: F. Le Pimpec-Barthes, A. Bel, P. Mordant, P. Achouh, V. Boussaud, R. Guillemain, D. Méléard, M.O. Bricourt, B. Cholley, V. Pezella; **Marseille**: G. Brioude, X.B. D'Journo, C. Doddoli, P. Thomas, D. Trousse, S. Dizier, M. Leone, L. Papazian, F. Bregeon, B. Coltey, N. Dufeu, H. Dutau, S. Garcia, J.Y. Gaubert, C. Gomez, S. Laroumagne, G. Mouton, A. Nieves, Ch. Picard, M. Reynaud-Gaubert, J.M. Rolain, E. Sampol, V. Secq; **Nantes**: P. Lacoste, C. Perigaud, J.C. Roussel, T. Senage, A Mugniot, I. Danner, A Haloun, A. Magnan, A Tissot, S. Abbes, C. Bry, F.X. Blanc, T. Lepoivre, K. Botturi-Cavaillès, S. Brouard, R. Danger, J. Loy, M. Bernard, E. Godard, P.-J. Royer, E. Durand, K. Henrio, M. Durand, C. Brosseau, A. Foureau; **Le Plessis Robinson, Hôpital Marie Lannelongue**: Ph. Dartevelle, D. Fabre, E. Fadel, O. Mercier, S. Mussot, F. Stephan, P. Viard, J. Cerrina, P. Dorfmuller, S. Feuillet M. Ghigna, Ph. Hervén F. Le Roy Ladurie, J. Le Pavec, V. Thomas de Montpreville, L. Lamrani; **Paris, Hôpital Bichat**: Y. Castier, P. Mordant, P. Cerceau, P. Augustin, S. Jean-Baptiste, S. Boudinet, P. Montravers, O. Brugière, G. Dauriat, G. Jébrak, H. Mal, A. Marceau, A.-C. Métivier, G. Thabut, E. Lhuillier, C. Dupin, V. Bunel;

Strasbourg: P. Falcoz, G. Massard, N. Santelmo, G. Ajob, O. Collange O. Helms, J. Hentz, A. Roche, B. Bakouboula, T. Degot, A. Dory, S. Hirschi, S. Ohlmann-Caillard, L. Kessler, R. Kessler, A. Schuller, K. Bennedif, S. Vargas; **Suresnes**: P. Bonnette, A. Chapelier, P. Puyo, E. Sage, J. Bresson, V. Caille, C. Cerf, J. Devaquet, V. Dumans-Nizard, M.L. Felten, M. Fischler, A.G. Si Larbi, M. Leguen, L. Ley, N. Liu, G. Trebbia, S. De Miranda, B. Douvry, F. Gonin, D. Grenet, A.M. Hamid, H. Neveu, F. Parquin, C. Picard, A. Roux, M. Stern, F. Bouillioud, P. Cahen, M. Colombat, C. Dautricourt, M. Delahousse, B. D'Urso, J. Gravisse, A. Guth, S. Hillaire, P. Honderlick, M. Lequintrec, E. Longchampt, F. Mellot, A. Scherrer, L. Temagoult, L. Tricot, M. Vasse, C. Veyrie, L. Zemoura; **Toulouse**: M Dahan, M Murris, H Benahoua, J Berjaud, A Le Borgne Krams, L Crognier, L Brouchet, O Mathe, A Didier. **Swiss Transplant Cohort Study, STCS : Genève-Lausanne** : T. Krueger, H.B. Ris, M. Gonzalez, J.-D. Aubert, L.P. Nicod, B.J. Marsland, T.C. Berutto, T. Rochat, P. Soccal, Ph. Jolliet, A. Koutsokera, C. Marcucci, O. Manuel, E. Bernasconi, M. Chollet, F. Gronchi C Courbon; **Zurich**: S. Hillinger, I. Inci, P. Kestenholz, W. Weder, R. Schuepbach, M. Zalunardo, C. Benden, U. Buergi, L.C. Huber, B. Isenring, M.M. Schuurmans, A. Gaspert, D. Holzmann, N. Müller, C. Schmid, B. Vrugt, T. Rechsteiner. **SME and Platforms: Biomax, Germany**: A. Fritz, D. Maier; **Finovatis, Lyon, France** K. Deplanche, D. Koubi, GATC, Germany F. Ernst, T. Paprotka, M. Schmitt, B. Wahl; **Novasdicovery, Lyon, France**: J.-P. Boissel, G. Olivera-Botello; Prométhée **Proteomics Platform, Grenoble, France**: C. Trocmé, B. Toussaint, S. Bourgoin-Voillard, M. Séve; **Inserm U823, Université Joseph Fourier, Grenoble, France**: M. Benmerad, V. Siroux, R. Slama; **European Institute for Systems Biology & Medicine, Lyon, France**: C. Auffray, D. Charron, D. Lefaudeux, J. Pellet.

REFERENCES

1. Royer PJ, Olivera-Botello G, Koutsokera A, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. Transplantation. 2016;100(9):1803–14.

2. Verleden SE, Vasilescu DMM, McDonough JE, et al. Linking clinical phenotypes of chronic lung allograft dysfunction to changes in lung structure. Eur Respir J. 2015;46(5):1430–9.

3. Bowdish M, Arcasoy S, Wilt J, et al. Surrogate markers and risk factors for chronic lung allograft dysfunction. Am J Transplant. 2004;4(7):1171–8.

4. Kapila A, Baz M, Valentine V, Bhorade S, AIRSAC. Reliability of diagnostic criteria for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation: a survey. J Heart Lung Transplant. 2015;34(1):65–74.

5. Burton CM, Carlsen J, Mortensen J, Andersen CB, Milman N, Iversen M. Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. J Heart Lung Transplant. 2007;26(7):681–6.

6. Sato M, Ohmori-Matsuda K, Saito T, et al. Time-dependent changes in the risk of death in pure bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). J Heart Lung Transplant. 2013;32(5):484–91.

7. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. Eur Respir J. 2014;44:1479–1503.

8. Koutsokera A, Royer PJ, Antonietti JP, et al. Development of a Multivariate Prediction Model for Early-Onset Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome in Lung Transplantation. Front Med (Lausanne). 2017;4:109.

9. Adams AB, Williams MA, Jones TR, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. The Journal of clinical investigation. 2003;111(12):1887–95.

10. Schenk AD, Nozaki T, Rabant M, Valujskikh A, Fairchild RL. Donor-reactive CD8 memory T cells infiltrate cardiac allografts within 24-h posttransplant in naive recipients. Am J Transplant. 2008;8(8):1652–61.

11. Koyama I, Nadazdin O, Boskovic S, et al. Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. Am J Transplant. 2007;7(5):1055–61.

12. Krupnick AS, Lin X, Li W, et al. Central memory CD8+ T lymphocytes mediate lung allograft acceptance. The Journal of clinical investigation. 2014;124(3):1130–43.

13. Hodge G, Hodge S, Yeo A, et al. BOS is Associated with Increased Cytotoxic Pro-inflammatory CD8 T, NKT-like and NK Cells in the Small Airways. Transplantation. 2017.

14. Slebos D-J, Postma D, Koëter G, Bij W, Boezen M, Kauffman H. Bronchoalveolar

lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. J Heart Lung Transplant. 2004;23(5):532–40.
15. Whitehead BF, Stoehr C, Finkle C, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. Respiratory medicine. 1995;89(1):27–34.
16. Budding K, Graaf EA van de, Paantjens AW, et al. Profiling of peripheral blood mononuclear cells does not accurately predict the bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Transpl Immunol. 2015;32(3):195–200.
17. Budding K, Graaf EA van de, Kardol-Hoefnagel T, et al. Soluble CD59 is a Novel Biomarker for the Prediction of Obstructive Chronic Lung Allograft Dysfunction After Lung Transplantation. Sci Rep. 2016;6:26274.
18. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity. 2009;30(6):899–911.
19. Zhou Q, Yan J, Putheti P, et al. Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations. Am J Transplant. 2009;9(10):2303–11.
20. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. Am J Transplant. 2010;10(11):2410–20.
21. Gu J, Ni X, Pan X, et al. Human CD39(hi) regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. Cell Mol Immunol. 2016. doi:10.1038/cmi.2016.30.
22. Miyara M, Chader D, Sage E, et al. Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(23):7225–30.
23. Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. J Am Soc Nephrol. 2015;26(8):1795–805.
24. Taubert R, Danger R, Londoño M-CC, et al. Hepatic Infiltrates in Operational Tolerant Patients After Liver Transplantation Show Enrichment of Regulatory T Cells Before Proinflammatory Genes Are Downregulated. Am J Transplant. 2016;16(4):1285–93.
25. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. N Engl J Med. 2005;353(22):2342–51.
26. Madsen CB, Nørgaard A, Iversen M, Ryder LP. Elevated mRNA levels of CTLA-4, FoxP3, and granzyme B in BAL, but not in blood, during acute rejection of lung allografts. Transpl Immunol. 2010;24(1):26–32.
27. Veronese F, Rotman S, Smith RN, et al. Pathological and Clinical Correlates of FOXP3+ Cells in Renal Allografts during Acute Rejection. Am J Transplant. 2007;7(4):914–

922.
28. Braza F, Durand M, Degauque N, Brouard S. Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? Am J Transplant. 2015;15(9):2288–300.
29. Boix-Giner F, Millan O, San Segundo D, et al. High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. Int Immunol. 2016;28(2):55–64.
30. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. J Am Soc Nephrol. 2008;19(10):2020–6.
31. Girgis RE, Tu I, Berry GJ, et al. Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. J Heart Lung Transplant. 1996;15(12):1200–8.
32. Kroshus TJ, Kshettry VR, Savik K, John R, Hertz MI, Bolman RM. Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. 1997;114(2):195–202.
33. Heng D, Sharples LD, McNeil K, Stewart S, Wreghitt T, Wallwork J. Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. J Heart Lung Transplant. 1998;17(12):1255–63.
34. Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, et al. Minimal acute rejection after lung transplantation: a risk for bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transplant. 2005;5(8):2022–30.
35. Hachem RR, Khalifah AP, Chakinala MM, et al. The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. Transplantation. 2005;80(10):1406–13.
36. Hodge G, Hodge S, Chambers DC, Reynolds PN, Holmes M. Increased expression of graft intraepithelial T-cell pro-inflammatory cytokines compared with native lung during episodes of acute rejection. J Heart Lung Transplant. 2012;31(5):538–44.
37. Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. Ann Thorac Surg. 2002;73(4):1041–7; discussion 1047–8.
38. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, et al. Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(5):507–13.
39. Bharat A, Narayanan K, Street T, et al. Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection. Transplantation. 2007;83(2):150–8.
40. Greenland JR, Jewell NP, Gottschall M, et al. Bronchoalveolar Lavage Cell Immunophenotyping Facilitates Diagnosis of Lung Allograft Rejection. Am J Transplant. 2014;14(4):831–840.

41. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. Transplantation. 2004;77(5):762–6.

42. Salman J, Lus F, Knoefel AK., et al. Association of Higher CD4+CD25highCD127low, FoxP3+, and IL-2+ T Cell Frequencies Early After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. Am J Transplant. 2017;17(6):1637–1648.

43. Gregson AL, Hoji A, Palchevskiy V, et al. Protection against bronchiolitis obliterans syndrome is associated with allograft CCR7+ CD45RA- T regulatory cells. PLoS ONE. 2010;5(6):e11354.

44. Bhorade SM, Chen H, Molinero L, et al. Decreased percentage of CD4+FoxP3+ cells in bronchoalveolar lavage from lung transplant recipients correlates with development of bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation. 2010;90(5):540–6.

45. Brugière O, Thabut G, Krawice-Radanne I, et al. Role of HLA-G as a predictive marker of low risk of chronic rejection in lung transplant recipients: a clinical prospective study. Am J Transplant. 2015;15(2):461–71.

46. Hall DJ, Baz M, Daniels MJ, et al. Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2012;15(4):603–7.

47. Pain M, Royer PJ, Loy J, et al. T Cells Promote Bronchial Epithelial Cell Secretion of Matrix Metalloproteinase-9 via a C-C Chemokine Receptor Type 2 Pathway: Implications for Chronic Lung Allograft Dysfunction. Am J Transplant. 2017;17(6):1502–1514.

FIGURES

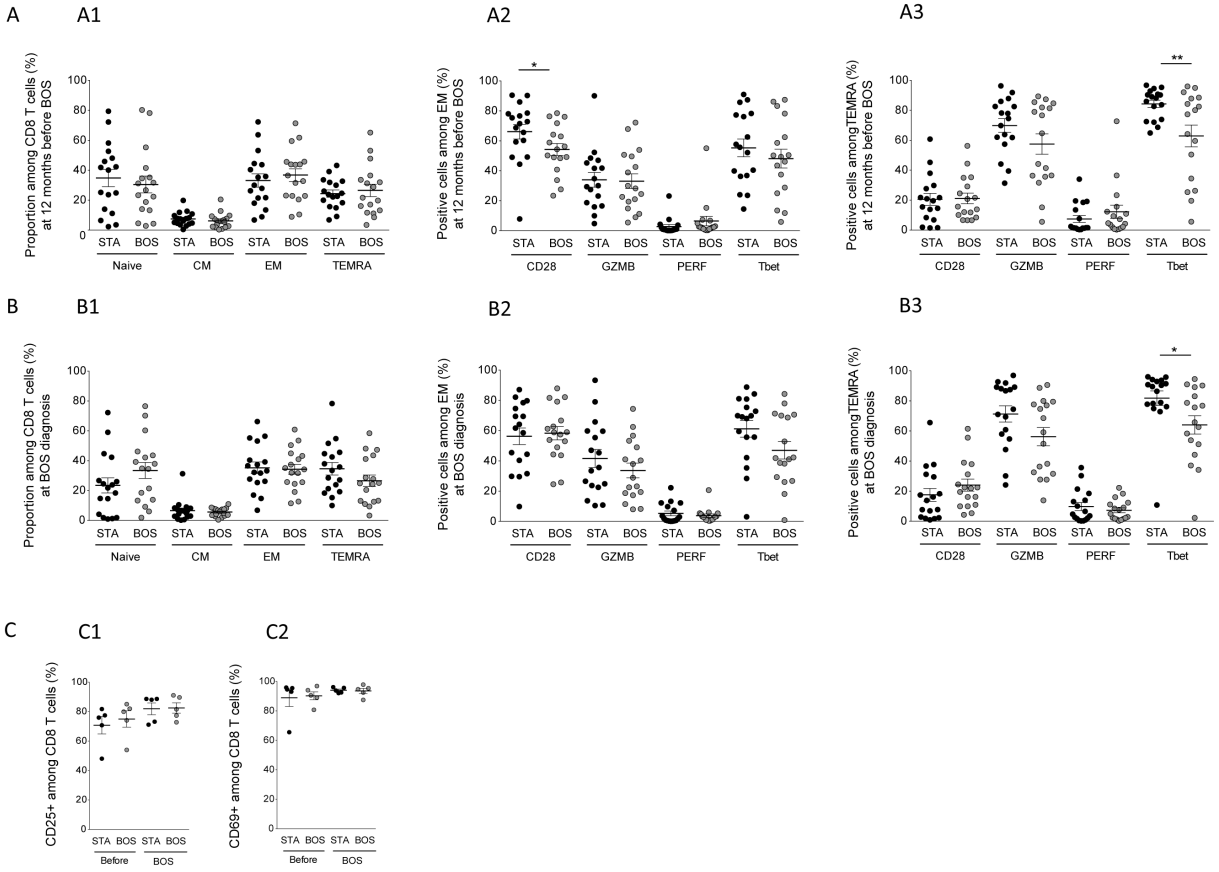


Figure 1: Analysis of the blood CD8 T cell profile in lung transplanted patients at BOS diagnosis and months before (A) Distribution of CD8 subsets; naive ($CD45RA^{+}CCR7^{+}$), central memory (CM, $CD45RA^{-}CCR7^{+}$), effector memory (EM, $CD45RA^{-}CCR7^{-}$) and terminally differentiated effector memory (TEMRA, $CD45RA^{+}CCR7^{-}$) (A1); Expression of CD28, Granzyme B (GZMB), Perforin (Perf) and T-Bet (T-box transcription factor TBX21) by EM (A2) and TEMRA CD8 T cells (A3) at 12 months before BOS for BOS (n=17) matched with STA (n=17). (B) Distribution of CD8 subsets; naive ($CD45RA^{+}CCR7^{+}$), central memory (CM, $CD45RA^{-}CCR7^{+}$), effector memory (EM, $CD45RA^{-}CCR7^{-}$) and terminally differentiated effector memory (TEMRA, $CD45RA^{+}CCR7^{-}$) (B1); Expression of CD28, Granzyme B (GZMB), Perforin (PERF) and T-Bet (T-box transcription factor TBX21) by EM (B2) and TEMRA CD8 T cells (B3) at the BOS diagnosis for BOS (n=17) matched with STA (n=17). (C) Activation state, i.e. CD25 and CD69 expression by EM (C1) and EMRA CD8 T cells (C2) after aCD3, aCD28 and IL-15 stimulation of PBMCs at BOS diagnosis and 12 months before for BOS (n=5) matched with STA (n=5). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

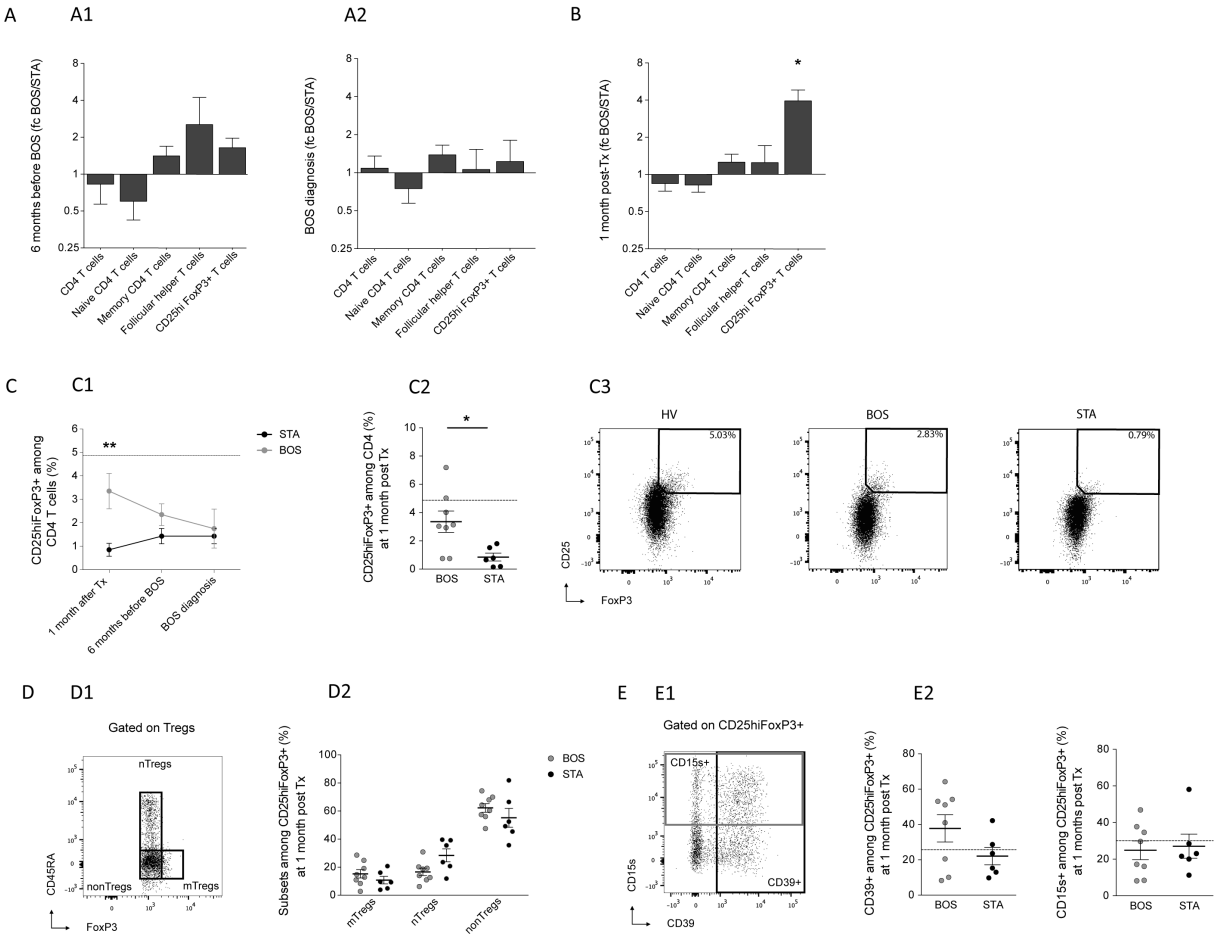


Figure 2: Blood CD4 T cell profile and phenotypical characterization of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells at 1 month post-transplantation. (A) Proportion of CD4 T cell subsets at 6 months before BOS (A1) and at BOS diagnosis (A2) represented as fold change BOS/STA. (B) Proportion of CD4 T cell subsets at 1 month after transplantation represented as fold change BOS/STA. (C) Proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells over time in the blood of BOS (n=9), STA (n=8) and HV (dotted line) (n=8) (C1), percentage of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among blood CD4 T cells at 1 month after transplantation in BOS (n=8), STA (n=6) and HV (dotted line) (n=8) (C2) and representative plots for $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell assessment by flow cytometry (C3). (D) Gating strategy for the identification of $CD45RA^{+}FoxP3^{low}$ naive Tregs, $CD45RA^{-}FoxP3^{low}$ non-Tregs, $CD45RA^{-}FoxP3^{hi}$ memory Tregs (D1) and Tregs subpopulation homeostasis with the proportion of mTregs, nTregs and non-Tregs among total blood $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells for BOS (n=8) and STA (n=6) at 1 month post-transplantation (D2). (E) Gating strategy for the identification of $CD15s^{+}$ Tregs and $CD39^{+}$ Tregs (E1) and percentage of $CD39^{+}$ and $CD15s^{+}$ Tregs among total blood $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells for BOS (n=8), STA (n=6) and HV (dotted line) (n=8) at 1 month post-transplantation (E2). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

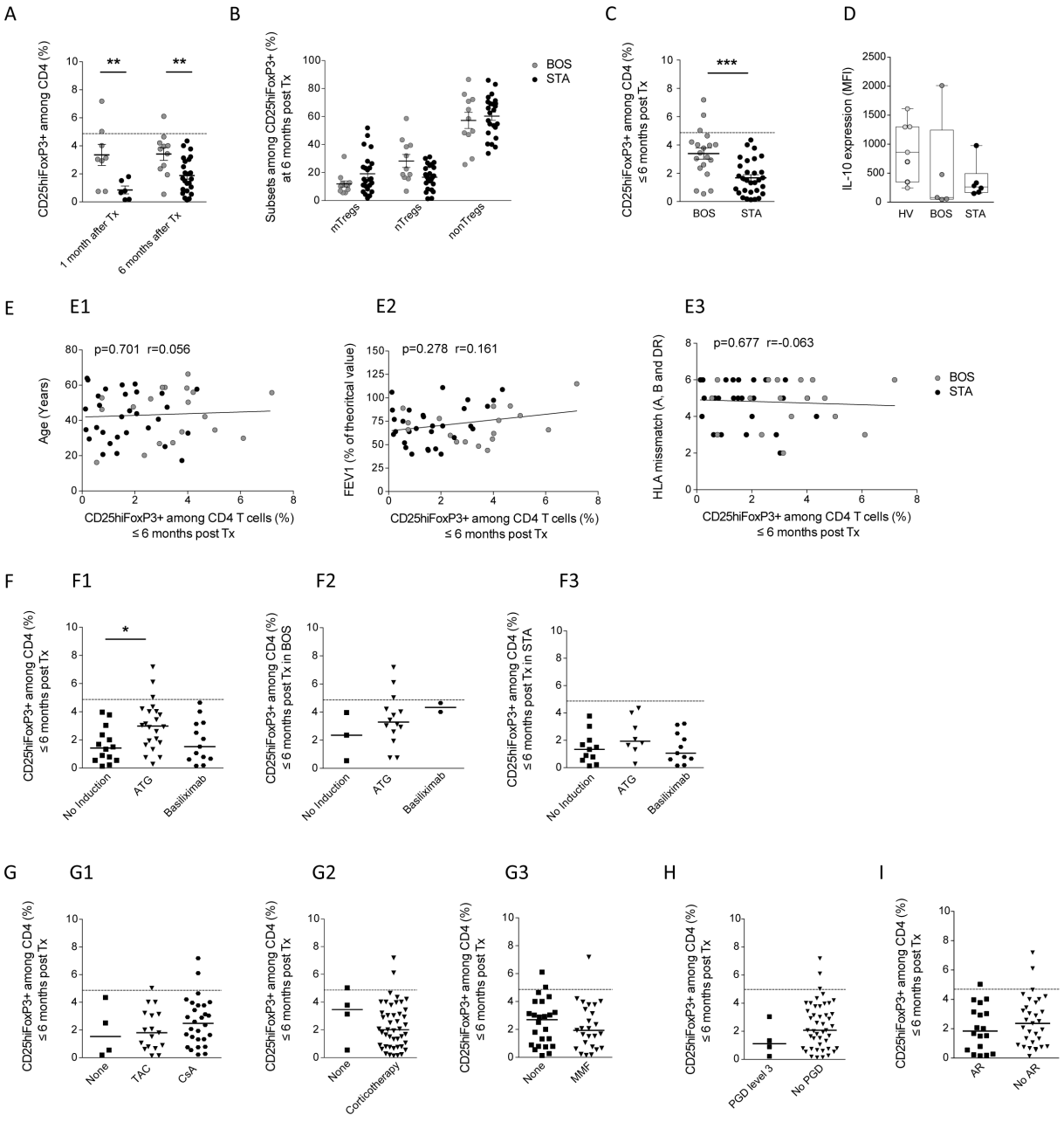


Figure 3: Conserved $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell profile at 1 and 6 months post-transplantation in the blood of lung recipients. (A) Proportion of circulating $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells at 1 month and 6 months post-transplantation for BOS, STA and HV (dotted line). (B) $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell subpopulation homeostasis with the proportion of mTregs, nTregs and non-Tregs among $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells for BOS (n=11) and STA (n=24) at 6 months post-transplantation. (C) Proportion of circulating $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells in the 6 first months following lung transplantation for BOS (n=19), STA (n=30) and HV (dotted line) (n=8) (D) IL-10 expression by CD4+CD25hiFoxP3+ T cells in HV and lung transplanted patients at 6 months post transplantation. (E) Correlation between the proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells in the 6 months post-transplantation and age at the sample

collection (E1), FEV_1 at the sample collection (E2) and HLA A, B, and DR at transplantation (E3) for BOS (n=19) and STA (n=30). (F) Proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells among CD4 T in the 6 first months post-transplantation for BOS and STA according to the Induction treatment of the patients. (F1) analysis on the whole group of lung transplanted of the study, (F2) analysis on BOS patient, (F3) analysis on STA patients. (G) Proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells among CD4 T in the 6 first months post-transplantation for BOS and STA according to the immunosuppressive treatments. (G1) comparison of Tacrolimus (TAC), Cyclosporin A (CsA) and non induction. (G2) comparison of corticotherapy versus no corticotherapy. (G3) comparison of MMF versus no MMF. (H) Proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells among CD4 T in the 6 first months post-transplantation for BOS and STA according to the development of primary graft dysfunction (PGD). (I) Proportion of circulating $CD4^+CD25^{hi}FoxP3^+$ T cells among CD4 T in the 6 first months post-transplantation for BOS and STA according to the development acute rejection episodes (AR). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

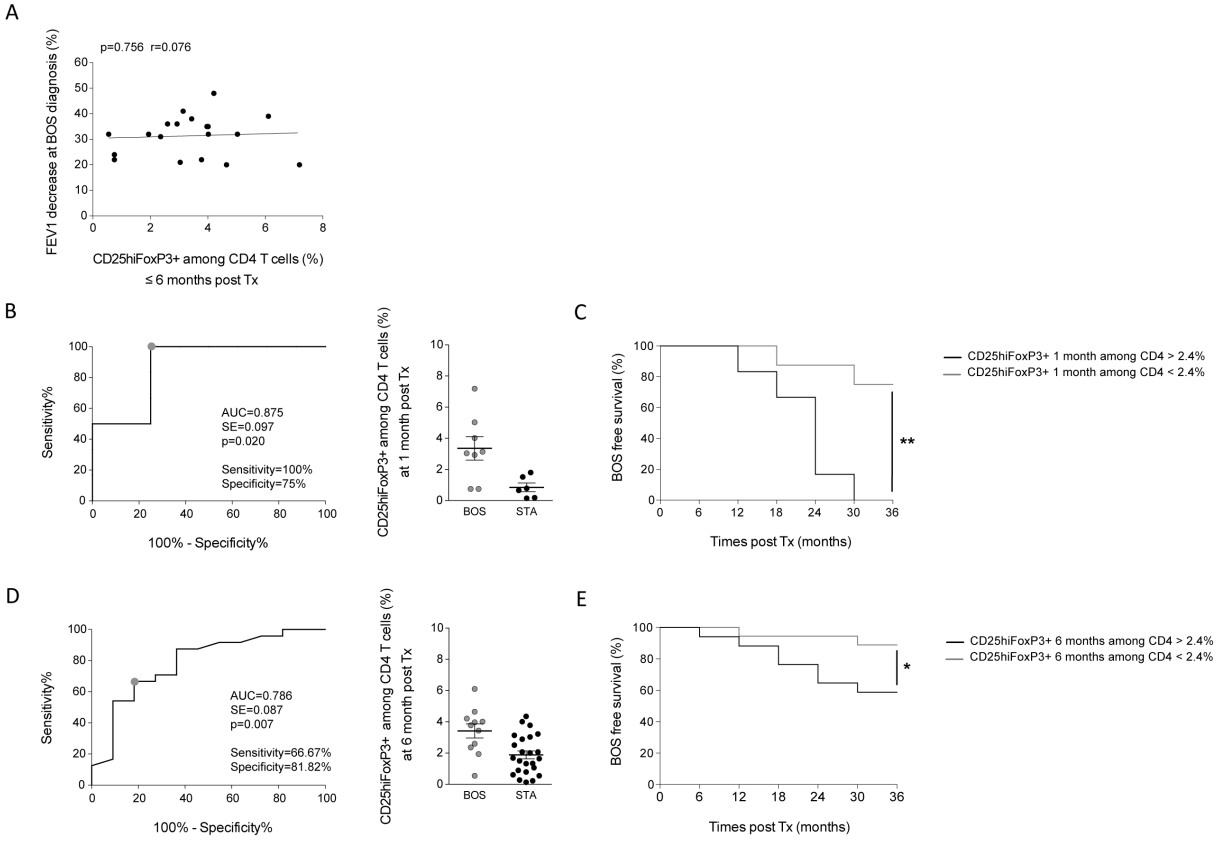
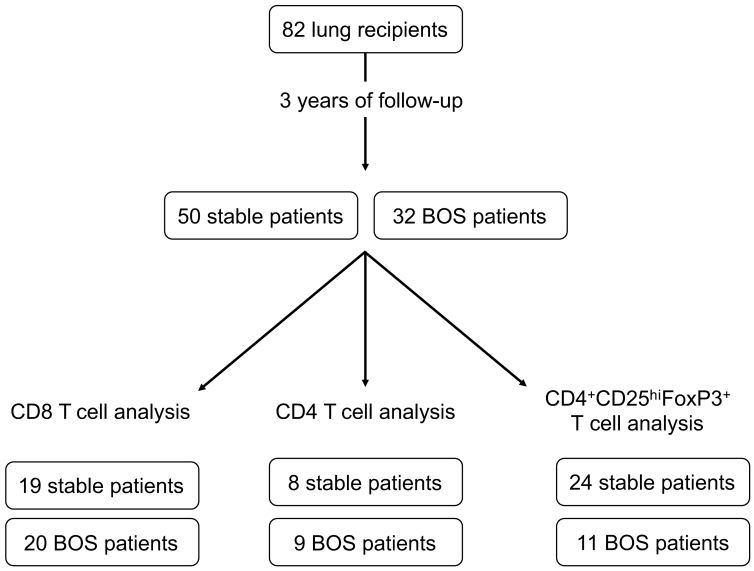


Figure 4: Analysis of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell proportions early post-transplantation as a predictive biomarker of BOS development. (A) Correlation between the proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells in the 6 months post-transplantation and BOS severity assessed by FEV1 decrease at the BOS diagnosis. (B) ROC curve of the proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells at 1 month following transplantation for BOS (n=8) and STA (n=6). (C) Kaplan-Meier analysis of the BOS-free survival according to $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell proportions among CD4 T cells at 1 month post transplantation with a cut off at 2.4 (n=14). (D) ROC curve of the proportion of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells at 6 months post transplantation for BOS (n=11) and STA (n=24) (E) Kaplan-Meier analysis of the BOS-free survival according to $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell proportions among CD4 T cells at 6 months post transplantation with a cut off at 2.4 (n=35). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.



1 month post-Tx	BOS	-	8	-
	STA	-	6	-
6 months post-Tx	BOS	-	-	11
	STA	-	-	24

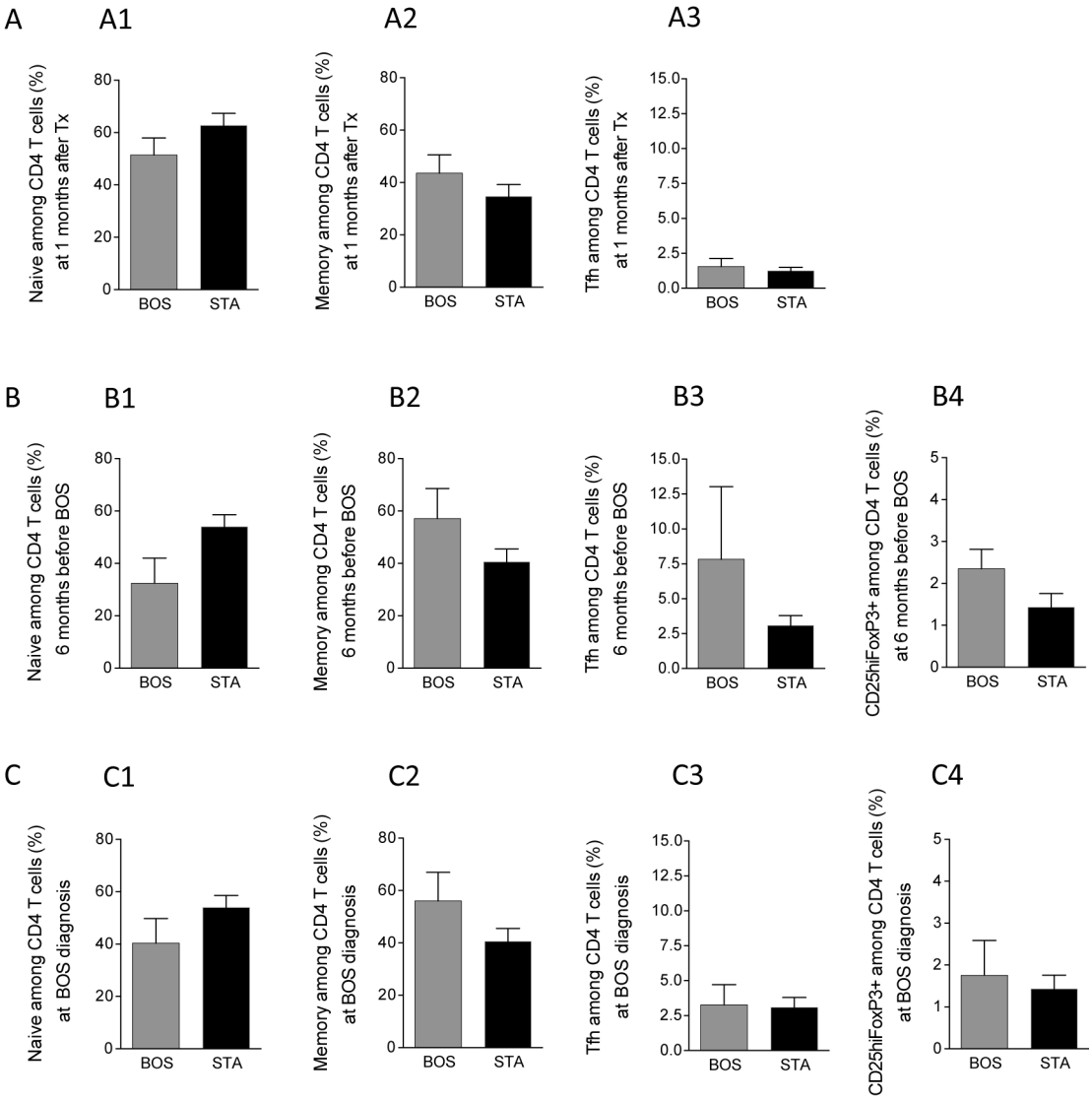
12 months before BOS	BOS	17	-	-
	Paired STA	17	-	-
At BOS diagnosis	BOS	17	-	-
	Paired STA	17	-	-

6 months before BOS	BOS	-	5	-
At the BOS diagnosis	BOS	-	4	-
18 months post-Tx	STA	-	6	-

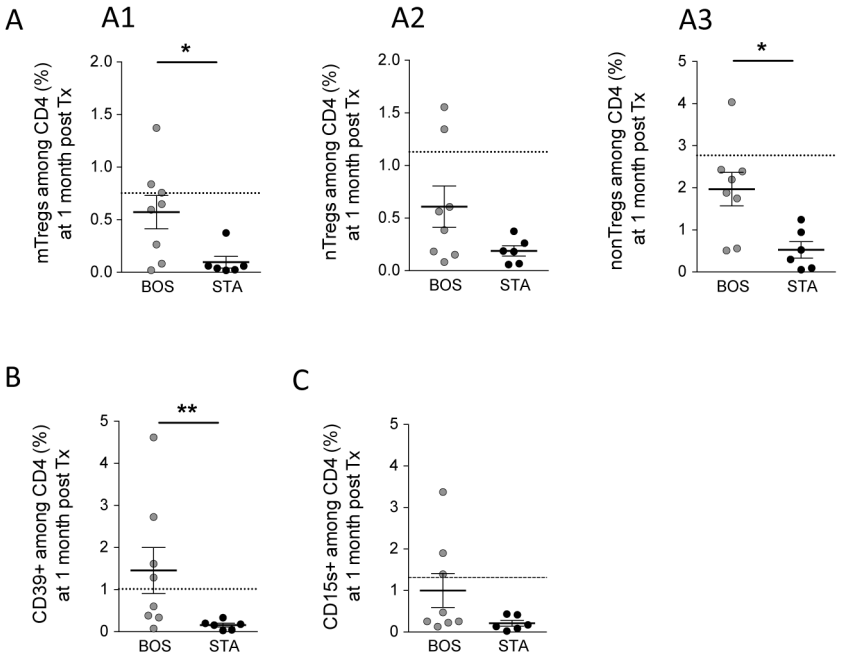
3 BOS and 1 STA patients in common between CD4 T Cell analysis and CD8 T cell analysis
5 BOS patients in common between $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell analysis and CD8 T cell analysis
CD4 T cell and $CD4^{+}CD25^{hi}Foxp3^{+}$ T cell analysis were performed on two independent groups of patients

For CD4 T cell analysis 6 months before BOS and at the BOS diagnosis are compared to 18 months post-Tx for STA

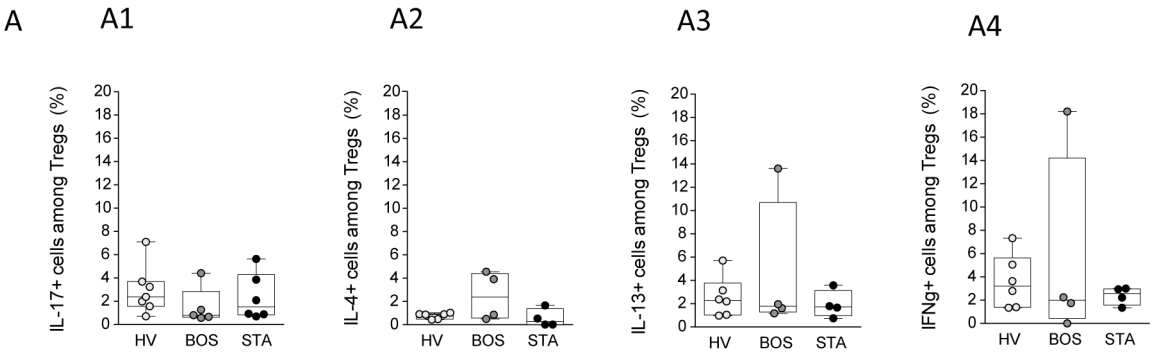
Supplementary Figure 1: Patient choice strategy for the analysis of CD8 T cells, CD4 T cells and $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell profiles of the 82 lung recipients followed in this study. CD8 T cell profile analysis was performed on the PBMCs of 20 BOS and 19 paired STA patients at BOS diagnosis and 12 months before. CD4 T cell profile analysis was performed on the PBMCs of 9 BOS and 8 STA patients at BOS diagnosis and 6 months before compared to 18 months after transplantation for STA. CD4 T cell profile analysis was performed on 8 BOS and 6 STA patients at 1 month post transplantation. $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell profiling at 6 months post transplantation was performed on 11 BOS and 24 STA patients. Because of the availability of blood samples and the exclusion of samples with a small proportion of live cells (needed to study rare CD4 T cells subsets) some patients' time points were not included in the analysis for the T cell profile.



Supplementary Figure 2: Blood CD4 T cell profile analysis. (A) Naïve CD4 T cell (A1), Memory CD4 T cell (A2) and Follicular helper CD4 T cells (A3) frequency among CD4 T cells BOS (n=8) and STA (n=6) at 1 month after Transplantation. (B) Naïve CD4 T cell (B1), Memory CD4 T cell (B2), Follicular helper CD4 T cells (B3) and $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ CD4 T cells (B4) frequency among CD4 T cells for BOS (n=5) and STA (n=6) at 6 months before BOS diagnosis and 18 months post transplantation for STA. (C) Naïve CD4 T cell (C1), Memory CD4 T cell (C2), Follicular helper CD4 T cells (C3) and $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ CD4 T cells (C4) frequency among CD4 T cells for BOS (n=4) and STA (n=6) at BOS diagnosis and 18 months post transplantation for STA. The results are expressed as means ± SEM.



Supplementary Figure 3: $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell subset analysis at 1 month post-transplantation (A) Proportion of mTregs (A1), nTregs (A2) and non-Tregs (A3) among CD4 T cells for BOS (n=8), STA (n=6) and HV (dotted line) (n=8). (B) Proportion of $CD39^{+}$ $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells for BOS (n=8), STA (n=6) and HV (dotted line) (n=8). (C) Proportion of $CD15s^{+}$ $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cells among CD4 T cells for BOS (n=8), STA (n=6) and HV (dotted line) (n=8). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.



Supplementary Figure 4: Cytokine expression profile of $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell subset analysis at `6 months post-transplantation (A) Proportion of IL17+ (A1), IL-4+ (A2), IL-13+ (A3) and Ifng (A4) among CD4+CD25hiFoxP3+ T cells for BOS (n=5), STA (n=6) and HV (n=7). The results are expressed as means ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

TABLES

Table 1: Demographic and clinical characteristics of the 82 lung transplant recipients included in the study.

Demographic characteristics	Groups		p-value
	STA	BOS	
Participants, n	50	32	
Recipent gender, n (%)			
Male	27 (54)	17 (53)	0.9382
Female	23 (46)	15 (47)	
Recipient age (yr), median (min-max)	40.5 (16-65)	46.5 (15-65)	0.9032
Donor gender, n (%)			
Male	29 (58)	16 (50)	0.4776
Female	21 (42)	16 (50)	
Donor age (yr), median (min-max)	38 (16-69)	47 (10-68)	0.1566
Pretransplant diagnosis, n (%)			
Cystic Fibrosis	25 (50.0)	9 (28.1)	
Emphysema/COPD	12 (24.0)	7 (22.0)	
Pulmonary Arterial Hypertension	4 (8.0)	3 (9.3)	0.1113
Idiopathic Pulmonary Fibrosis	5 (10.0)	7 (22.0)	
Bronchiectasis	4 (8.0)	3 (9.3)	
Other	0 (0)	3 (9.3)	
Transplant type, n (%)			
Bilateral	39 (78)	25 (78.1)	
Single	7 (14)	4 (12.5)	0.9645
Lobar	2 (4)	2 (6.3)	
Heart Lung	2 (4)	1 (3.1)	
Ischemic time (min), median (min-max)	350 (205-480)	347 (176-540)	0.5511
Induction agent, n (%)			
Basiliximab	17 (34)	4 (12.5)	0.0553
Thymoglobulin	17 (34)	18 (56.3)	
None	16 (32)	10 (31.2)	
IS therapy, n (%)			
Steroids	49 (98)	31 (97)	
Cyclosporin A	26 (52)	26 (81)	0.3602
Tacrolimus	39 (78)	20 (63)	
MMF	48 (96)	30 (94)	
HLA missmatch $\geqq$ 4/6, n (%)	39 (78)	25 (78)	0.4571
HLA A $\geqq$ 1/2	45 (90)	28 (88)	0.9638
HLA B $\geqq$ 1/2	45 (90)	30 (94)	0.6306
HLA DR $\geqq$ 1/2	45 (90)	30 (94)	0.8980
Acute cellulars rejections, n (%)			
Only 1 after TP	13 (26)	9 (28)	0.2561
> 1 after TP	17 (34)	9 (28)	
Onset of BOS (mths), median (min-max)	-	24 (6-42)	-

Table 2: Multivariate analysis of the parameters selected as significantly modified in the univariate model using a Cox Model.

Parameters	*Wald test p. Value*	*Hazard ratio*
	Multivariate Analysis	
CD4+ CD25hi FoxP3+ T cells proportion up to 2.4 %	**0.0012**	**0.17**
Time post-transplantation	**0.016**	**0.99**

Supplementary Table 1: Detailed patient's characteristics for the three groups of patients included in the study. (1) 9 BOS and 8 STA patients were included for longitudinal CD4 T cells analysis at 1 month after transplantation and at BOS diagnosis and 6 months before for BOS compared to 18 months post-transplantation for STA. (2) 11 BOS and 24 STA patients were included for $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell profile analysis at 6 months post-transplantation. (3) 20 BOS and 19 STA matched patients were included for the analysis of the CD8 T cell profile at the time of BOS diagnosis and 12 months before.

Pt	Status	Pretransplant Diagnosis	Age at Tx	Recipient Gender	Transplant type	Ischemic time (min)	Induction agent	Immunosuppressive therapy			HLA mismatches HLA A	HLA B	HLA DR	Onset of BOS (mths)
Group 1 - CD4 T cell analysis														
1	BOS	CF	26	F	DLT	249	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	24
2	BOS	CF	29	F	DLT	420	None	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	36
3	BOS	Emphy/COPD	50	M	DLT	407	ATG	TAC	Cortico	MMF	2	2	1	30
4	BOS	Emphy/COPD	55	F	DLT	510	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	24
5	BOS	Emphy/COPD	58	M	SLT	218	ATG	CsA/TAC	Cortico		2	1	2	12
6	BOS	IPF	46	M	DLT	335	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	18
7	BOS	IPF	52	M	Lobar	435	ATG	CsA	Cortico	MMF	0	2	1	30
8	BOS	IPF	58	M	SLT	320	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	0	1	1	24
9	BOS	PAH	34	F	DLT	400	ATG	TAC	Cortico	MMF	1	2	1	24
10	STA	CF	24	M	DLT	297	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
11	STA	CF	33	F	DLT	360	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
12	STA	CF	34	F	DLT	467	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
13	STA	CF	39	M	DLT	427	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	0	2	2	_
14	STA	CF	46	M	DLT	300	ATG	TAC	Cortico	MMF	1	1	1	_
15	STA	Emphy/COPD	60	M	SLT	306	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
16	STA	Emphy/COPD	63	F	SLT	320	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	0	2	2	_
17	STA	Emphy/COPD	48	M	DLT	215	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
Group 2 - CD4+CD25hiFoxP3+ T cell analysis														
18	BOS	Bronch	33	F	Lobar	350	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	42
19	BOS	CF	19	M	DLT	540	None	CsA	Cortico	MMF	1	1	1	18
20	BOS	CF	27	M	DLT	215	ATG	CsA	Cortico	MMF	1	1	2	30
21	BOS	CF	29	F	DLT	176	ATG	CsA	Cortico	MMF	1	0	2	18
22	BOS	CF	42	M	DLT	*md*	Basiliximab	CsA	Cortico	MMF	1	2	2	24
23	BOS	Emphy/COPD	47	M	DLT	320	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	1	30
24	BOS	Emphy/COPD	57	M	DLT	300	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	*md*	12
25	BOS	IPF	51	M	DLT	540	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	6
26	BOS	IPF	55	F	DLT	415	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	36
27	BOS	IPF	65	M	DLT	360	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	24
28	BOS	PAH	15	F	HLT	210	None	CsA/TAC			2	2	1	12
29	STA	Bronch	46	M	DLT	370	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
30	STA	Bronch	53	M	DLT	480	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	0	1	_
31	STA	CF	20	F	DLT	350	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	*md*	*md*	*md*	_
32	STA	CF	20	F	DLT	313	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
33	STA	CF	24	M	DLT	357	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
34	STA	CF	26	F	DLT	353	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
35	STA	CF	29	F	DLT	400	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
36	STA	CF	30	M	DLT	380	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	1	_
37	STA	CF	32	F	DLT	266	ATG	CsA	Cortico	MMF	1	2	2	_
38	STA	CF	32	M	DLT	375	None	CsA	Cortico	MMF	1	1	*md*	_
39	STA	CF	35	F	DLT	228	Basiliximab	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	_
40	STA	CF	35	F	DLT	380	None	CsA	Cortico	MMF	2	2	1	_
41	STA	CF	41	F	DLT	465	None	CsA	Cortico	MMF	2	2	1	_
42	STA	CF	45	M	DLT	435	None	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
43	STA	Emphy/COPD	54	M	DLT	360	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
44	STA	Emphy/COPD	55	M	SLT	211	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
45	STA	Emphy/COPD	40	M	DLT	380	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	0	1	_
46	STA	Emphy/COPD	43	F	DLT	360	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
47	STA	Emphy/COPD	54	M	DLT	350	None	TAC	Cortico	MMF	0	1	1	_
48	STA	IPF	57	F	Lobar	420	None	TAC	Cortico		1	1	1	_
49	STA	IPF	60	M	DLT	465	None	TAC	Cortico	MMF	1	2	1	_
50	STA	PAH	16	M	HLT	*md*	None	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	_
51	STA	PAH	57	M	HLT	272	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	1	1	_
52	STA	PAH	62	F	DLT	205	None	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	_

Group 3 - CD8 T cell analysis														
18*	BOS	Bronch	33	F	Lobar	350	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	42
53	BOS	Bronch	51	M	DLT	321	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	36
54	BOS	Bronch	56	F	DLT	420	ATG	CsA	Cortico	MMF	1	1	1	18
55	BOS	CF	15	M	DLT	320	Basiliximab	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	1	2	24
19*	BOS	CF	19	M	DLT	540	None	CsA	Cortico	MMF	1	1	1	18
56	BOS	CF	24	F	DLT	330	None	TAC	Cortico	MMF	*md*	*md*	*md*	36
57	BOS	CF	27	M	DLT	375	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	36
21*	BOS	CF	29	F	DLT	176	ATG	CsA	Cortico	MMF	1	0	2	18
58	BOS	Emphy/COPD	39	F	DLT	307	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	1	24
23*	BOS	Emphy/COPD	47	M	DLT	320	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	1	30
59	BOS	Emphy/COPD	59	F	SLT	240	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	1	2	30
60	BOS	Histiocytosis	53	F	SLT	178	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	12
6*	BOS	IPF	46	M	DLT	335	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	18
25*	BOS	IPF	51	M	DLT	540	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	6
61	BOS	IPF	56	M	DLT	370	None	CsA	Cortico	MMF	1	2	2	18
8*	BOS	IPF	58	M	SLT	320	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	0	1	1	24
62	BOS	PAH	23	M	DLT	400	None	CsA	Cortico	MMF	2	2	1	30
9*	BOS	PAH	34	F	DLT	400	ATG	TAC	Cortico	MMF	1	2	1	24
63	BOS	Rheumatoid arthritis	56	F	DLT	347	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	18
64	BOS	Sarcoidosis	17	F	DLT	460	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	0	2	1	18
65	STA	Bronch	49	F	DLT	DM	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
66	STA	Bronch	58	M	DLT	372	None	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
67	STA	CF	20	F	DLT	292	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	1	_
68	STA	CF	28	F	Lobar	360	None	TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
69	STA	CF	28	F	DLT	397	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
70	STA	CF	29	M	DLT	240	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	0	0	_
71	STA	CF	31	M	DLT	209	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	1	2	_
72	STA	CF	33	M	DLT	312	Basiliximab	CsA	Cortico	MMF	1	2	1	_
73	STA	CF	33	M	DLT	234	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	2	2	_
74	STA	CF	35	F	DLT	DM	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	2	2	_
75	STA	Emphy/COPD	54	F	DLT	438	ATG	CsA	Cortico	MMF	2	2	2	_
76	STA	Emphy/COPD	54	F	SLT	240	None	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	1	2	_
16*	STA	Emphy/COPD	63	F	SLT	320	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	0	2	2	_
77	STA	Emphy/COPD	48	M	DLT	340	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	2	1	2	_
78	STA	Emphy/COPD	57	F	DLT	350	ATG	TAC	Cortico	MMF	1	1	2	_
79	STA	IPF	62	M	SLT	289	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	2	2	1	_
80	STA	IPF	64	M	SLT	234	Basiliximab	TAC	Cortico	MMF	1	1	0	_
81	STA	IPF	65	M	SLT	280	ATG	CsA/TAC	Cortico	MMF	1	1	1	_
82	STA	PAH	28	F	DLT	348	None	*md*	*md*	*md*	*md*	*md*	*md*	_

md missing data
CF for Cystic Fibrosis; Emphy for Emphysema; COPD for Chronic Obstructive Pulmonary Disease; IPF for Idiopathic Pulmonary Fibrosis; PAH for Pulmonary Arterial Hypertension; Bronch for Bronchectasis.
DLT for double lung transplantation; SLT for single lung transplantation; HLT for heart lung transplantation.
ATG for Anti Thymoglobulin; CsA for Cyclosporin A; TAC for Tacrolimus; Cortico for Corticosteroids therapy

Supplementary Table 2: Antibody panels used for CD8 T cell, CD4 T cell and $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell analyses.

	CD8 T cells study	CD4 T cells study	CD4+CD25hiFoxP3+ T cells study
Antibody Panel	CD3-BV605 (OKT3; Biolegend) CD8-VioGreen (BW135/80; Miltenyi) CD45RA-APCVio770 (T6D11; Miltenyi) CCR7-PEVio770 (REA108; Miltenyi) CD28-PECF594 (CD28.2; BD Biosciences) Tbet-PE (O4-46; BD Biosciences) GZMB-Alexa Fluor 700 (GB11; BD Biosciences) PERF-FITC (delta G9; Diaclone)	CD3-BUV395 (HIT3a; BD Biosciences) CD4-V500 (RPA-T4; BD Biosciences) CD25-BUV737 (2A3; BD Biosciences) CD45RA-PerCP Cy5.5 (HI100; BD Biosciences) FoxP3-PE (259D/C7; BD Biosciences) CD39-PECF594 (TU66; BD Biosciences) CXCR5-Alexa647 (RF8B2; BD Biosciences) CD15s-BV711 (CSLEX1; BD Biosciences)	CD3-VioBlue (BW264/56; Myltenyi) CD4-PerCP Cy5.5 (RPA-T4; BD Biosciences) CD25-APC (2A3; BD Biosciences) CD45RA-APCH7 (HI100; BD Biosciences) FoxP3-FITC (PCH101; eBioscience)

Biolegend (San Diego, USA); Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany); BD Biosciences (Franklin Lakes, USA); Diaclone (Besançon, France); eBioscience (Santa Clara, USA)

Supplementary Table 3: Phenotypes used for CD8 T cell, CD4 T cell and $CD4^{+}CD25^{hi}FoxP3^{+}$ T cell analyses.

	CD8 T cell study	CD4 T cell study	CD4+CD25hiFoxP3+ T cell study
T cells subse	Naive CD8 T cells (CD8+CD45RA+CCR7+) TEMRA CD8 T cells (CD8+CD45RA+CC) Effector Memory CD8 T cells (CD8+CD45RA-CCR7-) Central Memory CD8 T cells (CD8+CD45RA-CCR7+)	Naïve CD4 T cells (CD4+CD45RA+) Memory CD4 T cells (CD4+CD45F) Follicular helper CD4 T cells (CD4+CD45R CXCR5+) Regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiFoxP3+) Memory regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA-FoxP3hi) Naive regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA+FoxP3low) FoxP3+ non-regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA-FoxP3low) Activated effector regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiFoxP3+CD15s+) CD39+ regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiFoxP3+CD39+)	Regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiFoxP3+) Memory regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA-FoxP3hi) Naive regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA+FoxP3low) FoxP3+ non-regulatory CD4 T cells (CD4+CD25hiCD45RA-FoxP3low)

Supplementary Table 4: Univariate logistic regression analysis of the effect of demographic, immunological and clinical parameters on BOS occurrence according to the time.

Parameters	*Wald test p. Value*	*Hazard ratio*
	Univariate Analysis	
At the transplantation		
Recipient age	0.67	1
Recipient gender	0.48	1.40
Donor age	**0.14**	**1.03**
Donor gender	0.49	0.73
Pretransplant diagnosis (Cystic Fibrosis vs. Emphysema/COPD vs. Other)	0.24	0.67
Transplant Type (Bilateral vs. Other)	0.69	1.23
Ischemic time	0.98	1
HLA A missmatch > 1	0.84	1.10
HLA B missmatch > 1	0.78	0.87
HLA DR missmatch > 1	0.86	0.92
HLA DQ missmatch > 1	**0.17**	**0.53**
All HLA missmatch > 5	0.52	0.91
Induction agent (Thymoglubulin vs. Basilixiab or no Induction)	**0.0072**	**4.07**
In the 6 months following transplantation		
Recipient Age at blood sampling	0.69	1
Time post-transplantation	**0.085**	**0.99**
Acute rejection episodes	0.54	0.74
Viral infections	0.72	1.18
Smoking history	0.77	1.14
CD4+ CD25hi FoxP3+ T cells proportion up to 2.4 %	**0.0043**	**0.22**
In the 3 years following transplantation		
Acute rejection episodes	0.23	0.59

CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION DE L'ARTICLE 1

La tolérance opérationnelle acquise spontanément suite à l'arrêt de traitements immunosuppresseurs chez des patients transplantés rénaux est un modèle unique d'étude de la régulation immunitaire rendant possible le maintien d'un greffon fonctionnel chez un individu immunocompétent. Ces dix dernières années, de nombreuses équipes se sont intéressées à l'identification de marqueurs de la tolérance et ont mis en évidence une modification importante des profils lymphocytaires B et T circulants démontrant une signature immunitaire régulatrice chez ces patients (Braza et al., 2015c; Chesneau et al., 2014, 2015b; Lozano et al., 2011; Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010; Sagoo et al., 2010). Cependant, les mécanismes à l'origine de cette empreinte immunitaire régulatrice et de cet état de tolérance restent mal connus.

Les premières données de notre étude renforcent et valident nos précédentes observations (Braza et al., 2015c; Brouard et al., 2011; Louis et al., 2006). Nous démontrons l'augmentation en fréquence des lymphocytes T régulateurs (Tregs) et plus particulièrement du compartiment mémoire des Tregs (mTregs) parmi les lymphocytes T CD4 chez les patients opérationnellement tolérants comparés aux patients stables. Ces Tregs mémoires ont été caractérisés en 2009 dans l'étude de Myiara et al. comme une sous-population Tregs possédant des capacités suppressives plus importantes que les pools de Tregs naïfs (nTregs) et de resting Tregs (ou nonTregs) (Miyara et al., 2009). Cette proportion accrue de Tregs et de mTregs en périphérie chez les patients tolérants soulève plusieurs questions.

Tout d'abord, celle de l'origine de ces mTregs : sont-elles des cellules directement dérivées du thymus suite aux processus de sélection (tTregs) ou des cellules induites en périphérie à partir de lymphocytes T CD4 conventionnels en réponse à l'attaque de l'allogreffe (pTregs). Bien que la notion de tTregs auto-spécifiques capables de réguler les syndromes auto-immuns et de pTregs spécifiques d'antigènes extérieurs capable de réguler l'allo-immunité soit facile à assimiler,

plusieurs études sur des modèles murins suggèrent l'implication de tTregs dans l'inhibition des réponses allo-immunes (Benghiat et al., 2005; Bolton, 2005). Cependant, ces résultats restent fortement controversés (Bolton, 2005). Chez l'Homme, le manque de marqueurs permettant de différencier tTregs et pTregs ne permet pas de répondre de façon certaine à cette question. Cependant, il a été montré les tTregs présentent un statut de déméthylation des TSDR plus important que les pTregs. Or, dans notre étude (Braza et al., 2015c) nous avons mis en évidence une déméthylation importante des TSDR des mTregs chez les patients tolérants suggérant un phénotype plus proche des tTregs que des pTregs. Cependant, le statut de méthylation des TSDR peut aussi être modulé par l'environnement, particulièrement dans un contexte de greffe et de réponse allo-immune chronique non contrôlée par les traitements immunosuppresseurs. L'identification de nouveaux marqueurs robustes distinguant ces deux sous-populations chez l'Homme nous permettrait d'appréhender plus facilement cet axe de recherche.

Une deuxième question importante est celle du rôle des traitements immunosuppresseurs. En effet, nous observons que les patients tolérants présentent un profil Treg équivalent à celui de donneurs sains suggérant un défaut de régulation lymphocytaire T CD4 chez les patients stables plutôt qu'un gain chez les patients tolérants. Plusieurs équipes se sont déjà intéressées à l'impact des inhibiteurs de calcineurine (CNI) et du MMF sur les Tregs, cependant leurs résultats diffèrent. Ainsi, *in vitro*, bien que la fréquence de Tregs $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}FoxP3^{+}$ ne soit pas modifiée par les traitements nous rapportons une modification de l'homéostasie des Tregs lors de traitements par la Cyclosporine A et le Tacrolimus. En accord avec de précédentes études démontrant une baisse de l'expression de FoxP3 (Akimova et al., 2012; Gallon et al., 2015; Hijnen et al., 2009; Zeiser et al., 2006) et une diminution de la proportion de $CD4^{+}CD45RA^{-}FoxP3^{high}$ (Whitehouse et al., 2017a) lors de traitement avec des CNI, nos résultats suggèrent que la diminution de la proportion de mTregs chez les patients stables comparés aux patients tolérants et aux volontaires sains pourrait être due, au moins en partie, à leur traitement par CNI.

Cependant nos résultats n'expliquent pas la fréquence plus faible de Tregs totaux chez ces patients stables. Nous pouvons donc aussi nous demander par quel(s) mécanisme(s) les Tregs totaux et mémoires sont augmentés chez les patients

tolérants comparés aux patients stables. Le rôle du TGF-ß associé à une stimulation du TCR dans l'induction de l'expression de FoxP3 par des lymphocytes T conventionnels et donc l'induction de Tregs est aujourd'hui bien décrit (Chen and Konkel, 2010; Chen et al., 2003; Ohkura et al., 2012). De plus, l'analyse transcriptomique dans le sang de patients opérationnellement tolérant et des patients stables a permis de mettre en évidence que plus de 40% des gènes présentant une expression différentielle sont dépendants de la voie du TGF-ß (Brouard et al., 2007). Il est donc possible que chez ces patients, une exposition constante aux allo-antigènes du greffon dans un environnement pro-TGF-ß puisse être à l'origine de l'expansion de cellules T régulatrices.

Nous avons identifié, chez les patients tolérants, une signature lymphocytaire B spécifique se traduisant par un défaut de maturation et l'augmentation du nombre de lymphocytes B granzyme B^+ possédant des capacités suppressives *in vitro* (Chesneau et al., 2014, 2015b). De plus, plusieurs études ont décrit la capacité de cellules lymphocytaires B régulatrices à induire et maintenir des Treg *in vivo* (Lee et al., 2014; Pennati et al., 2016; Rosser et al., 2014; Schuler et al., 2014). Un lien entre ces deux sous-populations pourrait donc potentiellement être impliqué dans le profil pro-Tregs observé chez les patients opérationnellement tolérants. Nous avons récemment étudié la capacité de ces cellules lymphocytaires B Granzyme B+ à induire et expandre des lymphocytes T régulateurs *in vitro* (résultats préliminaires - données non publiées). De façon intéressante, nous avons mis en évidence une induction de Tregs $CD4^+CD127^-$ $FoxP3^+$ par les lymphocytes B enrichis en cellules granzyme B^+. Cette induction de Tregs est granzyme B dépendante (Figure 12). Il serait donc intéressant d'analyser à la fois les mécanismes à l'origine de cette induction de Tregs *in vitro*, et la reproductibilité de ces résultats préliminaires *in vivo* chez la souris humanisée après transfert adoptif de cellules B granzyme B^+ dans un modèle de pathologie inflammatoire.

Le deuxième résultat principal de ce travail tient dans l'identification d'une fonction ATPasique des mTregs présente chez les patients tolérants comme chez les donneurs sains et défectueuse chez les patients stables. Nous avons en effet démontré que les mTregs des patients tolérants sont capables via l'activité de l'ectonucléotidase CD39 de dégrader l'ATP extracellulaire en AMP *in vitro*. A l'inverse,

les mTregs issus du sang de patients stables ne dégradent que très peu l'ATP extracellulaire. Ces résultats concordent avec l'expression augmentée de la molécule CD39 à la surface des mTregs des patients tolérants comparés aux patients stables (Braza et al., 2015c). Bien que la question d'un rôle crucial de la fonction ATPasique de la molécule CD39 en transplantation ait été soulevée à plusieurs reprises (Braza et al., 2015b; Roberts et al., 2014; Salcido-Ochoa et al., 2010), cette étude est, à notre connaissance, la première suggérant chez l'Homme, une implication de la fonction ATPasique des Tregs dans le cadre de la tolérance opérationnelle.

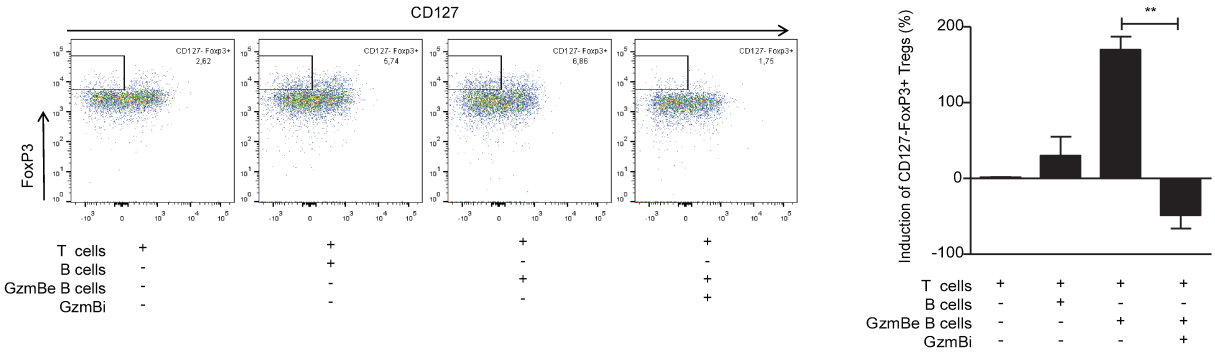


Figure 12 : Induction de Tregs par les lymphocytes B GzmB+ *in vitro*

Les lymphocytes B enrichis en cellules GzmB+ (GzmBe B cells) sont capables d'induire des cellules Tregs FoxP3+ CD127- à partir de cellules T conventionnelles CD4+CD25- stimulées après 3 jours de culture. L'ajout d'un inhibiteur du granzyme B dans la culture inhibe entièrement l'induction de ces Tregs in vitro. (Données non publiées).

La fonction ATPasique de CD39 est souvent associée à la fonction de dégradation de l'AMP en adénosine par la molécule CD73 (Schuler et al., 2014). Nous démontrons ici que dans le cadre de la tolérance opérationnelle, les mTregs dégradent d'importante quantité d'ATP extracellulaire mais produisent peu d'adénosine et n'expriment pas la molécule CD73. Ainsi, ces cellules vont jouer sur l'environnement cellulaire et la balance pro-inflammatoire/pro tolérogène en dégradant l'ATP, une molécule pro-inflammatoire (Bours et al., 2006).

De la même façon que pour l'augmentation du pourcentage de Tregs circulants, l'activité ATPasique des mTregs accrue chez les patients tolérants soulève plusieurs questions dont celle du rôle joué par l'immunosuppression chez les patients stables sur l'expression de CD39 et sa fonction de dégradation de l'ATP. Dans cette étude nous montrons, *in vitro*, que, bien que le profil Treg soit sensible aux traitements

immunosuppresseurs, il semble que ni le Tacrolimus, la cyclosporine, ou le MMF n'influence l'expression de CD39 à la surface des Tregs et donc leur fonction ATPasique.

De façon intéressante, il semble qu'un environnement inflammatoire comprenant une stimulation antigénique chronique, en présence d'IL-2 et de TGF-ß influence la prolifération des Tregs $CD39^+$ (Gu et al., 2017; Moncrieffe et al., 2010; Rissiek et al., 2015). Comme discuté précédemment, les patients tolérants présentent un tel environnement pro-TGF-ß (Brouard et al., 2007). Il est donc possible que chez ces patients, une exposition constante aux allo-antigènes du greffon dans un environnement pro-TGF-ß puisse être à l'origine à la fois de la prolifération des mTregs $CD39^+$ et de l'augmentation de leur capacité ATPasique.

Une autre question importante est celle du rôle des mTregs dégradant l'ATP au niveau du greffon lui-même. En effet, du fait de la rareté des patients tolérants et de la bonne fonction de leur greffon, il est difficile pour des raisons éthiques évidentes de réaliser des biopsies du greffon afin d'analyser la présence de mTregs et leur capacité à dégrader l'ATP extracellulaire. Cependant, nous pouvons penser qu'au sein du greffon, chez les patients tolérants, en l'absence d'immunosuppression le greffon est constamment reconnu comme du non-soi et donc attaqué comme tel. Cette réponse immunitaire envers l'allogreffe se traduit par la mort des cellules du greffons et donc le relargage d'ATP extracellulaire (Figure 13).

En tant que médiateur pro-inflammatoire, l'ATP non dégradé peut fixer ses récepteurs à la surface des cellules lymphocytaires T et être impliqué dans leur activation et leur prolifération (Bours et al., 2006) (Figure 14). La présence, au sein du greffon, de mTregs pourrait permettre la dégradation de cet ATP en ADP et AMP et ainsi inhiber l'effet pro-inflammatoire de l'ATP. Dans ce contexte, bien que faible, une production d'adénosine pourrait aussi être retrouvée grâce à la dégradation de l'AMP par les mTregs ou par d'autres cellules présentes dans le greffon exprimant le CD73. L'adénosine produite pourrait permettre, en se fixant sur ses récepteurs, l'inhibition des réponses T conventionnelles et l'augmentation des capacités régulatrices des Tregs (Figure 14).

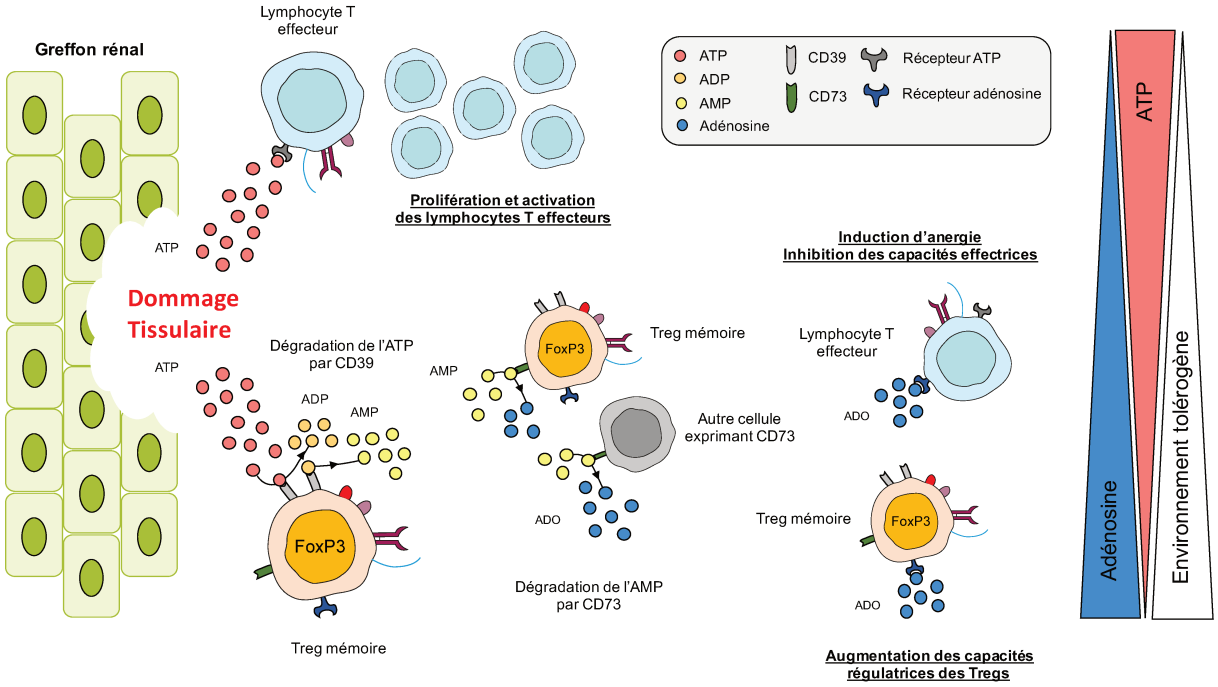


Figure 13 : Hypothèse du rôle de l'activité ATPasique des mTregs dans l'allogreffe

Cette régulation constante de la réponse locale dirigée contre le greffon pourrait expliquer l'absence d'un infiltrat lymphocytaire chez les patients tolérants comparés à des patients présentant un rejet (Roussey-Kesler et al., 2006). Une des possibilités pour pouvoir valider ou non cette hypothèse chez les patients transplantés rénaux consiste en l'étude des urines. Dans ce cadre, nous nous intéressons actuellement à l'analyse des transcrits FoxP3, CD25, et CD39 dans les urines des patients transplantés. Enfin nous avons initié une collaboration dans le but de doser directement dans les urines l'ATP et ses produits de dégradation.

Cette étude nous a donc permis d'identifier la fonction ATPasique des lymphocytes T régulateurs mémoires comme un des mécanismes potentiellement impliqués dans le maintien d'une fonction rénale stable en l'absence de traitement immunosuppresseurs après transplantation rénale. Cependant plusieurs questions restent sans réponses : À partir de quel moment les patients tolérants présentent-ils ce profil Tregs particulier (avant ou après l'arrêt des traitement) ? Quels sont les mécanismes à l'origine de l'induction de cette sous population mémoire de Tregs chez les patients opérationnellement tolérants ? Que se passe-t-il au sein même du greffon, la dégradation de l'ATP extracellulaire joue-t-elle un rôle important dans la balance tolérance/rejet ?

II. DISCUSSION DE L'ARTICLE 2

Le poumon est encore aujourd'hui l'organe solide pour lequel, après transplantation, la survie à long terme reste très faible comparé au rein, au foie, au pancréas et au cœur (Royer et al., 2016). A partir de 3 ans post-transplantation, les survies du greffon et du patient sont principalement impactées par le développement de dysfonction chronique (ISHLT Report, JHLT, 2016). Près de 50% des patients transplantés pulmonaires développent dans les 5 années suivant la greffe un Syndrome de Bronchiolite Oblitérante (BOS) (Royer et al., 2016). Cette atteinte se caractérise par une fibrose pulmonaire irréversible, actuellement difficile à traiter, elle va progressivement provoquer une obstruction des voies bronchiques et une perte de fonction du greffon (Royer et al., 2016; Verleden et al., 2015b). Le BOS est donc une situation pathologique pour laquelle les mécanismes immunologiques et non immunologiques impliqués sont mal connus et l'identification de marqueurs de la défaillance chronique du greffon n'a pas encore permis de prévenir son développement chez les patients transplantés.

Dans le cadre de notre étude portant sur l'analyse des profils lymphocytaires T CD4 et T CD8 circulants chez des patients transplantés pulmonaires, nos premiers résultats ont permis de mettre en évidence un profil lymphocytaire très proche entre les patients stables et les patients développant un BOS, au moment du diagnostic du BOS et dans les mois précédents. Nous démontrons en effet, que les proportions de lymphocytes T CD8 (naïfs, central mémoires, effecteurs mémoires et TEMRA), et CD4 (naïfs mémoires, folliculaires helper et régulateurs) ne sont pas significativement différentes dans les deux groupes de patients transplantés. En revanche, bien que le profil lymphocytaire T CD8 ne soit pas non plus modifié peu de temps après transplantation, nous mettons en évidence une altération du profil T CD4 dès un mois après transplantation chez les patients qui développeront un BOS à long terme. Cette première observation soulève néanmoins plusieurs questions.

Tout d'abord celle de la cinétique des réponses allo-immunes impliquées dans le développement du BOS. En effet, plusieurs équipes se sont intéressées à la fois à l'identification de marqueurs sanguins et des facteurs de risque du BOS. Ainsi

différents événements inflammatoires précoces sont associés au développement du BOS à long terme (Bowdish et al., 2004) : les épisodes de rejet aigus (Hodge et al., 2012; Khalifah et al., 2005), les lésions tissulaires dépendantes des mécanismes d'ischémie reperfusion (Fiser et al., 2002) ou encore la survenue de dysfonction primaire du greffon (Daud et al., 2007). De plus, l'analyse du sang périphérique peu de temps après transplantation révèle une augmentation des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (Bharat et al., 2007) ainsi qu'une altération des microARN sériques (Budding et al., 2017) chez les patients qui développeront un BOS comparés aux patients présentant un greffon stable à long-terme. Les résultats de ces études, ainsi que les nôtres, suggèrent que les mécanismes immuns / inflammatoires qui vont conduire au développement du BOS sont mis en place peu de temps après la transplantation.

Une seconde interrogation est celle du compartiment étudié. En effet si le profil lymphocytaire T circulant diffère entre les patients qui développent un BOS et les patients présentant un greffon stable à 3 ans uniquement dans les mois suivants la transplantation, qu'en est-il dans l'allogreffe pulmonaire ? Plusieurs études ont comparé les compartiments sanguins et pulmonaires en analysant notemment le lavage broncho-alvéolaire ou lors d'études de biopsies pulmonaires. De façon intéressante, la majorité d'entre elles rapportent d'importantes différences entre ces deux compartiments et l'utilité des lavages broncho-alvéolaires et des biopsies comme outils nécessaires à la prédiction, au diagnostic et à la meilleure compréhension des mécanismes liés au BOS (Davis et al., 2010; Greenland et al., 2014; Gregson et al., 2010; Jonigk et al., 2015; Kennedy et al., 2013). Cependant, aucune étude n'a pu comparer ou mettre en évidence un lien entre le profil immunitaire sanguin peu de temps après transplantation et le profil immunitaire local, dans l'allogreffe au cours du temps. Ainsi, l'analyse, dans notre cohorte de patients, du profil lymphocytaire T CD4 dans des lavages broncho-alvéolaires nous permettrait d'identifier ou non une altération du compartiment T CD4, observé dans le sang peu de temps après transplantation.

Le deuxième résultat principal de notre étude est l'augmentation de la fréquence des cellules $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$ circulantes à 1 et 6 mois post-transplantation chez les patients qui développeront un BOS à 3 ans comparés aux patients stables.

Cette augmentation semble être indépendante du régime d'induction des patients et de leurs traitements immunosuppresseurs. De nombreuses études ont mis en évidence chez l'Homme ces cellules $CD25^{high}FoxP3^{+}$ comme des cellules Tregs $CD4^{+}$ présentant des propriétés immuno-régulatrices (Sakaguchi, 2004). Nous nous sommes donc intéressés à la sécrétion cytokinique de ces cellules ainsi qu'à l'expression de marqueurs spécifiques des sous-populations de Tregs. Le but étant de comparer les caractéristiques de ces cellules chez les patients BOS et stables à celles de volontaires sains. Nos résultats démontrent à la fois une expression des cytokines pro et anti-inflammatoires et une homéostasie des sous-population Tregs équivalentes chez les volontaires sains comparés aux deux groupes de patients transplantés, suggérant un profil régulateur de ces cellules $CD25^{high}FoxP3^{+}$ chez les patients transplantés.

Une augmentation de cellules Tregs circulantes chez des patients qui vont développer un BOS comparés à des patients stables peut paraître surprenante. Cependant, dans le contexte de la transplantation pulmonaire, le lien entre le profil Treg circulant ou local et la bonne fonction du greffon à long terme reste controversé. En effet, alors que certaines études montrent une augmentation de cellules Tregs dans les BAL lors de rejets aigus peu de temps après transplantation chez des patients qui développeront un BOS à long terme (Greenland et al., 2014), d'autres, mettent en évidence une augmentation de la proportion de Tregs circulants chez les patients stables comparés aux patients BOS (Bhorade et al., 2010; Meloni et al., 2004b; Salman et al., 2017) ou encore aucune différence dans le profil Tregs entre ces deux groupes de patients (Budding et al., 2015). Cependant, le lien entre le développement de réponses inflammatoires post-transplantation, facteur de risque du développement du BOS, et l'augmentation des Tregs circulants est clairement établie à la fois en transplantation pulmonaire et dans d'autres transplantations d'organes solides (Bestard et al., 2008; Boix-Giner et al., 2016; Greenland et al., 2014).

Une des hypothèses pouvant expliquer cette augmentation des Tregs circulants chez les patients qui développent un BOS comparés aux patients stables pourrait donc être l'augmentation de la fréquence de ces cellules en réponse à un évènement inflammatoire sub-clinique mis en place peu de temps après transplantation, qui par sa chronicité va aboutir au développement d'un BOS. Ainsi les lymphocytes T

régulateurs ne seraient pas capables de prévenir le développement du BOS à long-terme, soit par un défaut de fonction ou de quantité au niveau du greffon. La mise en évidence de l'importance du TGF-ß dans le processus de développement du BOS vient étayer cette hypothèse. Il est décrit qu'une sécrétion accrue de TGF-ß est retrouvé dans différent processus inflammatoires chroniques et aigus. Dans le cadre de la transplantation pulmonaire, la sécrétion de TGF-ß, serait impliquée dans le passage d'un phénotype épithéliale à un phénotype mésenchymateux des cellules épithéliales bronchiques aboutissant à la mise en place de fibrose pulmonaire lors du développement du BOS (Hodge et al., 2009). De plus, Derhovanessian et al., ont mis en évidence peu de temps après transplantation, une forte concentration de TGF-ß dans les BAL des patients atteints de dysfonction primaire du greffon développant à long terme un BOS (Derhovanessian, 2016). Or, le rôle du TGF-ß associé à une stimulation du TCR dans l'induction de l'expression de FoxP3 par des lymphocytes T conventionnels et donc l'induction de Tregs est aujourd'hui bien décrit et pourrait être impliqué dans l'induction de cellules Tregs en périphérie chez les patients développant un BOS à long terme (Chen and Konkel, 2010; Chen et al., 2003; Ohkura et al., 2012). Le dosage du TGF-ß dans le sérum à 6 mois et 1 ans chez les patients développant un BOS a long-terme pourrait nous permettre de valider ou non cette hypothèse.

Enfin, nous avons démontré l'intérêt potentiel de cette proportion de Tregs dans les 6 mois suivants la transplantation comme biomarqueur prédictif de la survenue de BOS. En effet, dans notre étude, les patients présentant plus de 2,4% de Tregs parmi les lymphocytes T CD4 à la fois à 1 mois et à 6 mois post-transplantation possèdent une survie à l'évènement BOS significativement plus faible que les patients présentant une proportion de Tregs inférieure à 2,4% des lymphocytes T CD4. Notre analyse a aussi mis en évidence le fait que cette proportion élevée de lymphocytes Tregs circulants dans les 6 mois post-transplantation est un facteur de risque du développement du BOS dans le temps, indépendant des autres facteurs de risque déjà identifiés. De précédentes études ont déjà identifié des biomarqueurs prédictifs de la survenue du BOS (Brugière et al., 2015; Budding et al., 2016; Hall et al., 2012). Au sein du COLT consortium, nous avons aussi récemment identifié, à l'aide des patients de la même cohorte COLT, des marqueurs cliniques (Koutsokera et al., 2017) et des biomarqueurs transcriptomiques (Danger et al., données non publiées) et sanguins (Brosseau et al., données non publiées) prédictifs de la survenue du BOS. Ainsi

l'intégration de l'ensemble de ces marqueurs dans un nouvelle étude sur un plus grand nombre d'individus nous permettrait d'identifier plus finement les patients transplantés pulmonaires à risque de développement d'un BOS.

Cette étude nous a donc permis d'identifier une altération du profil lymphocytaire T régulateur chez les patients développant un BOS à long terme. Bien que ne nous ne pensons pas que ces cellules Tregs soit impliquées dans les processus allo-immuns délétères menant au développement du BOS, mais qu'elles sont induites afin de contrôler des événements inflammatoires sub-cliniques, le suivi de leur fréquence dans le sang pourrait permettre d'identifier dès 6 mois après la transplantation, les patients à risque de développement de BOS. Cependant, le suivi de ce biomarqueur sur une plus grande cohorte de patients transplantés pulmonaires pourrait permettre de valider son intérêt en routine clinique. De plus, plusieurs questions restent sans réponses : Quels sont les mécanismes impliqués dans l'induction de ces Tregs chez les patients qui développerons un BOS à long terme ? Pourquoi ces Tregs ne sont pas capables d'inhiber la progression du BOS chez ces patients ? Quel est le rôle de ces Tregs au sein de l'allogreffe pulmonaire, sont-elles présentes et capables d'assurer leur fonction régulatrice ?

III. DISCUSSION GÉNÉRALE

Il semble que les mécanismes menant au rejet ou au maintien de l'allogreffe après transplantation différent en fonction de l'organe transplanté : en fonction de leur immunogénécité, de l'environnement cellulaire mais aussi de leur lien avec l'extérieur. Dans ce contexte, le rôle central des lymphocytes T régulateurs FoxP3$^+$ dans les mécanismes de tolérance périphérique envers les antigènes du soi suggèrent leur rôle potentiel dans la prévention du rejet d'allogreffe. Néamoins, ces lymphocytes Tregs sont des cellules complexes et plastiques présentant plusieurs sous-populations et différents mécanismes d'action. Une meilleure compréhension de leur phénotype et de leurs mécanismes de supression dans différents contextes de greffe d'organe solide s'avère necessaire pour mieux comprendre leur role en transplantation. Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont visé à mieux comprendre la fonction des Tregs en tolérance opérationelle après transplantation rénale et ont identifié ces Tregs comme potentiel biomarqueur prédictif du développement de Bronchiolite Oblitérante après transplantation pulmonaire chez l'Homme.

Nous avons d'abord décrit, chez des patients opérationellement tolérants, un maitien du profil lymphocytaire T régulateur physiologique se traduisant par une porportion plus importante de Tregs mémoires et une balance lymphocytaire T pro-tolérogène chez les patients tolérants et les volontaires sains comparés aux patients stables sous traitements. D'après les données de la littérature et nos analyses réalisées *in vitro*, il semble que les inhibiteurs de la calcineurine pourraient etre impliqués dans cette modulation du profil Tregs chez les patients stables. Nous avons aussi mis en évidence le maitien de la fonction de dégradation de l'ATP par les Tregs mémoires chez les patients opérationellement tolérants. Il semblerait que cette fonction ATPasique ne soit pas sensible aux traitements immunsupresseurs, au moins *in vitro*. Cela suggère que la dégradation de l'ATP extracellulaire par les Tregs mémoires, fonctionelle chez les patients tolérants comparés aux patients stables, pourrait participer au maintien d'une fonction stable de l'allogreffe rénale en absence de traitement immunosupresseurs.

Dans un second modèle de transplantation, nous avons identifié une proportion accrue de lymphocytes T regulateurs FoxP3$^+$ dans le sang de patients développant

une perte de fonction chronique de leur greffon à long-terme comparés à des patients stables. Ce profil Treg permet de différencier ces deux groupes de patients dès les 6 premiers mois après transplantation. Il semble que l'ensemble des sous-populations de Tregs soient augmentées chez les patients BOS comparés aux patients stables. De plus, ces Tregs présentent une capacité équivalente dans la secretion d'IL-10 chez ces deux groupes de patients. Enfin, nous avons démontré l'intérêt potentiel de cette proportion de Tregs dans les 6 mois suivants la transplantation comme biomarqueur prédictif de la survenue de BOS. Ce biomarqueur permet de diférencier les patients BOS et les patients stables indépendemment des autres facteurs de risque déjà identifiés dans la perte de fonction chronique du greffon après transplantation pulmonaire.

Il est intéressant de noter que dans deux situations diamétrallement opposées : le maintien d'un greffon rénal fonctionel en absence d'immunosupression et le developpement de dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire à long-terme ; nous observons une augmentation de la proportion de lymphocytes T régulateurs circulants. Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant ces résultats. En effet, le rôle des Tregs étant bien décrit dans le contrôle des réactions immunes, l'implication de la population mémoire et de sa fonction ATPasique dans le maintien d'un greffon stable chez les patients opérationellement tolérants est fortement suggéré. Dans le cadre de la bronchiolite oblitérante, les données de la littérature ne suggèrent pas une implication directe des Tregs dans l'initiation de la pathologie. Cependant, l'augmentation de la proportion de Tregs circulants en réponse à différents phénomènes inflammatoires post-transplantation (rejet aigus, dysfonction primaire du greffon, ischémie-reperfusion) pourrait expliquer nos résultats. Ainsi les patients développant un BOS à long-terme seraient sujets à une inflammation chronique dans les premiers mois suivants la transplantation ce qui causerait l'augmentation des Tregs circulants. Des études *in vivo*, dans un modèle de dysfonction chronique après transplantation pulmonaire chez la souris permettraient de mieux comprendre les raisons pour lesquelles, les Tregs circulants, augmentés en proportion ne permettent pas le contrôle de la survenue du BOS.

ANNEXES

I. LA TOLÉRANCE OPÉRATIONNELLE

A. Article n°3

Un score composite associé avec la tolérance opérationnelle spontanée chez les patients transplantés rénaux

A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients

R. Danger, M. Chesneau, C. Paul, P. Guerif, M. Durand, K.A. Newell, S. Kanaparthi, L.A. Turka, J.P. Soulillou, R. Houlgatte, M. Giral, G. Ramstein and S. Brouard

(Publié dans Kidney International : 91, 1473–1481 ; 2017)

Les nouveaux défis dans le domaine de la transplantation rénale inclus l'utilisation d'informations biologiques pour mettre au point un test clinique robuste qui permettrait de discerner les patients à fort ou à faible risque pour pouvoir recevoir une thérapie personnalisé. Cela permettrait aussi de mieux determiner les combinaisons et doses adéquates de ces traitements. En se basant sur une signature transcriptomique de 20 gènes issues d'une méta-analyse réalisée sur 46 patients tolérants et 266 patients ayant une fonction stable de leur greffon, nous avons appliqué la méthode de Bolasso et nous avons identifié une combinaison minimale et robuste de 6 gènes et deux paramètres démographiques associés à la tolérance opérationelle après transplantation rénale. Ce score composite de tolérance opérationnelle a permis de distinguer les patients tolérants avec une aire sous la courbe de 0,97 (intervalle de confiance à 95% 0,94-1,00). Le score identifié n'est pas influencé par le traitement immunosupresseur, le centre d'origine des patients, le type de donneur ou le développement de lymphome post-transplantation. Ce score composite de tolérance opérationnelle est significativement associé à la fois aux anticorps anti-HLA de novo et à la perte de tolérance. Il a été validé par PCR quantitative en utilisant des échantillons indépendants et a montré une spécificité vis-à-vis d'un modèle d'induction de tolérance. Ainsi, notre score permettrait aux cliniciens d'améliorer le suivi des patients, ouvrant la voie à une thérapie personnalisée.

www.kidney-international.org clinical investigation

A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients

Richard Danger[1,2], Mélanie Chesneau[1,2], Chloé Paul[1,2], Pierrick Guérif[1,2], Maxim Durand[1,2], Kenneth A. Newell[3], Sai Kanaparthi[4], Laurence A. Turka[5], Jean-Paul Soulillou[1,2], Rémi Houlgatte[6,7], Magali Giral[1,2,8,9], Gérard Ramstein[10] and Sophie Brouard[1,2,9]

[1]Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France; [2]Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France; [3]Department of Surgery, Emory University, Atlanta, Georgia, USA; [4]Immune Tolerance Network, Bethesda, Maryland, USA; [5]Center for Transplantation Sciences, Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA; [6]INSERM UMR 954, Nancy, France; [7]CHU de Nancy, DRCI, Nancy, France; [8]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; [9]CIC Biotherapy, CHU Nantes, Nantes, France; and [10]LINA DUKe, UMR 6241, Université de Nantes, Ecole des Mines de Nantes and CNRS, Nantes, France

New challenges in renal transplantation include using biological information to devise a useful clinical test for discerning high- and low-risk patients for individual therapy and ascertaining the best combination and appropriate dosages of drugs. Based on a 20-gene signature from a microarray meta-analysis performed on 46 operationally tolerant patients and 266 renal transplant recipients with stable function, we applied the sparse Bolasso methodology to identify a minimal and robust combination of six genes and two demographic parameters associated with operational tolerance. This composite score of operational tolerance discriminated operationally tolerant patients with an area under the curve of 0.97 (95% confidence interval 0.94–1.00). The score was not influenced by immunosuppressive treatment, center of origin, donor type, or post-transplant lymphoproliferative disorder history of the patients. This composite score of operational tolerance was significantly associated with both *de novo* anti-HLA antibodies and tolerance loss. It was validated by quantitative polymerase chain reaction using independent samples and demonstrated specificity toward a model of tolerance induction. Thus, our score would allow clinicians to improve follow-up of patients, paving the way for individual therapy.

Kidney International (2017) **91,** 1473–1481; http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.020

KEYWORDS: biomarker; gene expression; graft survival; operational tolerance; renal transplantation

Copyright © 2017, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Correspondence: *Sophie Brouard, INSERM UMR 1064-ITUN, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 93, France. E-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr*

Received 21 August 2016; revised 29 November 2016; accepted 22 December 2016; published online 24 February 2017

Because of immunosuppression side effects,[1,2] physicians are encouraged to reduce immunosuppression while still protecting the graft from immune aggression.[3] No clinical biomarker that allows the safe personalization of immunosuppression has been validated.[4,5] Achieving allograft tolerance in solid organ transplantation—allograft acceptance in the absence of immunosuppression—would be a tremendous stride forward by avoiding these side effects but also by decreasing the cost of transplantation maintenance[6] while improving recipient quality of life. Several protocols of tolerance induction have been, attempted but these approaches remain experimental.[7–12] Spontaneous tolerance has also been observed as a result of immunosuppression interruption for noncompliance or medical decisions (especially posttransplantation lymphoproliferative disorders).[13–15] These operationally tolerant (TOL) recipients display stable and good graft function for years, respond to immunologic challenge,[13,16] and do not experience more opportunistic infections than healthy volunteers.[13,14] From a clinical point of view, these patients are comparable to renal recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA) with only a few differences, including a higher proportion of grafts from living donors and lower levels of human antileukocyte antigen (HLA) mismatch.[13,17]

To date, no parameter has been identified that will safely permit weaning off immunosuppression, even in trials based on a stringent selection of nonsensitized recipients.[18–20] Thus, the intentional replication of immunosuppression withdrawal in renal transplantation requires the integration of appropriate clinical parameters and new laboratory tests. Our group and others highlighted gene signatures associated with operational tolerance, but none have yet been evaluated in clinical trials.[17,21–30] Recently, an integrative meta-analysis further highlighted 20 genes, mainly B cell related, specific to operational tolerance.[21] Collectively, these reports suggest that B cells of tolerant patients may offer potential biomarkers of low immune risk in transplantation and may actively regulate the immune response to a transplanted kidney, with their induction and expansion likely being favored by induction therapies.[31] Although the utility of such signatures

has been established,[32,33] we need to demonstrate their safety and reliability for immunosuppression minimization and follow-up of transplant recipients.

Herein, we identified and validated a composite score that allows TOL patients to be identified with excellent accuracy, representing a potential predictive score of tolerance applicable in clinical practice in order to improve follow-up of renal transplant recipients.

RESULTS

Clinical parameters associated with operational tolerance

From the meta-dataset that we previously described,[21] clinical data from Nantes, Indices of Tolerance (IOT), and Immune Tolerance Network (ITN) databases were used to identify 312 nonredundant patients: 46 individual TOL patients of 96 TOL samples and 266 STA patients of 311 STA samples (Supplementary Table S1). To construct a predictor score of operational tolerance easily applicable and reproducible in various centers, we selected intrinsic and nonvariant patient-related clinical parameters, excluding parameters that may depend on technique and transplant center. Due to missing data, likely reflecting patient noncompliance, only parameters available for at least half of the TOL patients were used. Four of these parameters associated with operational tolerance status ($P < 0.20$) were selected: age at transplantation ($P < 0.0001$), age at testing ($P = 0.176$), number of HLA mismatches ($P < 0.0001$), and donor sex ($P = 0.154$) (Supplementary Table S2).

Composite score of operational tolerance

Expression levels of the 20 genes that were previously reported as the differential between TOL and STA patients[21] were confirmed in this set of 312 patients (46 TOL and 266 STA patients; $P < 0.0001$). To identify the most discriminative combination in the 20 genes and the 4 clinical parameters, we used the Bolasso method,[34] which is a least absolute shrinkage and selection operator regression analysis combined with bootstrap resampling (10,000 times) followed by multiple testing (false discovery rate <0.05).[35]

We identified a combination of 6 genes (*AKR1C3* [aldo-keto reductase family 1], *CD40*, *CTLA4* [cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4], *ID3* [inhibitor of DNA binding 3], *MZB1* [marginal zone B and B1 cell–specific protein], *TCL1A* [T-cell leukemia/lymphoma protein 1A], and 2 clinical parameters (age at testing and age at transplantation) (Figure 1a and b) that enabled us to establish a composite score, the composite score of operational tolerance (cSoT), discriminating TOL and STA patients (42 TOL patients, 189 STA patients, $P < 0.0001$) with an area under the curve (AUC) of 0.973 (95% confidence interval [CI] 0.939–1.00), with negative and positive predictive values of 0.989 and 0.800, respectively (Figure 1c, d). The consistency of the 8 selected parameters was validated by a 10-fold cross-validation repeated 100 times. The 8 selected parameters were present in at least 80% of the 1000 generated models (Figure 1a). The cSoT robustness was validated by a 10-fold cross-validation repeated 100 times with a mean AUC for test sets of 0.967 (95% CI 0.966–0.968). The cSoT discriminated TOL patients from STA patients significantly better than each parameter alone ($P < 0.0001$, Figure 1c) and better than graft function (AUC = 0.615). The cSoT represents the best combination of parameters compared with the combination of the 6 genes only as observed by the goodness of fit of these scores ($P < 0.0001$ in a Fisher test based on the residual sum of squares). Inherent in this composite score and due to the Lasso method, cSoT equation coefficients provide biased and limited information to interpret parameters contribution.[36,37] However, removing either the 2 age parameters or the 6 genes decreases the AUC values compared with the cSoT (AUC = 0.947 and 0.828, $P = 0.10$ and 0.00031, respectively), and gene expression contributes more significantly than demographic parameters ($P = 0.011$, Supplementary Figure S1). A final cross-validation was then performed on a recent microarray dataset composed of 16 TOL patients and 9 patients with chronic allograft nephropathy.[38] The combination of the 6 genes allowed a significant discrimination of the TOL patients from the others (AUC = 0.825, 95% CI 0.636–1.014; $P = 0.0061$).

Center of origin, posttransplantation lymphoproliferative disorder, donor type, and immunosuppressive regimen do not influence the cSoT

Despite the heterogeneity of TOL samples obtained from multiple sites (Nantes, IOT, and ITN) and different blood collection methods,[17,24,28,39,40] the cSoT is not influenced or associated with patient origin ($P = 0.13$; Figure 2a). Our analysis failed to reveal an association with a history of a posttransplantation lymphoproliferative disorder, the main intentional reason for cessation of immunosuppression ($N = 4$, $P = 0.19$, Figure 2b). Despite an imbalance of donor type (living vs. nonliving donor) in our meta-dataset (Supplementary Table S1), scores were not different between TOL samples receiving organs from living donors or nonliving donors ($P = 0.58$; Figure 2c). With nonliving donors only, the cSoT is still able to differentiate TOL patients from STA patients with a very good AUC (AUC = 0.977, 95% CI 0.9559–0.9975, 15 TOL patients, 189 STA patients). Because the 2 patient groups used to create the cSoT differed in immunosuppression status (STA patients are under immunosuppression and TOL patients received no more immunosuppression), we assessed whether immunosuppression could affect the cSoT values. Regarding the TOL patients, the previous immunosuppression regimen before its withdrawal, including cyclosporine A (CsA), mycophenolic acid, and azathioprine did not influence cSoT values ($P = 0.74$, 0.81, and 0.61, respectively; 29 TOL patients, Figure 2d). Similarly, in the STA population ($N = 189$), cSoT was not influenced by current calcineurin-based immunosuppression regimen (i.e., CsA or tacrolimus [$P = 0.64$], corticosteroids [$P = 0.42$], and antimetabolite agents [$P = 0.66$]) (Figure 2e). Finally, we tested the effect of immunosuppression on the cSoT in 2 independent cohorts of STA patients[41,42]: 1 cohort

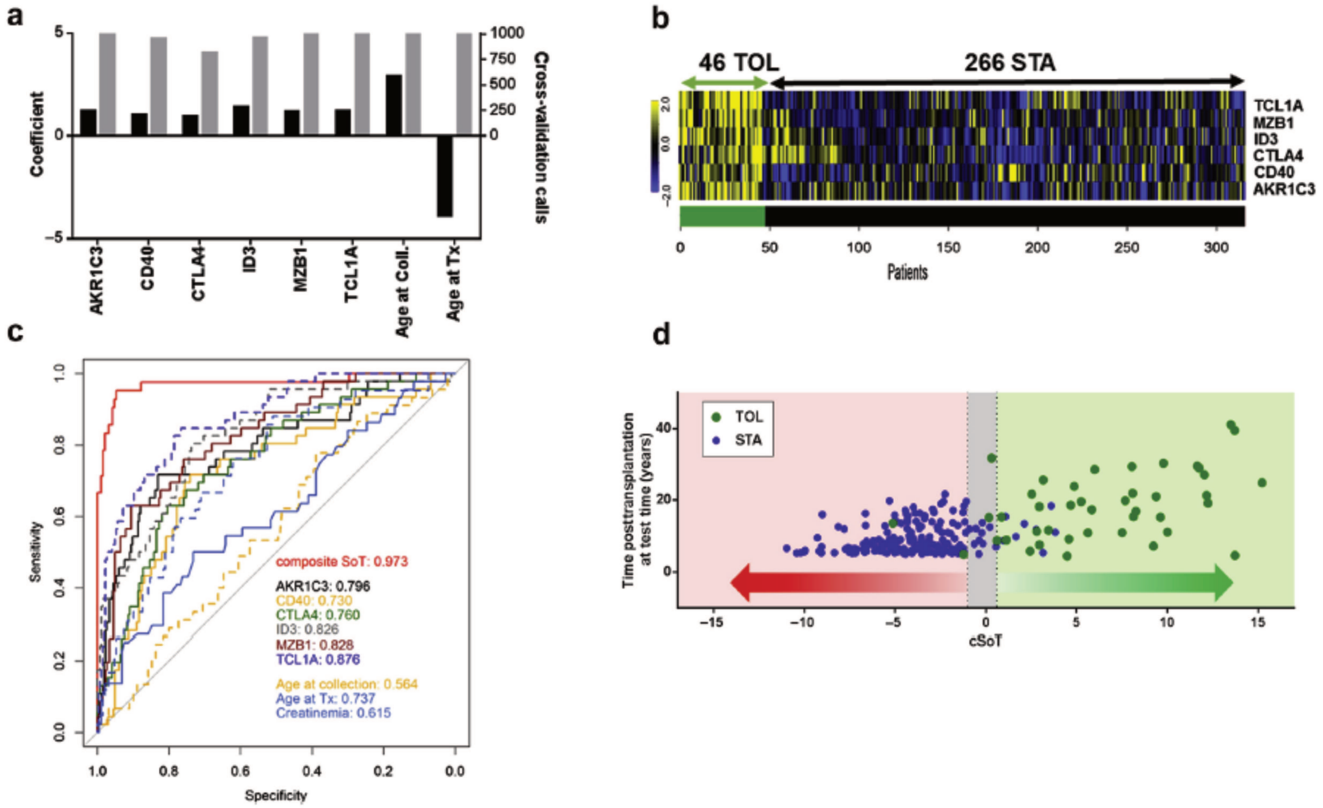


Figure 1| Composite score of operational tolerance (cSoT). (**a**) cSoT model: the left axis displays regularization coefficients of selected parameters (false discovery rate <0.05, black bars) showing their sign of contribution, and the right axis represents the number of selections in the 10-fold cross-validation repeated 100 times, meaning the consistency of parameters selection (gray bars). (**b**) Individual expression of the 6 selected genes. A heat map with blue for low expression and yellow for high expression is displayed for the 312 patients (46 operationally tolerant [TOL] and 266 renal transplanted patients with stable graft function under immunosuppressive regimen [STA]). (**c**) Receiver-operating characteristic curves of the cSoT (red), each cSoT parameter alone, and creatinemia (plain light blue). (**d**) Individual cSoT values as a function of time posttransplantation at testing. The cSoT values for 231 patients are displayed as a function of posttransplantation time (green, 42 TOL patients; blue, 189 renal transplanted patients with stable graft function under immunosuppressive regimen). The gray zone represents the inconclusive zone defined by values with specificity and sensitivity <90%. Coll., collection; Tx, treatment.

of patients under CsA ($N = 14$) or rapamycin ($N = 23$) monotherapy[42] and a second set of patients after a conversion from azathioprine to mycophenolic acid ($N = 5$ paired before and 3 months after mycophenolic acid conversion).[41] Neither the combination of the 6 genes ($P = 0.99$ and 0.77, respectively; Figure 2f) nor the 6 genes independently (Supplementary Figure S2) were modified according to immunosuppression regimen.

cSoT is associated with *de novo* antibody and immune tolerance breakdown

We previously reported that loss of graft function may be observed in the long-term survey of our TOL cohort.[15] Among the 15 TOL patients from the Nantes cohort, for which most clinical data were available, 10 showed a decline in function during follow-up (17.15 ± 3.27 years post-transplantation; Supplementary Figure S3). We measured the cSoT at a time when all patients still exhibited a good graft function (creatinemia, <150 µmol/l; proteinuria, <1 g/24 hr) and found that the cSoT was not predictive of isolated progressive long-term degradation of graft function ($P = 0.14$; data not shown). In contrast, of these 10 patients, the 7 patients who had impaired function and in whom *de novo* anti-HLA antibody (Ab) developed after immunosuppression withdrawal had a lower cSoT ($N = 7$, mean cSoT = 2.73 ± 1.24) than the 3 patients who only showed degraded graft function, without associated anti-HLA Ab appearance (mean cSoT = 8.34 ± 1.37; $P = 0.026$; Figure 3a), although these patients presented similar function at the time of testing ($P = 0.81$, mean = 120.7 ± 8.78 and 125.0 ± 14.36). Regarding initial pathology, of the 3 patients who had impaired function and no donor-specific Ab (DSA), 2 had pyelonephritis and 1 had glomerulonephritis/sclerosis, whereas of the 7 who had impaired function and in whom DSA developed, 4 had glomerulonephritis/sclerosis, 1 pyelonephritis, and 2 an unclassified etiology. Biopsy samples were available for 3 of the patients with anti-HLA Ab, highlighting lesions of chronic Ab-mediated rejection for 2 of them (cases 7 and 10) and for 1 patient without anti-HLA Ab that showed only isolated and nonspecific lesions (case 5).[15]

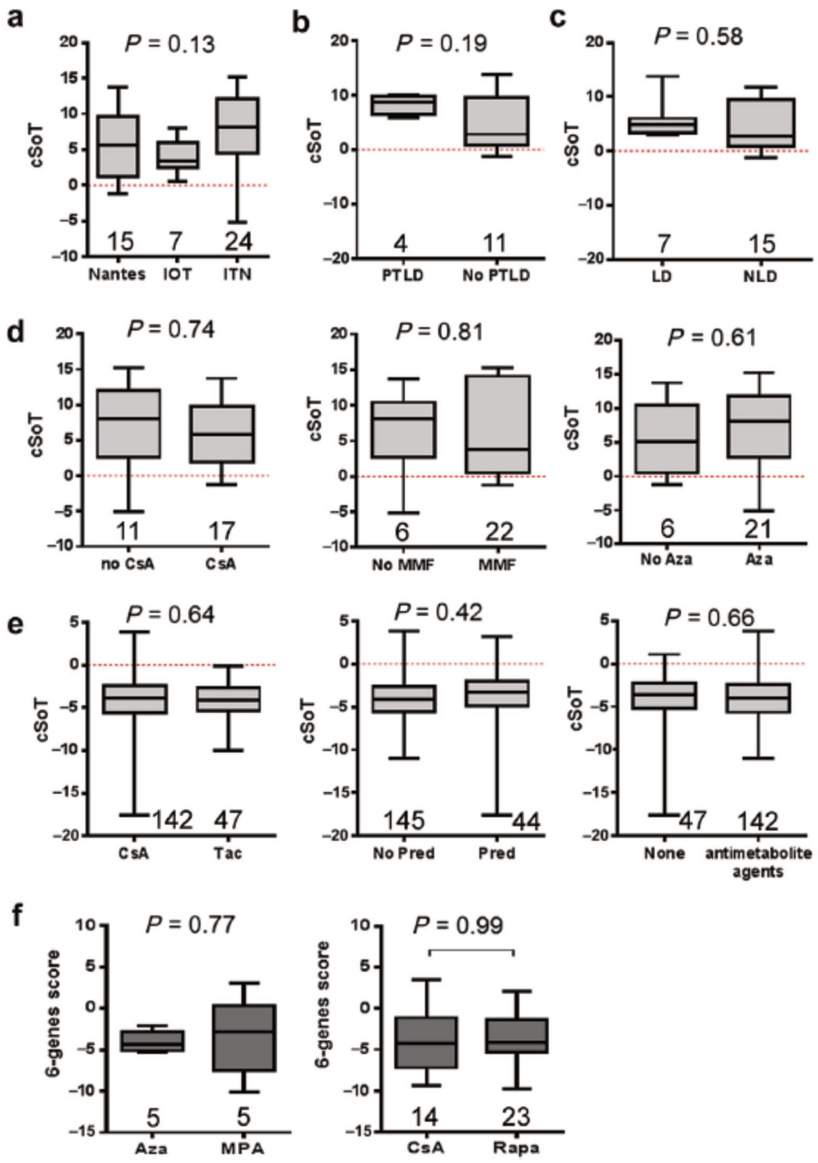


Figure 2| Center of origin, posttransplantation lymphoproliferative disorder (PTLD), donor type, and immunosuppressive regimens do not influence the score of operational tolerance (cSoT). The effect on the cSoT of the center of origin of operationally tolerant (TOL) patients (**a**), presence of PTLD (**b**), donor type (**c**), immunosuppression regimen before withdrawal in TOL patients (cyclosporine A [CsA], azathioprine [Aza], and mycophenolate mofetil [MMF]) (**d**), in renal transplanted patients with stable graft function under immunosuppressive regimen (CsA vs. tacrolimus [Tac], prednisolone [Pred], and antimetabolite agents [MMF or Aza]) (**e**). (**f**) The 6-genes score was calculated using 2 available microarray datasets of renal recipients with different immunosuppression regimens[41,42]: conversion from Aza to mycophenolic acid (MPA) (left) and CsA versus rapamycin (Rapa) (right). The number of patients in each group is indicated within each plot. *P* values from *t* tests uncorrected for multitesting are displayed except in (**a**) where the *P* value from an analysis of variance with Tukey *post hoc* correction is displayed. IOT, Indices of Tolerance; ITN, Immune Tolerance Network; LD, living donor; NLD, nonliving donor.

Finally, we examined the association of the cSoT with *de novo* anti-HLA only, independent of graft loss. Of the 15 TOL patients, *de novo* anti-HLA Ab developed in 8 (14.67 ± 1.13 years posttransplantation, Supplementary Figure S3) and DSA developed in 4 patients as assessed by LABScreenT single Antigen assay (Labscreen Single Antigen; One Lambda, Canoga Park, CA) (13.41 ± 0.21 years posttransplantation). We found that the cSoT is significantly associated with TOL patients who developed *de novo* anti-HLA Ab after immunosuppression withdrawal ($P = 0.016$ and 0.015; collection time = 1.59 ± 2.20 years and 0.29 ± 1.24 years before Ab detection, for anti-HLA Ab and DSA, respectively; Figure 3b). Although the number of patients was limited, these data suggest that the cSoT is associated with immune tolerance breakdown with humoral immunologic signs of rejection and not with an isolated decrease of graft function alone.

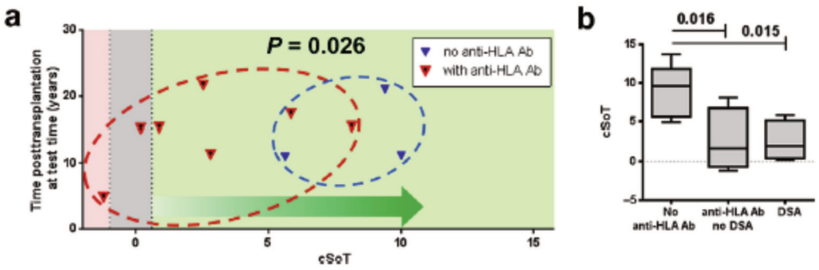


Figure 3 | The score of operational tolerance (cSoT) is associated with *de novo* antibody and tolerance loss. (**a**) The cSoT decreased in patients who exhibited a decrease of function and anti-human leukocyte antigen antibody (anti-HLA Ab) ($N = 7$, red triangles) compared with patients with only a decrease of function ($N = 3$, blue triangle). Individual cSoT values as a function of time posttransplantation at testing. The gray zone represents the inconclusive zone defined by values with specificity and sensitivity <90%. (**b**) The cSoT is associated with *de novo* anti-HLA Ab and DSA appearance.

cSoT is specific for the spontaneous operational tolerance state

We applied the cSoT in a trial of tolerance induction in which 15 renal recipients of HLA-identical living donor siblings were followed for 5 years after transplantation.[9,10] The protocol consisted of infusions of donor hematopoietic $CD34^+$ stem cells with a conditioning regimen, and immunosuppression was withdrawn 2 years after transplantation. Both the cSoT and the 6 genes score failed to classify the 5 tolerant patients as TOL, before and after cessation of immunosuppression, independent of the time posttransplantation (Supplementary Figure 4A). These data suggest that the cSoT is specific to the operational tolerance state and reinforce the fact that the cSoT is not influenced by immunosuppression treatment.

A quantitative polymerase chain reaction cSoT applicable in clinical settings

Quantitative PCR (qPCR) was performed in samples from 5 independent TOL patients and 5 other TOL patients from the meta-dataset at different time points compared with 12 independent STA patients. The cSoT was able to discriminate TOL and STA patients ($P = 0.0072$, $N = 10$ and 12, mean $= 2.48 \pm 5.26$ and -2.58 ± 2.37) with an AUC of 0.842 (95% CI 0.65–1.00; Figure 4). Furthermore, a bootstrap procedure (1000 times) confirmed the robustness of this validation with a mean AUC of 0.840 (95% CI 0.833–0.846). These data demonstrated that the cSoT microarray-derived score can be reproduced using qPCR technology and thereby supporting its use in the clinical setting.

DISCUSSION

Finding the right—or at least the best—balance in drug dosage to avoid both rejection and adverse events is a great challenge for clinicians.[4] Major objectives are to find new immunosuppressive drugs to prevent rejection and to identify biomarkers that would allow predicting rejection and assessing the level of immunosuppression "necessary and sufficient" for a selected patient. Ideally, such a biomarker, or most likely a panel of biomarkers, can be performed rapidly, is sensitive and inexpensive, and should reveal changes in the level or nature of the alloresponse, indicating the need for an appropriate modification of treatment to prevent under- or overimmunosuppression.

Operational tolerance, observed in patients with prolonged graft survival in the absence of immunosuppression and without evidence of destruction of the graft,[13–15] offers a

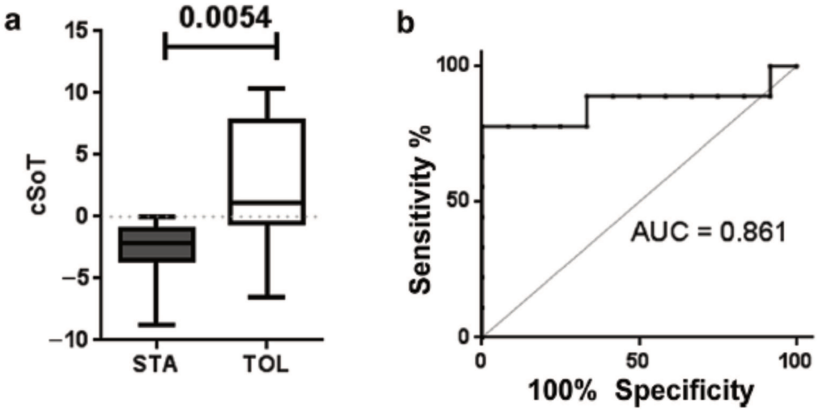


Figure 4 | The score of operational tolerance (cSoT) validated using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). (**a**) Based on qPCR, the cSoT was still a differential between operationally tolerant (TOL) and renal transplanted patients with stable graft function under immunosuppressive regimen (STA) patients ($N = 10$ and 12, mean $= 2.48 \pm 5.26$ and -2.58 ± 2.37. (**b**) Area under the curve (AUC) of 0.842 (95% confidence interval 0.65–1.00).

unique situation for the discovery of biomarkers of low immunologic risk. The identification of a common blood B-cell signature in several independent studies[17,27,28] and its recent confirmation through a meta-analysis[21] have raised the interest that this signature could provide a useful monitoring tool to improve clinical management of recipients.[31] To create a minimally invasive and clinically scalable tool, we adjusted a stable and robust model of nonredundant information composed of 6 genes and 2 clinical parameters. The cSoT allowed differentiation of 42 TOL patients from 189 STA patients more accurately than any parameter alone or creatinemia, the most commonly used biomarker to date. This composite score was tested on 231 recipients (42 TOL, 189 STA), cross-validated in an independent dataset,[38] and validated with qPCR on independent samples with excellent AUCs.

Whereas the TOL state is probably the combination of some intrinsic factors inherent in the donor and the recipients and external influences such as the environment, in accordance with previous reports,[17,21,27,28] the 6-gene signature is mainly related to a unique B-cell population. *TCL1A* was reported to be overexpressed in TOL patients in 3 analyses[17,21,28] and to be decreased during acute rejection, stressing the potential of *TCL1A* as a marker of immune regulation.[43,44] Similarly, *AKR1C3* was also reported to be overexpressed in TOL patients in 3 analyses.[17,21,40] This dominant B-cell signature fits with the immunoregulatory properties of B cells reported in TOL patients[25,27,45] and with the fact that STA patients with superior graft function have a larger number of B cell subsets.[46] Other gene expression–derived scores for tolerance have been recently reported,[17,28,30,38] but because of the absence of these genes in the meta-dataset[21] and the small number of samples in each separate study, patient variability and technical heterogeneity make comparison impossible. In addition to the 6 genes, 2 clinical parameters have been incorporated in the cSoT. Although the 6-gene signature is related to B cells, no association between age at transplantation and B-cell frequency was reported,[27] as also confirmed by the absence of a correlation between CD20 gene expression (*MS4A1*) and age at transplantation in both TOL and STA patients ($r = 0.010$ and -0.012, $P = 0.95$ and 0.87, $N = 42$ and 190, respectively). Younger recipients at transplantation were associated with a higher tolerance prediction in accordance with previous observations.[13–15] This association may reflect the lower percentage of experienced antigen memory cells in younger recipients that accumulate with age and prevent graft tolerance.[47] In liver transplantation, Sánchez-Fueyo and colleagues reported that immunosuppression withdrawal success was directly correlated with the time posttransplantation.[48] This is likely due to the fact that older recipients exhibit fewer acute rejection episodes[49] and are less prone to the development of *de novo* DSA.[50]

As previously reported,[15,17,21,40] we chose to devise the score based on a comparison of TOL and STA patients. The "stable" population appears to be the most clinically relevant as future potential candidates for minimization protocols. Nevertheless, because immunosuppression has been shown to alter gene expression,[41,42,51,52] and particularly circulating B cells,[53] immunosuppression may affect the cSoT. Unfortunately, samples before immunosuppression withdrawal are not available, notably because TOL patients are mainly noncompliant and intentional immunosuppression withdrawal trials have failed.[18,20] However, several elements argue against that. First, we tested this score among different cohorts with different immunosuppression regimens[41,42] and found that the cSoT was not influenced by current or previous immunosuppression treatments. None of the 6 genes was differentially expressed in association with calcineurin inhibitor, mycophenolate mofetil, azathioprine, or steroids in a recent report demonstrating the association of immunosuppresssion with genes from the Indices of Tolerance signature.[30] Finally, the fact that the cSoT was neither modulated after immunosuppression withdrawal in a tolerance induction protocol nor decreased in TOL patients who lost tolerance despite the absence of treatment reinforces this conclusion and the robustness of the score.

There is accumulating evidence that tolerance may break down even years after transplantation in TOL patients.[13–15] However, to what extent the loss of graft function is due to an active shift of tolerance driven by immunologic phenomena and not a physiologic degradation of the kidney has not yet been demonstrated as few biopsy specimens have been examined.[15] The cSoT was associated with *de novo* anti-HLA Ab, including DSA, with or without graft dysfunction, strongly suggesting that the cSoT is specific for immunologically driven mechanisms, as confirmed by the results of 2 available biopsy specimens. This fits with an cSoT largely based on B cell–related genes fitting with a breakdown of B-cell tolerance during chronic Ab-mediated rejection[54] or pretransplantation sensitization and retransplantation that may be associated with a loss of tolerance.[15,55] In this study, 7 TOL patients had a panel reactive Ab test before transplantation and 5 had decreased function in the presence of *de novo* anti-HLA Ab 15.12 ± 2.43 years after transplantation. Thus, the cSoT may not only be useful to discriminate patients with a profile of operational tolerance among STA patients but would also be helpful to follow-up TOL patients themselves. This finding also stresses that anti-HLA Ab seems to be inherently incompatible with the intrinsic definition of tolerance in clinical settings. If this highlights the limitation of the definition of "operational tolerance"[14] and provides clear evidence of its metastable status, it also validates the importance of this score that is able to discriminate anti-HLA Ab+ and anti-HLA Ab− TOL patients. Indeed, current clinical trials would preclude drug minimization in any patient who would have been selected on the basis of a signature observed in sensitized TOL patients.

Some inducing therapies, such as alemtuzumab, are associated with rapid and long-term expansion of different B-cell subsets,[31,56,57] likely favoring a state of tolerance. We took advantage of a transcriptomic analysis of nonchimeric tolerance induction using lymphodepletive alemtuzumab

treatment.[9,10] In agreement with no evidence of B cell–related signature in these patients,[9,10] the cSoT was not discriminative in these patients. Whether the dissimilarity of these results reflects the deep B-cell depletion following induction or that the set of genes in the cSoT may need more time after transplantation to be expressed cannot be totally excluded.[57] This suggests different immunologic statuses of the 2 types of tolerance, with an immune quiescence on the one hand[9] and a full immunocompetence on the other.[16] Contrasting results were reported by Newell's group with patients harboring the B cell tolerance signature of Immune Tolerance Network,[17,31] suggesting that different mechanisms may be involved in tolerance induction, according to the protocol and likely due to the chimerism levels. Tolerance is not an "all or none" phenomenon, as reported by Newell et al.[58]

In summary, we proposed a simple score that is easily applicable in routine clinical settings, using standard qPCR practices, and not influenced by immunosuppression, donor type or posttransplantation lymphoproliferative disorder experience. The cSoT is specific to spontaneous operational tolerance and associated with *de novo* anti-HLA Ab linked to tolerance loss.

This score would not only allow the detection of patients with a tolerance profile but may also be used for monitoring patients and prevent under- or overimmunosuppression, in the general kidney recipient population. Indeed, in addition to being markers of tolerance, several reports showed that the expression of some of these B-cell genes could be used to diagnose patients without acute rejection,[43,44] suggesting that this score may also be useful for identifying immune activation or a lack of B-cell regulation. Based on sample size and selected nature of the population, tolerance signature may not be universally applicable yet and needs further validation in a large cohort of patients. Nevertheless, we think that such a score may allow proposing high- or low-risk individual patient therapies with the best drug combinations and appropriate dosages in the future.

METHODS

Gene expression dataset

The gene expression meta-dataset was obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database (GSE28456) as previously described.[21] These data are the results of a meta-analysis of 5 independent studies gathering 596 samples[17,24,28,39,40] and composed of 1846 merged genes.[21] Demographic description of available clinical parameters from the 312 identified patients (46 TOL and 266 STA) are given in Supplementary Table S1. Three publically available microarray datasets were collected from the GEO database: GSE14630,[41] GSE22224,[42] and GSE45593[9] and normalized with the robust multiarray average method (RMA, *affy* package[59] with R software, R Foundation, Vienna, Austria). Normalized collected expression values from dataset GSE45218[38] were used for *in silico* cross-validation.

Validation cohort

Twenty-two kidney recipients from Nantes Hospital were enrolled to perform qPCR validation, including 10 TOL and 12 STA patients (Supplementary Table S3). The local ethics committee approved all aspects of this study, and all patients gave their written informed consent.

qPCR validation

Venous blood samples were collected in ethylenediamine tetraacetic acid vacutainers and peripheral blood mononuclear cells were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at −80°C. qPCR was performed on a StepOnePlus instrument (Thermo Fisher Scientific) using commercially available primer and probe sets (Taqman, Thermo Fisher Scientific) for the 6 tested genes and 4 reference genes (ACTB, B2M, GAPDH, and HPRT1).

cSoT construction

Parameters associated with TOL patients compared with STA patients in a logistic univariate analysis (*glm* package) were used for cSoT construction with $P < 0.20$ in order not to bias parameter selection.[60] To identify the most discriminative combination among the 24 parameters associated with tolerance in univariate analysis, we used the Bolasso method,[34] which involves bootstrap resampling (10,000 times) combined with a least absolute shrinkage and selection operator regression analysis followed by multiple testing to select the significant variables associated with the model (false discovery rate <0.05) using the *mht* package (version 3.2.2).[35] This cSoT was centered on using the best threshold of the receiver-operating characteristic curve (Youden index) to associate positive and negative scores with TOL and STA diagnosis, respectively. An inconclusive zone ("gray zone") was defined by values with specificity and sensitivity <90% (predictive tolerance of 10%) (Figure 1d, Supplementary Figure S1).[61]

From other microarray datasets or qPCR experiments, expression and demographic values are centered/scaled, as performed by the Bolasso algorithm, and the following equation is then applied: $\text{cSoT} = 1.231 \times \text{Exprs}_{\text{AKR1C3}} + 1.038 \times \text{Exprs}_{\text{CD40}} + 0.937 \times \text{Exprs}_{\text{CTLA4}} + 1.386 \times \text{Exprs}_{\text{ID3}} + 1.163 \times \text{Exprs}_{\text{MZB1}} + 1.223 \times \text{Exprs}_{\text{TCL1A}} + 2.908 \times \text{age at collection} - 3.876 \times \text{age at transplantation} - 2.577$.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software version 3.2.2 or GraphPrism version 4 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Parametric analysis of variance with a Tukey *post hoc* test, Student *t* test, or χ^2 test were used for group comparisons. Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$ or as indicated.

Additional details can be found in the Supplementary Material.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients who participated in this study and the physicians who helped us recruit patients: G. Blancho, L. Braun, D. Cantarovitch, R. Crochette, J. Dantal, A. Garnier, M. Hourmant, B. Hurault de Ligny, H. Janbon, G. Lefrancois, C. Legendre, B. Le Mauff, H. Le Monies De Sagazan, A. Meurette, M.-C. Moal, C. Noel, E. Pillebout, M. Rabant, J.F. Subra, A. Testa, D. Ribes, F. Villemain, and J. Zuber. We also thank the staff of the Immune Tolerance Network and Indices of Tolerance who sent us collected clinical data from previous published reports, Maria Hernandez-Fuentes (Indices of Tolerance,

King's College, London, UK) and Adam Asare (Immune Tolerance Network, Bethesda, MD).

This work was conducted in the context of the "Fondation Centaure" (RTRS), which supports a French transplantation research network, the DHU Oncogreffe and the LabEX IGO supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01 and the LABEX TRANSPLANTEX (ANR-11-LABX-0070_TRANSPLANTEX). This research was also supported by INSERM and IHU-CESTI institutes receiving financial support from the French Government managed by the National Research Agency (Investment into the Future Program ANR-10-IBHU-005), Nantes Metropole, and the Pays de la Loire Region. The research leading to these results has also received funding from the European Commission's Seventh Framework Program FP7-HEALTH-2012 under grant agreement n° 305147 BIO-DrIM, the FP7 VISICORT under grant agreement n° 602470, and from the Fondation Jean Valade. SK was supported by the National Institute of Allergy And Infectious Diseases of the National Institutes of Health under Award Number UM1AI109565. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Materials and Methods

Table S1. Demographic and clinical parameters of operationally tolerant (TOL) patients ($N = 46$) and renal transplanted patients with stable graft function (STA) under an immunosuppressive regimen ($N = 199$).

Table S2. Parameters associated with tolerance status according to univariate logistic regression (operationally tolerant [TOL] patients, $N = 46$); only intrinsic and nonvariant patient-related demographic parameters and known for at least half of the TOL patients were tested.

Table S3. Demographic parameters of patients used in the quantitative polymerase chain reaction validation step (operationally tolerant [TOL] patients, $N = 10$; renal transplanted patients with stable graft function under immunosuppressive regimen (STA), $N = 12$).

Figure S1. (**A**) Sensitivity (green line) and specificity (blue line) according composite score of operational tolerance (cSoT) values. The red line represent the centered best threshold of the receiver-operating characteristic curve (Youden index). The gray zone represents the inconclusive zone defined by values with specificity and specificity <90% (predictive tolerance of 10%). (**B**) Removing either the 2 age parameters (green line) or the 6 genes (black line) decreases the area under the curve (AUC) values compared with the cSoT values (red line) (AUC = 0.947 and 0.828, $P = 0.10$ and 0.00031, respectively).

Figure S2. Individual expression for the 6 genes of the score calculated using 2 available microarray datasets of renal recipients with different immunosuppression regimens[7,8]: cyclosporine A (CsA) versus rapamycin (Rapa) (**A**, $N = 14$ and 23) and conversion from azathioprine (Aza) to mycophenolic acid (MPA) (**B**, $N = 5$). Unpaired (**A**) and paired (**B**) P values from t tests are displayed.

Figure S3. Anti-human leukocyte antigen antibody (HLA Ab) status and outcome for the 15 operationally tolerant patients for whom clinical data were available. The t test P values of comparison of composite score of operational tolerance (cSoT) values between indicated groups are indicated. Histologic diagnoses were performed in a previous study,[13] and corresponding cases are displayed in brackets (cases 5, 7, 10, and 13). CAMR, chronic antibody-mediated rejection; CCR, chronic cellular rejection; DSA, donor-specfic antibody; IF/TA, interstitial fibrosis with tubular atrophy.

Figure S4. The composite score of operational tolerance (cSoT) does not diagnose induction of tolerance after alemtuzumab treatment and multiple hematopoietic stem cell infusions. Individual cSoT values as a function of time posttransplantation at testing for patients with successful tolerance induction during the posttransplantation period. The gray zone represents the inconclusive zone defined by values with specificity and sensitivity <90%.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.kidney-international.org.

REFERENCES

1. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*. 1998;351:623–628.
2. Miller LW. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *Am J Transplant*. 2002;2:807–818.
3. Sawinski D, Trofe-Clark J, Leas B, et al. Calcineurin inhibitor minimization, conversion, withdrawal, and avoidance strategies in renal transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Transplant*. 2016;16:2117–2138.
4. Thaunat O. Finding the safe place between the hammer and the anvil: sounding the depth of therapeutic immunosuppression. *Kidney Int*. 2015;88:1226–1228.
5. Danger R, Sawitzki B, Brouard S. Immune monitoring in renal transplantation: the state of biomarker identification. *Eur J Immunol*., in press.
6. Erickson KF, Winkelmayer WC, Busque S, et al. A cost analysis of tolerance induction for two-haplotype match kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2016;16:371–373.
7. Kawai T, Sachs DH, Sprangers B, et al. Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*. 2014;14:1599–1611.
8. Ciancio G, Sageshima J, Akpinar E, et al. A randomized pilot study of donor stem cell infusion in living-related kidney transplant recipients receiving alemtuzumab. *Transplantation*. 2013;96:800–806.
9. Leventhal JR, Mathew JM, Salomon DR, et al. Nonchimeric HLA-identical renal transplant tolerance: regulatory immunophenotypic/genomic biomarkers. *Am J Transplant*. 2016;16:221–234.
10. Leventhal JR, Mathew JM, Salomon DR, et al. Genomic biomarkers correlate with HLA-identical renal transplant tolerance. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24:1376–1385.
11. Scandling JD, Busque S, Dejbakhsh-Jones S, et al. Tolerance and withdrawal of immunosuppressive drugs in patients given kidney and hematopoietic cell transplants. *Am J Transplant*. 2012;12:1133–1145.
12. Scandling JD, Busque S, Shizuru JA, et al. Chimerism, graft survival, and withdrawal of immunosuppressive drugs in HLA matched and mismatched patients after living donor kidney and hematopoietic cell transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15:695–704.
13. Massart A, Pallier A, Pascual J, et al. The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31:1002–1013.
14. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6:736–746.
15. Brouard S, Pallier A, Renaudin K, et al. The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant*. 2012;12:3296–3307.
16. Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, et al. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant*. 2006;6:2796–2801.
17. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120:1836–1847.
18. Hricik DE, Formica RN, Nickerson P, et al. Adverse outcomes of tacrolimus withdrawal in immune-quiescent kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:3114–3122.
19. Abramowicz D, Del Carmen Rial M, Vitko S, et al. Cyclosporine withdrawal from a mycophenolate mofetil-containing immunosuppressive regimen: results of a five-year, prospective, randomized study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:2234–2240.
20. Dugast E, Soulillou JP, Foucher Y, et al. Failure of calcineurin inhibitor (tacrolimus) weaning randomized trial in long-term stable kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2016;16:3255–3261.

21. Baron D, Ramstein G, Chesneau M, et al. A common gene signature across multiple studies relate biomarkers and functional regulation in tolerance to renal allograft. *Kidney Int*. 2015;87:984–995.
22. Braudeau C, Racape M, Giral M, et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant Int*. 2007;20:845–855.
23. Braza F, Dugast E, Panov I, et al. Central role of CD45RA- Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1795–1805.
24. Brouard S, Mansfield E, Braud C, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:15448–15453.
25. Chesneau M, Michel L, Dugast E, et al. Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2588–2598.
26. Danger R, Pallier A, Giral M, et al. Upregulation of miR-142-3p in peripheral blood mononuclear cells of operationally tolerant patients with a renal transplant. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:597–606.
27. Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*. 2010;78:503–513.
28. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120:1848–1861.
29. Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, et al. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med*. 2012;18:733–743.
30. **Rebollo-Mesa I, Nova-Lamperti E, Mobillo P, et al. Biomarkers of tolerance in kidney transplantation: are we predicting tolerance or response to immunosuppressive treatment? [e-pub ahead of print]. Am J Transplant. http://dx.doi.org/10.1111/ajt.13932. Accessed. January 31, 2017.**
31. Newell KA, Asare A, Sanz I, et al. Longitudinal studies of a B cell-derived signature of tolerance in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2015;15:2908–2920.
32. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, et al. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant*. 2006;6:150–160.
33. Mastoridis S, Martinez-Llordella M, Sanchez-Fueyo A. Biomarkers and immunopathology of tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21:81–87.
34. Bach F. Bolasso: model consistent lasso estimation through the bootstrap. *Proceedings of the 25th International Conference on Machine Learning*. 2008:33–40.
35. Rohart F. Multiple hypotheses testing for variable selection. *Aust NZ J Stat*. 2016;58:245–267.
36. Nathans LL, Oswald FL, Nimon K. Interpreting multiple linear regression: a guidebook of variable importance. *Pract Assess Res Eval*. 2012;17:1–19.
37. Tibshirani R. Regression shrinkage and selection via the lasso. *J R Stat Soc B*. 1994;58:267–288.
38. Roedder S, Li L, Alonso MN, et al. A three-gene assay for monitoring immune quiescence in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2042–2053.
39. Braud C, Baeten D, Giral M, et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem*. 2008;103:1681–1692.
40. Lozano JJ, Pallier A, Martinez-Llordella M, et al. Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. *Am J Transplant*. 2011;11:1916–1926.
41. Dell'Oglio MP, Zaza G, Rossini M, et al. The anti-fibrotic effect of mycophenolic acid-induced neutral endopeptidase. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21:2157–2168.
42. Brouard S, Puig-Pey I, Lozano JJ, et al. Comparative transcriptional and phenotypic peripheral blood analysis of kidney recipients under cyclosporin A or sirolimus monotherapy. *Am J Transplant*. 2010;10:2604–2614.
43. **Heidt S, Vergunst M, Anholts JD, et al. B cell markers of operational tolerance can discriminate acute kidney allograft rejection from stable graft function [e-pub ahead of print]. *Transplantation*. http://dx.doi.org/10.1097/TP.0000000000000465. Accessed January 31, 2017.**
44. Viklicky O, Krystufkova E, Brabcova I, et al. B-cell-related biomarkers of tolerance are up-regulated in rejection-free kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2013;95:148–154.
45. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Becker PD, et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down-regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. *Sci Rep*. 2016;6:20044.
46. Bererhi L, Pallet N, Zuber J, et al. Clinical and immunological features of very long-term survivors with a single renal transplant. *Transplant Int*. 2012;25:545–554.
47. Lakkis FG, Sayegh MH. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:2402–2410.
48. Benitez C, Londono MC, Miquel R, et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology*. 2013;58:1824–1835.
49. Tullius SG, Tran H, Guleria I, et al. The combination of donor and recipient age is critical in determining host immunoresponsiveness and renal transplant outcome. *Ann Surg*. 2010;252:662–674.
50. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, et al. Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation*. 2013;95:410–417.
51. Krepsova E, Tycova I, Sekerkova A, et al. Effect of induction therapy on the expression of molecular markers associated with rejection and tolerance. *BMC Nephrol*. 2015;16:146.
52. Muller-Steinhardt M, Wortmeier K, Fricke L, et al. The pharmacodynamic effect of sirolimus: individual variation of cytokine mRNA expression profiles in human whole blood samples. *Immunobiology*. 2009;214:17–26.
53. Tebbe B, Wilde B, Ye Z, et al. Renal transplant recipients treated with calcineurin-inhibitors lack circulating immature transitional CD19+CD24hiCD38hi regulatory B-lymphocytes. *PloS One*. 2016;11:e0153170.
54. Thaunat O, Graff-Dubois S, Fabien N, et al. A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int*. 2012;81:207–219.
55. Soulillou JP, Giral M, Brouard S. Operational tolerance in kidney transplantation-improved terminology may enable more precise investigation. *Transplantation*. 2013;96:e36–e38.
56. Cherukuri A, Salama AD, Carter C, et al. An analysis of lymphocyte phenotype after steroid avoidance with either alemtuzumab or basiliximab induction in renal transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12:919–931.
57. Heidt S, Hester J, Shankar S, et al. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant*. 2012;12:1784–1792.
58. Adams AB, Newell KA. Transplantation tolerance: coming of age. *Hepatology*. 2016;64:347–349.
59. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, et al. affy–analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. 2004;20:307–315.
60. Mickey RM, Greenland S. The impact of confounder selection criteria on effect estimation. *Am J Epidemiol*. 1989;129:125–137.
61. Biais M, Ehrmann S, Mari A, et al. Clinical relevance of pulse pressure variations for predicting fluid responsiveness in mechanically ventilated intensive care unit patients: the grey zone approach. *Crit Care*. 2014;18:587.

II. LE REJET CHRONIQUE D'ALLOGREFFE PULMONAIRE

A. Article n°4

Les lymphocytes B CD9+ circulants : un biomarqueur de la survie à long-terme exempte de BOS après transplantation pulmonaire

Circulating CD9+ B cells: biomarker of long-term BOS-free survival after lung transplantation

C. Brosseau, M. Durand*, E. Durand, R. Danger, J. Loy, A. Fourreau , M. Chesneau, P. Lacoste, P.J. Royer, A. Tissot, A. Roux, M. Reynaud-Gaubert, R. Kessler, S. Mussot, C. Dromer, O. Brugière, J.F. Mornex, R. Guillemain, J. Claustre, A. Magnan, S. Brouard, COLT and SysCLAD consortia*

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

(Article soumis)

La dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire, présentant une prévalence de 50% à 5 ans après transplantation, et plus particulièrement le Syndrome de Bronchiolite Oblitérante, est la limitation majeure pour la survie à long-terme après transplantation pulmonaire. De nouvelles données suggèrent l'association entre une population de lymphocytes B et l'acceptation de greffons à long-terme. Dans cette étude, nous avons analysé le profile lymphocytaire B circulant avant et après transplantation jusqu'au développement du BOS. Cette étude a été réalisée sur 21 patients ayant développé une bronchiolite oblitérante et 20 patients présentant un greffon stable dans les 3 ans post-transplantation. Aucune différence entre les deux groupes de patients étudiés n'a été mise en évidence pour les populations de lymphocytes B naïves, mémoires et pour les plasmocytes. Cependant, une proportion plus élevée de cellules lymphocytaires B CD9+ sécrétant de l'IL-10 à 24 mois post-transplantation est associée à une survenue de BOS plus faible à 3 ans. Les patients présentant une fréquence de cellules CD9+ inférieure à 5,4% des lymphocytes B à 24 mois post-transplantation présente une incidence du BOS plus élevée que les patients dont la proportion de lymphocytes B CD9+ circulants est supérieur à 5,4%. L'identification de ces cellules lymphocytaires B exprimant le CD9 comme nouveau biomarqueur prédictif de la survenue du BOS pourrait permettre la mise en place de nouvelle stratégie de prédiction et de traitement du BOS après transplantation pulmonaire.

Circulating CD9^{+} B cells: biomarker of long-term BOS-free survival after lung transplantation

Carole Brosseau[1-4†], Maxim Durand[1,2,5,†], Eugénie Durand[1,2], Richard Danger[1,2], Jennifer Loy[3,4], Aurore Foureau[3,4], Mélanie Chesneau[1,2], Philippe Lacoste[3,4], Pierre-Joseph Royer[3,4], Adrien Tissot[1-5], Antoine Roux[6], Martine Reynaud-Gaubert[7], Romain Kessler[8], Sacha Mussot[9], Claire Dromer[10], Olivier Brugière[11], Jean François Mornex[12], Romain Guillemain[13], Johanna Claustre[14], Antoine Magnan[3,4,$], Sophie Brouard[1,2,5,$] and COLT and SysCLAD Consortia*

[1] Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France.
[2] Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France.
[3] Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France
[4] Institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291, Université de Nantes, Nantes, France
[5] Institut du thorax, CHU de Nantes, Nantes, France
[6] Hôpital Foch, Suresnes, Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, France
[7] CHU de Marseille, Aix Marseille Université, Marseille, France
[8] CHU de Strasbourg, Strasbourg, France
[9] Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardiopulmonaire, Le Plessis Robinson, France
[10] CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
[11] Hôpital Bichat, Service de Pneumologie et Transplantation Pulmonaire, Paris, France
[12] Université de Lyon, INRA, UMR754, Lyon, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France
[13] Hôpital Européen George Pompidou, Paris, France
[14] Clinique Universitaire de Pneumologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes, Inserm U1055, Grenoble, France
[15] Centre d'Investigation Clinique (CIC) Biothérapie, CHU Nantes, Nantes, France

* A complete list of members of the COLT and SysCLAD Consortia can be found in the acknowledgements.
† First authors contributed equally to this work.
$ Last authors contributed equally to this work.

Corresponding author / Reprint request
Sophie BROUARD, DVM, PhD. Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, 30, Boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes CEDEX 1, France.
Phone: +33 2 40 08 78 42, e-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

"Take home" message

CD24^{hi}CD38^{hi} **transitional** B cells and CD9 are predictive biomarkers of chronic lung allograft dysfunction.

Plain Language Summary

Trying to highlight new predictive biomarker of lung allograft dysfunction is one of the main challenge of research studies in transplantation. We aim to decipher if lung dysfunction was associated with B lymphocyte modification and to characterize a potential B lymphocyte signature predictive of lung graft dysfunction. We found that both the level of transitional and $CD9^+$ regulatory B cells were highly associated with free survival at 24 months after lung transplantation before the appearance of symptoms. The identification of CD9-expressing B cells as a new predictive biomarker of long term survival provides new strategies for prediction and treatment of the pathology.

ABSTRACT

Chronic lung allograft dysfunction, with a prevalence of 50% at 5 years, and more particularly bronchiolitis obliterans syndrome is the main limitation for long-term survival after lung transplantation. New data suggest that specific B cells are associated with long- term graft acceptance and may serve as biomarkers. We aimed to monitor B lymphocyte profile during the development of bronchiolitis obliterans syndrome. Before and at regular time points after lung transplantation, the B cells profile was analyzed in peripheral blood mononuclear cells from 21 patients with bronchiolitis obliterans syndrome and 20 patients who remained stable regarding pathology development. No differences were observed between the groups for $CD19^+$ B cells, naive, memory and plasma B cells. However, both the level of transitional and $CD9^+$ B cells secreting IL-10 were highly associated with bronchiolitis obliterans syndrome–free survival at 24 months after lung transplantation before the appearance of symptoms. Patients with $CD9^+$ or transitional B cell frequency below 5.4% and 2.24%, respectively (sensitivity = 100%), displayed significantly higher incidence of bronchiolitis obliterans syndrome. The identification of CD9-expressing B cells as a new predictive biomarker of bronchiolitis obliterans syndrome–free survival provides new strategies for prediction and treatment of the pathology.

Keywords: Regulatory B cells, transitional B cells, inflammation, graft dysfunction.

INTRODUCTION

Lung transplantation (LT) is the treatment option for selected patients suffering from end- stage pulmonary diseases. Chronic lung allograft dysfunction (CLAD) is responsible for the poor long-term outcome of LT, with an occurrence of 50% within 5 years [1]. The most prevalent morphological feature in CLAD is bronchiolitis obliterans syndrome (BOS), defined as an obstructive pulmonary function defect in the absence of other identifiable causes, mostly not amenable to treatment [2]. Currently, the clinical surrogates used to define BOS are not able to detect early stages of the pathology. The recognition of damage prior to its development is necessary in designing therapies for BOS prevention. In this context, studies have been performed to identify early indicators [3-10], but none of these markers have demonstrated sufficient robustness to achieve clinical acceptance. Growing evidence suggests that B cells with regulatory properties (Breg) and particularly $CD19^{+}CD38^{hi}CD24^{hi}$ transitional B cells are associated with maintenance of long-term allograft function in transplantation [11-14]. In the particular context of tolerance, kidney transplant patients present a characteristic B cell gene signature [15-19] and specific B cell subsets could serve as biomarker of long-term kidney allograft acceptance [18-20]. Bregs are thought to mediate their regulatory capacity predominantly via the secretion of IL-10. B cell subsets such as $CD19^{+}CD38^{hi}CD24^{hi}$ transitional B cells [21-23], $CD1d^{hi}CD5^{+}$ [24] and $CD9^{+}$ B cells [25,26], have been shown to be enriched in IL-10-competent cells. In this study, we observed a higher level of $CD19^{+}CD38^{hi}CD24^{hi}$ transitional B cells secreting IL-10 in patients with stable graft function and found that $CD9^{+}$ may serve as a potential blood biomarker of BOS.

METHODS

Patients and study design

The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study. Patients who participated in this study gave informed consent. Blood samples were selected from patients included in the multicenter longitudinal cohort COLT (Cohort in Lung Transplantation, NCT00980967). Pulmonary function tests, clinical data, and blood samples were collected at the inclusion visit before transplantation, the day of transplantation, 1 month and every 6 months post-LT. Stable (STA) and BOS phenotypes were confirmed by a committee of clinicians and researchers based on the values of the pulmonary function test, computerized tomography, and after elimination of confounding factors in line with the charter ISHLT/ERS/ATS [2]. Patients are lung-only transplanted patients who did not develop lymphoma disease and were not subject to cytomegalovirus reactivation after LT. Twenty STA and 21 BOS patients were selected based

on sample availability (at least seven time points per patient up to 30 months), and 20 healthy volunteers (HV) were used as controls. Demographic features and clinical data are summarized in Table 1.

Cell isolation and flow cytometry analysis

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation, frozen, and stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Nantes. PBMC were rapidly thawed by placing cryovials at 37°C, washed, and stained according to standard protocols using the following mAbs: CD19-BUV395, CD27-BUV737, CD38-BV605, CD138-APC, CD24-PerCP-Cy5.5, CD9-BV510, CD22-PeCy7, IgD-PE, and IgM-FITC (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Markers were used to distinguish $CD19^+$ B lymphocytes, $CD19^+CD27^+$ memory cells, $CD19^+CD27^-$ naive cells, $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional cells, and $CD19^+CD24^-CD38^+$ plasma cells. Dead cells were excluded using the Zombie NIR Fixable Viability kit (BioLegend, London, UK). Samples were run on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

Analysis of IL-10 production by stimulated B cells

Cells were stimulated for 5 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml), ionomycin (0.5 mg/ml), and brefeldin-A (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For detection of intracellular IL-10, cells were fixed and permeabilized using the Permabilization/Fixation Kit (BD Biosciences) and staining was performed using anti-IL-10- PE (BD Biosciences). Unstimulated B cells (without /ionomycin stimulation) were stained and used as a control for the analysis.

Statistical analysis

Longitudinal analysis between the two groups BOS and STA was performed using two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test, Pearson correlation, ROC curves survival analysis with Kaplan-Meier (log-rank test), Student's *t*-test, or chi-square for qualitative variables in GraphPad Prism v5, (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) after checking Gaussian distribution with the D'Agostino-Pearson test. A p-value <0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Baseline characteristics of patient population

CLAD is a heterogeneous disorder that may develop through different clinical phenotypes [1-2,27]. We focused on BOS, the most common (Table 1) that is defined as patients with a decrease in lung function indicator FEV1 of at least 20% compared to maximum values assessed after LT and an airway-fibrosis exclusively obstructive disease [2]. None of the usual risk factors of CLAD significantly differed between STA and BOS patients. Most of the patients received bilateral LT (67% and 63% of STA and BOS, respectively; $p > 0.05$). Recipient immunosuppressive treatments, ischemic time, number of acute cellular rejection events, infections, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, HLA mismatches, and DSA at transplantation were not significantly different between BOS and STA. Age and sex between transplanted patients and HV were also not different. Concerning the initial disease leading to LT, cystic fibrosis was more prevalent in STA (50% vs. 14%, respectively; $p < 0.05$), which is representative of the COLT cohort. All the baseline characteristics are provided in Table 1.

$CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cell rate at 24 months post-LT

Because B cell homeostasis is reshaped in the context of skin, hematopoietic stem cells, and kidney dysfunction [11-13,28,29], we assessed whether peripheral blood B lymphocyte subset profile may evolve differently over time between BOS and STA (before LT to 30 months post-LT) and HV. Results from BOS patients at the time of and after the diagnosis were excluded (Supplementary data 1), so that all the patients display normal graft function at all time points. We determined the percentage of naive, memory, transitional B cells and plasma cells based on the expression of CD19, CD27, CD38, CD22, and CD24 (Figure 1A). Total $CD19^{+}$ B cell frequency was not significantly different between BOS and STA at any time points (Figure 1B). No significant difference was observed for naive, memory and plasma cell subtypes. Whereas the percentage of $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells remained low over time in BOS (1.1% ± 0.1), this increased in STA and reached a maximum at 24 months, exceeding the physiological level of $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells in HV (6.3%± 0.1 vs. 3.3% ± 0.4; $p < 0.001$). This increase in $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells was not associated with age, pulmonary lung capacity of the patients, or immunosuppressive treatments (Figure 1C).

IL10 producing $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cell and $CD9^{+}$ B cell frequencies discriminate BOS and STA at 24 months

We analyzed the frequency of $CD24^{hi}CD38^{hi}$ B cell subsets according to their differentiation states [23] and expression of the CD9 marker in STA, BOS, and HV. CD9, CD27, IgM, and

IgD surface markers were used to distinguish $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cell subsets: $CD27^{-}IgD^{+/low}IgM^{+}$ T1/2, $CD27^{-}IgD^{+}IgM^{-}$ T3, $CD27^{+}$ non-conventional memory transitional B cells, and $CD9^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells (Figure 2A). The frequency of transitional B cell subset was not different within groups at any time point (Figure 2B). However all transitional B cell subsets among total $CD19^{+}$ B cells peaked at 24 months post- LT in STA patients, whereas they remained low in BOS: T1/T2 (2.5% ± 0.5% vs. 0.5% ± 0.1% in STA and BOS; $p < 0.001$), T3 (2.6% ± 0.6% vs. 0.8% ± 0.5%; $p < 0.005$), $CD27^{+}$non-conventional B cells (0.5% ± 0.07% vs. 0.15% ± 0.06%; $p < 0.001$), and $CD9^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells (2.8% ± 0.5% vs. 0.6% ± 0.3%; $p < 0.001$). Interestingly, $CD9^{+}$ B cell frequency alone was significantly higher at 24 months post-LT in STA as compared to BOS (12.2% ± 1.1% vs. 5.2% ± 1%; $p < 0.005$) (Figure 2C). We analyzed IL-10 production by transitional and $CD9^{+}$ B cells *in vitro* after activation with PMA and ionomycin in LT recipients. Both transitional and $CD9^{+}$ B cells are able to secrete substantial IL-10 (61.2% ± 6.9% and 70.7% ± 3.7% respectively) (Figure 3A, 3B). Together, these data show that IL-10 secreting $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cell and $CD9^{+}$ B cell frequencies both differentiate STA and BOS at 24 months post-LT.

$CD9^{+}$ B cell frequency at 24 months is a powerful predictive marker of long-term BOS-free survival

We investigated whether the level of $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional cells or $CD9^{+}$ B cells are sufficient to discriminate between patients who will maintain stable graft function and those who will develop BOS in the 5 years after LT. Accordingly, ROC curve analysis highlighted excellent discriminative ability for both transitional B cell and $CD9^{+}$ B cell frequencies when comparing STA and BOS patients at 24 months post-LT (AUC = 0.98, SE = 0.02 and AUC = 1, SE = 0, respectively) (Figure 4A). We determined the best cut-off of ROC curves, 2.24% for transitional B cells (sensitivity = 100%, specificity = 93%) and 5.4% for $CD9^{+}$ B cells (sensitivity and specificity of 100%). Patients with $CD9^{+}$ or transitional B cell frequency below these cut-off points displayed significantly higher incidence of BOS (log-rank $p = 0.001$) (Figure 4B). Together these data show that an increase of circulating transitional B cells and/or $CD9^{+}$ B cells 24 months post-LT predict long-term BOS-free survival.

$CD9^+$ B cell 1- to 24- months fold change predicts BOS-free survival

To propose a biomarker for LT patients compatible with routine clinical use and particularly avoiding the need for external calibration, we focused on the $CD9^+$ 1- to 24-months fold change level, with the patient's own basal level being the internal calibrator. We performed ROC curve analysis to determine the cut-off allowing the best discrimination between the STA and BOS groups (Figure 5A). A fold change of $CD9^+$ B cells proportion equal to 1, allows a discrimination with 100% sensitivity and 69.2% specificity (AUC = 0.81, SE = 0.1, cut-off = 1). Based on these data, the Kaplan-Meier analysis indicated that patients with a 1- to 24-months fold change of $CD9^+$ B cells above 1 displayed a significantly greater likelihood of BOS-free survival (log-rank $p < 0.05$) (Figure 5B). Also, the high AUC highlights the robustness of this marker. Together these data show that any increase of $CD9^+$ B cells level between 1 and 24 months post-LT is predictive of long-term BOS-free survival.

DISCUSSION

Both innate and adaptive immune responses induced by the allograft itself or by the environment may lead to allograft dysfunction [1]. Most of the investigations of the role of allograft recipient immunity have omitted the potential role of B cells, except for their ability to produce donor-specific antibodies (DSA). Antibody-mediated rejection is an important cause of graft failure after LT and it is associated with high incidence of CLAD development [30]. Antibody-mediated rejection has been best characterized with DSA against the donor of the lung (de novo DSA), but may occur as a result of other DSA present before transplantation. De novo DSA 1 month post-transplantation, but not pre-transplant DSA, was associated with CLAD [31,32]. In our study, 25% STA and 37% BOS patients displayed DSA at the time of LT and 25% STA and 47% BOS patients presented de novo DSA during the analysis. Nevertheless, B cell subsets remained low in the BOS cohort, whatever their HLA-DSA status, whereas specific B cell subset increased in STA patients only, suggesting a different role of B cells. It is now well recognized that the role of B lymphocytes is overriding and more complex [33-35]. They are thus capable of promoting, enhancing, and/or regulating inflammation. Understanding their dynamic changes in individual patients may clearly be of interest. This study reports for the first time the longitudinal homeostasis modifications of circulating B cell subsets in lung transplant recipients presenting stable graft functions or developing BOS. At 24 months post-LT, stable lung transplant recipients harbor an increase of $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells—that even exceed the physiological level of HV—whereas this subset remains low in patients who will develop BOS. We and others, reported on a significant increase in B cells, particularly activated and memory subsets in blood from patients who

tolerate a kidney graft in the absence of treatment in contrast with patients who reject their graft [16,18,36]. These studies suggest that a shift toward a transitional B cell phenotype might be a prerequisite for the development of positive long-term outcome [11,15,16]. Shabir et al. corroborated these findings and showed that transitional B cell frequency is associated with a lower number of acute rejection episodes [14]. Conversely, Svachova et al. reported that a decrease of circulating transitional B cells correlates with the incidence of graft rejection events [19]. Such variation in $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional B cells were confirmed in different situations [11-12].

Simon et al. provided new evidence for the existence of different transitional B cells subsets with distinct phenotypes and regulatory properties [23]: $CD24^{hi}CD38^{high}CD27^{-}$ $IgD^{hi}IgM^{+}$ T1 cells, with an immature differentiation pattern; $CD24^{hi}CD38^{hi}CD27^{-}IgD^{+}IgM^{-}$ T2 cells, showing growing maturity markers expression; T3 cells phenotypically similar to $CD24^{hi}CD38^{hig}CD27^{-}IgD^{-}IgM^{+}$ mature B cells; and $CD24^{hi}CD38^{hi}CD27^{+}$ memory-like transitional B cells. We found that all transitional B cell subsets were increased in STA compared to BOS at 24 months post-LT, suggesting a regulation of inflammation that may be associated with the absence of graft dysfunction in these patients.

Transitional B cells are linked to long-term graft survival and tolerance achievement, likely because partially overlapping regulatory B compartment that modulate immune response by secreting different cytokines [13,22]. We found that transitional B cells increased at 24 months post-LT are IL-10 secreting cells and this increase exceeds the level of HV. Whereas the effect of treatment on B cell compartments is poorly understood, this extra-physiological rise of transitional B cells has already been reported in kidney transplantation after alemtuzumab induction therapy [37]. Alemtuzumab first depletes B cells, followed by rapid repopulation of transitional and naive B cells up to levels exceeding the baseline, creating an environment in which tolerance may be achieved [37]. Lung transplanted patients in this study did not received alemtuzumab or other induction treatments known to have such an effect, but the link with tolerance induction strengthens the association between the high rate of transitional B cells and long-term graft stability. We previously identified CD9 as a marker of $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional cells in human with regulatory properties in mice [25]. CD9 expression has been associated in mouse with enhancement and maintenance of IL-10 secretion and in human with plasma cell lineage with potent immunosuppressive properties [25,26]. We report here for the first time that the presence of $CD9^{+}$ B cells 24 months after LT is associated with long-term BOS-free survival before the appearance of clinical symptoms. These data suggest that $CD9^{+}$ B cells may serve as predictive biomarkers of BOS.

Several studies aimed to identify early indicators of CLAD to improve long-term lung allograft survival. Overexpression of five TGFB-dependent fibrosis-associated genes allow prediction of CLAD within 3 years after transplantation [3]. Despite interest in this biomarker, this signature requires biopsy, which is an obstacle for routine clinical use. Based on detection in blood, elevated levels of IL-8, RANTES, and MCP-1 [4,5], as well as IL-6 at 24 h post-LT [6] have been reported to predict BOS. Other studies focused on high level of Endothelin-1 [7] and higher sCD59 titers in patients who will develop a BOS [8]. Finally, human leukocyte antigen G (HLA-G) expression within the first year post-LT is associated with graft acceptance in the long term [9] and a rise in plasma MMP-9 is predictive of CLAD occurrence 12 months before the diagnosis [10]. None of these studies, however, have demonstrated sufficient robustness to achieve clinical acceptance. Indeed, these studies suffer several limitations and confounding variables that render the conclusions difficult regarding BOS and other inflammatory adverse events.

Because IL10 secreting $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional and $CD9^{+}$ B cells are increased in STA and not in BOS at 24 months, we wondered if these two factors may be used as markers of graft outcome and to risk-stratify patients. Frequencies of $CD9^{+}$ B cells > 5.4% and transitional B cells > 2.24% allow distinguishing between patients who will develop BOS and those who keep a stable graft function. To be applicable in routine clinical use, we analyzed the fold change between 1 and 24 months post-LT for $CD9^{+}$ that would allow excluding individual variability. Using this marker, we were able to identify patients at risk of BOS before clinical manifestations, with high sensitivity and specificity and independent of the time post-LT.

In summary, these data are the first to associate IL-10-secreting $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional and $CD9^{+}$ B cells with better allograft outcome in LT patients. B cell subsets and possibly their production of IL-10 may contribute to create a favorable environment that might be essential for the maintenance of long-term stable graft function. It remains unclear whether the impairment of transitional B cells in a patient who will develop BOS in the long term is an individual predisposition to the effect of the treatment. B cell homeostasis is indeed dependent on immunosuppressive treatments. Regarding specific B cell subsets, both anti- calcineurin, mTOR inhibitor and tacrolimus treatments have been shown to reduce $CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional Bregs [38,39]. Conversely, Belatacept favors the occurrence of transitional B cells with regulatory properties [40]. We did not find any effect of treatment on the frequency of transitional and $CD9^{+}$ B cells regarding the two groups of patients. Finally, the identification of CD9-expressing B cells as a new predictive biomarker of long-term BOS-free survival may allow reducing or adjusting treatments according to its circulating level. These data, highlighting the importance of regulatory transitional B cells as well as a new and easy

applicable $CD9^+$ marker in transplantation and that must now be validated in a greater number and independent cohorts of LT recipients in a prospective follow-up, could help early prediction of BOS and the development of personalized medicine, a major breakthrough, based on risk stratification and modulation of personalized pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participating patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We also thank J. Desfrancois-Noel, N. Marec, and L. Haro from the Cytocell Cytometry Facility in Nantes (SFR Bonamy), CIC Biothérapie for technical assistance and CHU Nantes, Hôtel Dieu, CRB, Nantes, F- 44093, France (BRIF : BB-0033-00040). Finally, we thank Vaincre La Mucoviscidose, l'Association Grégory Lemarchal, the French Research Ministry, University Hospital Institute (IHU)-European Center for Transplantation and Immunotherapy Services (CESTI), the French Government, the EU, Nantes Metropole, and the Pays de la Loire Region for their financial support.

Statement of competing financial interests

The authors have no significant competing financial, professional, or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this manuscript. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

COLT consortium

Cohort of Lung Transplantation-COLT (associating surgeons, anaesthetists-intensivists, physicians, research staff) **Bordeaux:** J. Jougon, J.-F. Velly, H. Rozé, E. Blanchard, C. Dromer; **Bruxelles:** M. Antoine, M. Cappello, M. Ruiz, Y. Sokolow, F. Vanden Eynden, G. Van Nooten, L. Barvais, J. Berré, S. Brimioulle, D. De Backer, J. Créteur, E. Engelman, I. Huybrechts, B. Ickx, T.J.C. Preiser, T. Tuna, L. Van Obberghe, N. Vancutsem, J.-L. Vincent, P. De Vuyst, I. Etienne, F. Féry, F. Jacobs, C. Knoop, J.L. Vachiéry, P. Van den Borne, I. Wellemans, G. Amand, L. Collignon, M. Giroux; **Grenoble:** D. Angelescu, O. Chavanon, R. Hacini, C. Martin, A. Pirvu, P. Porcu, P. Albaladejo, C. Allègre, A. Bataillard, D. Bedague, E. Briot, M. Casez-Brasseur, D. Colas, G. Dessertaine, M. Durand, G. Francony, A. Hebrard, M.R. Marino, D. Protar, D. Rehm, S. Robin, M. Rossi-Blancher, C. Augier, P. Bedouch, A. Boignard, H. Bouvaist, A. Briault, B. Camara, J. Claustre, S. Chanoine, M. Dubuc, S. Quétant, J. Maurizi, P. Pavèse, C. Pison, C. Saint-Raymond, N. Wion, C. Chérion; **Lyon:** R. Grima, O. Jegaden, J.-M. Maury, F. Tronc, C. Flamens, S. Paulus, J.-F. Mornex, F. Philit, A. Senechal,

J.-C. Glérant, S. Turquier, D. Gamondes, L. Chalabresse, F. Thivolet-Bejui, C Barnel, C. Dubois, A. Tiberghien; **Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou:** F. Le Pimpec-Barthes, A. Bel, P. Mordant, P. Achouh, V. Boussaud, R. Guillemain, D. Méléard, M.O. Bricourt, B. Cholley, V. Pezella; **Marseille:** G. Brioude, X.B. D'Journo, C. Doddoli, P. Thomas, D. Trousse, S. Dizier, M. Leone, L. Papazian, F. Bregeon, B. Coltey, N. Dufeu, H. Dutau, S. Garcia, J.Y. Gaubert, C. Gomez, S. Laroumagne, G. Mouton, A. Nieves, Ch. Picard, M. Reynaud-Gaubert, J.M. Rolain, E. Sampol, V. Secq; **Nantes:** P. Lacoste, C. Perigaud, J.C. Roussel, T. Senage, A Mugniot, I. Danner, A Haloun, A. Magnan, A Tissot, S Abbes, C Bry, F.X. Blanc, T. Lepoivre, K. Botturi-Cavaillès, S. Brouard, R. Danger, J. Loy, M. Bernard, E. Godard, P.-J. Royer, E. Durand, K. Henrio, M. Durand, C. Brosseau, A.Foureau; **Le Plessis Robinson, Hôpital Marie Lannelongue:** Ph. Dartevelle, D. Fabre, E. Fadel, O. Mercier, S. Mussot, F. Stephan, P. Viard, J. Cerrina, P. Dorfmuller, S. Feuillet M. Ghigna, Ph. Hervén F. Le Roy Ladurie, J. Le Pavec, V. Thomas de Montpreville, L. Lamrani; **Paris, Hôpital Bichat:** Y. Castier, P. Mordant, P. Cerceau, P. Augustin, S. Jean-Baptiste, S. Boudinet, P. Montravers, O. Brugière, G. Dauriat, G. Jébrak, H. Mal, A. Marceau, A.-C. Métivier, G. Thabut, E. Lhuillier, C. Dupin, V. Bunel; **Strasbourg:** P. Falcoz, G. Massard, N. Santelmo, G. Ajob, O. Collange O. Helms, J. Hentz, A. Roche, B. Bakouboula, T. Degot, A. Dory, S. Hirschi, S. Ohlmann-Caillard, L. Kessler, R. Kessler, A. Schuller, K. Bennedif, S. Vargas; **Suresnes**: P. Bonnette, A. Chapelier, P. Puyo, E. Sage, J. Bresson, V. Caille, C. Cerf, J Devaquet, V. Dumans-Nizard, M.L. Felten, M. Fischler, A.G. Si Larbi, M. Leguen, L. Ley,, N. Liu, G. Trebbia, S. De Miranda, B. Douvry, F. Gonin, D. Grenet, A.M. Hamid, H. Neveu, F. Parquin, C. Picard, A. Roux, M. Stern, F. Bouillioud, P. Cahen, M. Colombat, C. Dautricourt, M. Delahousse, B. D'Urso, J. Gravisse, A. Guth, S. Hillaire, P. Honderlick, M. Lequintrec, E. Longchampt, F. Mellot, A. Scherrer, L. Temagoult, L. Tricot, M. Vasse, C. Veyrie, L. Zemoura; **Toulouse:** M Dahan, M Murris, H Benahoua, J Berjaud, A Le Borgne Krams, L Crognier, L Brouchet, O Mathe, A Didier.**Swiss Transplant Cohort Study, STCS: Genève-Lausanne:** T. Krueger, H.B. Ris, M. Gonzalez, J.-D. Aubert, L.P. Nicod, B.J. Marsland, T.C. Berutto, T. Rochat, P. Soccal, Ph. Jolliet, A. Koutsokera, C. Marcucci, O. Manuel, E. Bernasconi, M. Chollet, F. Gronchi C Courbon; **Zurich:** S. Hillinger, I. Inci, P. Kestenholz, W. Weder, R. Schuepbach, M. Zalunardo, C. Benden, U. Buergi, L.C. Huber, B. Isenring, M.M. Schuurmans, A. Gaspert, D. Holzmann, N. Müller, C. Schmid, B. Vrugt, T. Rechsteiner. **SME and Platforms: Biomax, Germany:** A. Fritz, D. Maier; **Finovatis, Lyon:**, France K. Deplanche, D. Koubi, GATC, Germany F. Ernst, T. Paprotka, M. Schmitt, B. Wahl; **Novasdicovery, Lyon:**, France J.-P. Boissel, G. Olivera-Botello; **Prométhée Proteomics Platform, Grenoble, France**: C. Trocmé, B. Toussaint, S. Bourgoin-Voillard, M. Séve; **Inserm U823, Université Joseph Fourier, Grenoble, France:** M. Benmerad, V. Siroux, R. Slama; **European Institute for Systems Biology & Medicine, Lyon, France:** C. Auffray, D. Charron, D. Lefaudeux, J. Peller

REFERENCES

1. Royer PJ, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert JD, Bernasconi E, Tissot A, Pison C, Nicod L, Boissel JP, Magnan A, SysCLAD Consortium. Chronic lung allograft dysfunction: a systematic review of mechanisms. Transplantation 2016;100:1803- 1814.

2. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, Brozek J, Glanville AR, ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee, ISHLT/ATS/ERS BOS Task Force Committee. An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. Eur Respir J 2014;44:1479-1503.

3. Jonigk D, Izykowski N, Rische J, Braubach P, Kühnel M, Warnecke G, Lippmann T, Kreipe H, Haverich A, Welte T, Gottlieb J, Laenger F. Molecular profiling in lung biopsies of human pulmonary allografts to predict chronic lung allograft dysfunction. Am J Pathol 2015;185:3178-3188.

4. Neurohr C, Huppmann P, Samweber B, Leuschner S, Zimmermann G, Leuchte H, Baumgartner R, Hatz R, Frey L, Ueberfuhr P, Bittmann I, Behr J, Munich Lung Transplant Group. Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. J Heart Lung Transplant 2009;28:468-474.

5. Reynaud-Gaubert M, Marin V, Thirion X, Farnarier C, Thomas P, Badier M, Bongrand P, Giudicelli R, Fuentes P. Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. J Heart Lung Transplant 2002;21:721-730.

6. Hall DJ, Baz M, Daniels MJ, Staples ED, Klodell CT, Moldawer LL, Beaver TM. Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients. Interact Cardiovasc Thorac Surg 2012;15:603-607.

7. Salama M, Jaksch P, Andrukhova O, Taghavi S, Klepetko W, Aharinejad S. Endothelin-1 is a useful biomarker for early detection of bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients. J Thorac Cardiovasc Surg 2010;140:1422-1427.

8. Budding K, van de Graaf EA, Kardol-Hoefnagel T, Kwakkel-van Erp JM, Luijk BD, Oudijk EJ, van Kessel DA, Grutters JC, Hack CE, Otten HG. Soluble CD59 is a novel biomarker for the prediction of obstructive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. Sci Rep 2016;6:26274.

9. Brugière O, Thabut G, Krawice-Radanne I, Rizzo R, Dauriat G, Danel C, Suberbielle C, Mal H, Stern M, Schilte C, Pretolani M, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G as a predictive marker of low risk of chronic rejection in lung transplant recipients: a clinical prospective study. Am J Transplant 2015;15:461-471.

10. Pain M, Royer PJ, Loy J, Girardeau A, Tissot A, Lacoste P, Roux A, Reynaud- Gaubert M, Kessler R, Mussot S, Dromer C, Brugière O, Mornex JF, Guillemain R, Dahan M, Knoop C,

Botturi K, Pison C, Danger R, Brouard S, Magnan A, COLT Consortium. T cells promote bronchial epithelial cell secretion of matrix metalloproteinase-9 via a C-C chemokine receptor type 2 pathway: implications for chronic lung allograft dysfunction. Am J Transplant 2017;17:1502-1514.

11. Moreau A, Blair PA, Chai JG, Ratnasothy K, Stolarczyk E, Alhabbab R, Rackham CL, Jones PM, Smyth L, Elgueta R, Howard JK, Lechler RI, Lombardi G. Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. Eur J Immunol 2015;45:843-853.

12. Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, Mielke, de Lavallade H, Muftuoglu M, Fernandez Curbelo I, Liu E, Muraro PA, Alousi A, Stringaris K, Parmar S, Shah N, Shaim H, Yvon E, Molldrem J, Rouce R, Champlin R, McNiece I, Mauri C, Shpall EJ, Rezvani K. Regulatory B cells are enriched within the IgM

13. memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood 2014;124:2034-2045.

14. Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, Durand J, Braza F, Guerif P, Laplaud DA, Soulillou JP, Giral M, Degauque N, Chiffoleau E, Brouard S. Tolerant kidney transplant patients produce B cells with regulatory properties. Am Soc Nephrol 2015;26:2588-2598.

15. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, Chand S, Jham S, Navarrete C, Harper L, Ball S, Borrows R. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. Am J Transplant 2015;15:1384-1391.

16. Bigot J, Pilon C, Matignon M, Grondin C, Leibler C, Aissat A, Pirenne F, Cohen JL, Grimbert P. Transcriptomic signature of the CD24hi CD38hi transitional B cells associated with an immunoregulatory phenotype in renal transplant recipients. Am J Transplant 2016;16(12):3430-3442.

17. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, Dugast E, Ashton-Chess J, Pettré S, Lozano JJ, Bataille R, Devys A, Cesbron-Gautier A, Braudeau C, Larrose C, Soulillou JP, Brouard S. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. Kidney Int 2010;78:503-513.

18. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, Chapman S, Craciun L, Sergeant R, Brouard S, Rovis F, Jimenez E, Ballow A, Giral M, Rebollo- Mesa I, Le Moine A, Braudeau C, Hilton R, Gerstmayer B, Bourcier K, Sharif A, Krajewska M, Lord GM, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert- Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk HD, Soulillou JP, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest

2010;120:1848-1861.

19. Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, Burlingham WJ, Marks WH, Sanz I, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, Turka LA, Seyfert- Margolis VL, Immune Tolerance Network ST507 Study Group. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest 2010;120:1836-1847.

20. Svachova V, Sekerkova A, Hruba P, Tycova I, Rodova M, Cecrdlova E, Slatinska J, Honsova E, Striz I, Viklicky O. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. Transpl Int 2016;29:540-548.

21. Burton H, Dorling A. Transitional B cell subsets-a convincing predictive biomarker for allograft loss? Kidney Int 2017;91:18-20.

22. Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. Immunol Rev 2008;224:201-214.

23. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. Immunity 2015;42:607-612.

24. Simon Q, Pers JO, Cornec D, Le Pottier L, Mageed RA, Hillion S. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. J Allergy Clin Immunol 2016;137:1577-1584.

25. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. Immunity 2008;28:639-650.

26. Braza F, Chesne J, Durand M, Dirou S, Brosseau C, Mahay G, Cheminant MA, Magnan A, Brouard S. A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. Allergy 2015;70:1421-1431.

27. Sun J, Wang J, Pefanis E, Chao J, Rothschild G, Tachibana I, Chen JK, Ivanov II, Rabadan R, Takeda Y, Basu U. Transcriptomics identify CD9 as a marker of murine IL-10-competent regulatory B cells. Cell Rep 2015;13:1110-1117.

28. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, Wagnetz D, Chaparro C, Singer LG, Hutcheon MA, Keshavjee S. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. J Heart Lung Transplant 2011;30:735-742.

29. de Masson A, Bouaziz JD, Le Buanec H, Robin M, O'Meara A, Parquet N, Rybojad M, Hau E, Monfort JB, Branchtein M, Michonneau D, Dessirier V, Sicre de Fontbrune F, Bergeron A, Itzykson R, Dhédin N, Bengoufa D, Peffault de Latour R, Xhaard A, Bagot M, Bensussan A, Socié G. CD24(hi)CD27^{+} and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. Blood 2015;12(125):1830-1839.

30. Chesneau M, Pallier A, Braza F, Lacombe G, Le Gallou S, Baron D, Giral M, Danger R, Guerif P, Aubert-Wastiaux H, Néel A, Michel L, Laplaud DA, Degauque N, Soulillou JP,

Tarte K, Brouard S. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. Am J Transplant 2014;14:144-155.

31. Kulkarni HS, Bemiss BC, Hachem RR. Antibody-mediated rejection in lung transplantation. Curr Transplant Rep 2015;2:316-323.

32. Le Pavec J, Suberbielle C, Lamrani L, Feuillet S, Savale L, Dorfmüller P, Stephan F, Mussot S, Mercier O, Fadel E. De-novo donor-specific anti-HLA antibodies 30 days after lung transplantation are associated with a worse outcome. J Heart Lung Transplant 2016;35:1067-1077.

33. Zazueta OE, Preston SE, Moniodis A, Fried S, Kim M, Townsend K, Wood I, Boukedes S, Guleria I, Camp P, El-Chemaly S, Rosas IO, Chandraker A, Milford E, Goldberg HJ. The presence of pretransplant HLA antibodies does not impact the development of chronic lung allograft dysfunction or CLAD related death. Transplantation 2016. doi: 10.1097/TP.0000000000001494

34. Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell–B-cell interactions. Rheum Dis Clin North Am 2004;30:175-191.

35. Fillatreau S. Cytokine-producing B cells as regulators of pathogenic and protective immune responses. Ann Rheum Dis 2013;72 Suppl 2:ii80-84.

36. Zanetti M, Castiglioni P, Rizzi M, Wheeler M, Gerloni M. B lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines. Immunol Rev 2004;199:264-278.

37. Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, Monteiro SM, Hernandez MO, Chaara W, Six A, Agena F, Sesterheim P, Barbé-Tuana FM, Saitovitch D, Lemos F, Kalil J, Coelho V. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. Mol Med 2012;18:733-743.

38. Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. Am J Transplant 2012;12:1784-1792.

39. Tebbe B, Wilde B, Ye Z, Wang J, Wang X, Jian F, Dolff S, Schedlowski M, Hoyer PF, Kribben A, Witzke O, Hoerning A. Renal transplant recipients treated with calcineurin-inhibitors lack circulating immature transitional CD19+CD24hiCD38hi regulatory B-lymphocytes. PLoS One 2016;11:e0153170.

40. Chung BH, Kim KW, Yu JH, Kim BM, Choi BS, Park CW, Kim YS, Cho ML, Yang CW. Decrease of immature B cell and interleukin-10 during early-post-transplant period in renal transplant recipients under tacrolimus based immunosuppression. Transpl Immunol 2014;30:159-167.

41. Leibler C, Matignon M, Pilon C, Montespan F, Bigot J, Lang P, Carosella ED, Cohen J, Rouas-Freiss N, Grimbert P, Menier C. Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naïve and transitional B cells. Am J Transplant 2014;14:1173-1182.

TABLE :

Table 1: Demographic and clinical data.
Definition of abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; DSA, donor-specific antibodies.

	Stable	BOS	HV	p-value
Number of patients	**20**	**21**	**19**	
Median occurrence of CLAD (month after LT) [range]		24 [12-42]		
Median Age at LT [range]	48 [23-71]	59 [27-68]	50 [21-66]	0.396
Sex, n(%)				0.252
Male	8 (40)	10 (48)	13 (68)	
Female	12 (60)	11 (52)	6 (32)	
Median Donor age [range]	49 [18-71]	44 [16-65]		0.64
Sex, n(%)				0.661
Male	10 (50)	12 (57)		
Female	10 (50)	9 (43)		
Pathology leading to LT, n(%)				0.03
Emphysema/ Chronic Obstructive Pulmonary Disease	7 (35)	9 (43)		
Cystic fibrosis	10 (50)	3 (14)		
Pulmonary hypertension	2 (10)	6 (29)		
Idiopathic pulmonary fibrosis	1 (5)	2 (9)		
Other	0	1 (5)		
Type of LT, n(%)				0.55
Double lung	15 (75)	14 (67)		
Single lung	5 (25)	6 (28)		
Lobar	0	1 (5)		
Median Inschemic time (min) [range]	315 [215-467]	330 [150-540]		0.648
Induction, n(%)				0.35
Basiliximab	9 (45)	5 (24)		
Thymoglobulin	8 (40)	12 (57)		

FIGURES

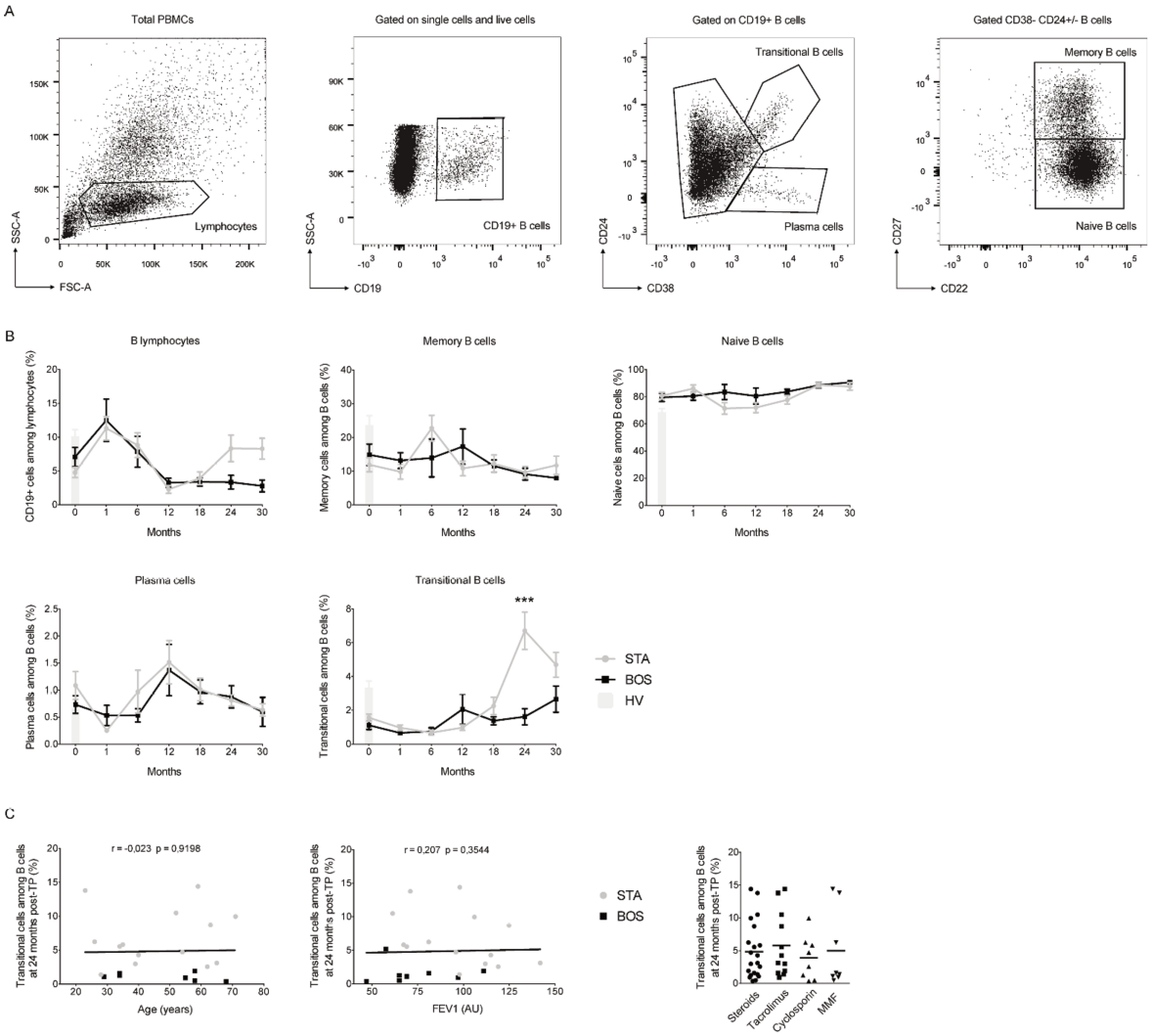


Figure 1: Longitudinal immunomonitoring of B lymphocyte subpopulations. A) Gating strategy of $CD19^{+}$ B lymphocytes, $CD19^{+}CD27+$ memory cells, $CD19^{+}CD27^{-}$ naive cells, $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional cells, and $CD19^{+}CD24^{-}CD38^{+}$ plasma cells. B) Longitudinal immunomonitoring of CD19+ B cells and transitional, memory, naive and plasma cells before LT and at 1, 6, 12, 18, 24, and 30 months post-LT in STA (*n* = 20), BOS (*n* = 21), and HV (*n* = 20) patients. C) Correlation between the percentage of transitional cells and age, forced inspiratory volume in 1s (FEV1), and immunosuppressive treatments.

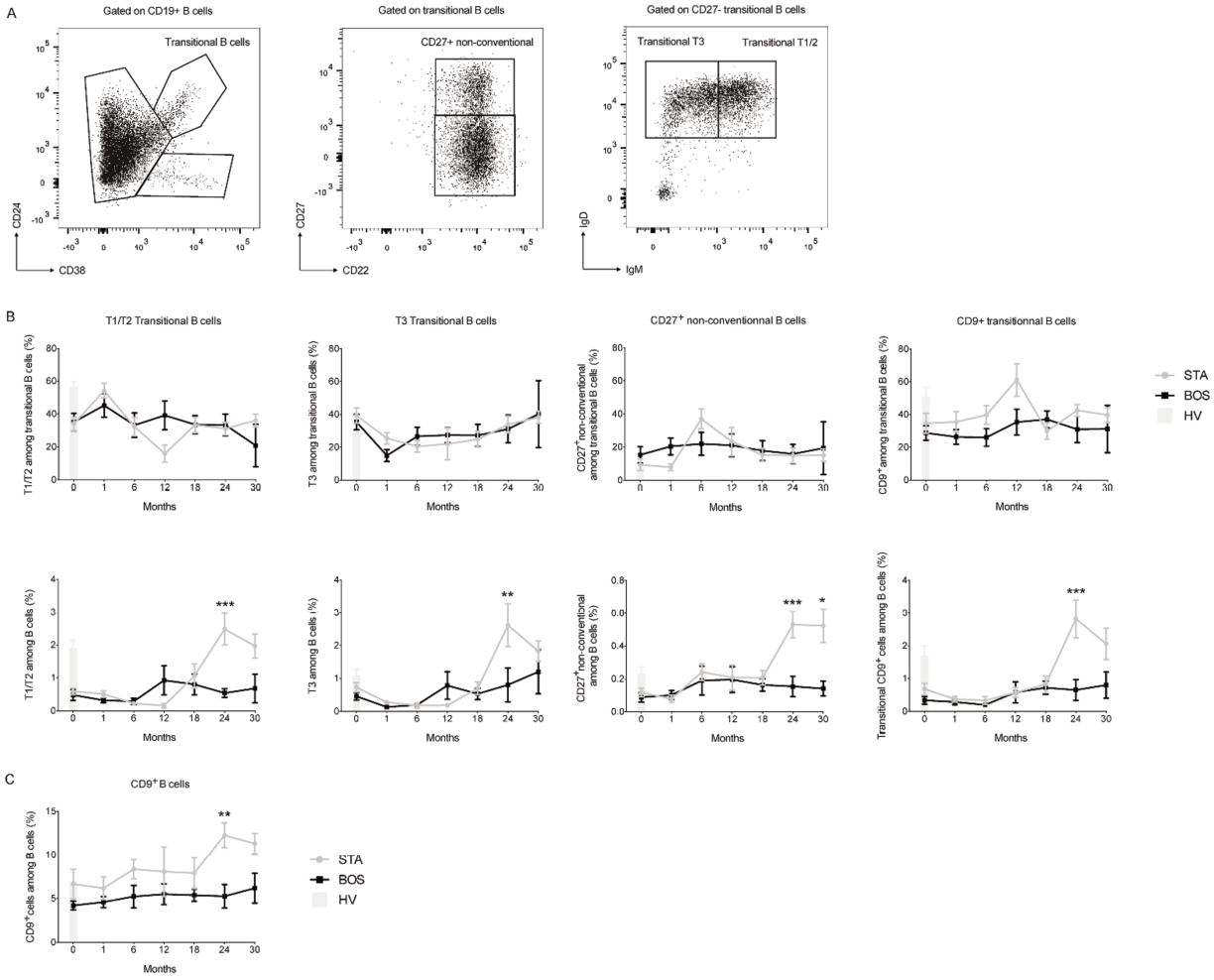


Figure 2: Longitudinal immunomonitoring of transitional B cell subtypes. A) Gating strategy of $CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi}$ transitional cells, $CD27^{-}IgD^{+/low}IgM^{+}$ T1/2, $CD27^{-}IgD^{+}IgM^{-}$ T3, and $CD27^{+}$ non-conventional memory transitional B cells. B) Longitudinal immunomonitoring of T1/T2, T3, $CD27^{+}$ non-conventional, and $CD19^{+}CD24^{hi}CD^{38}hiCD9^{+}$ B cells before LT and at 1, 6, 12, 18, 24, and 30 months post-LT in STA (*n* = 20), BOS (*n* = 21), and HV (*n* = 20) patients. C) Longitudinal immunomonitoring of $CD9^{+}$ B cells before LT and at 1, 6, 12, 18, 24, and 30 months post-LT in STA, BOS, and HV patients.

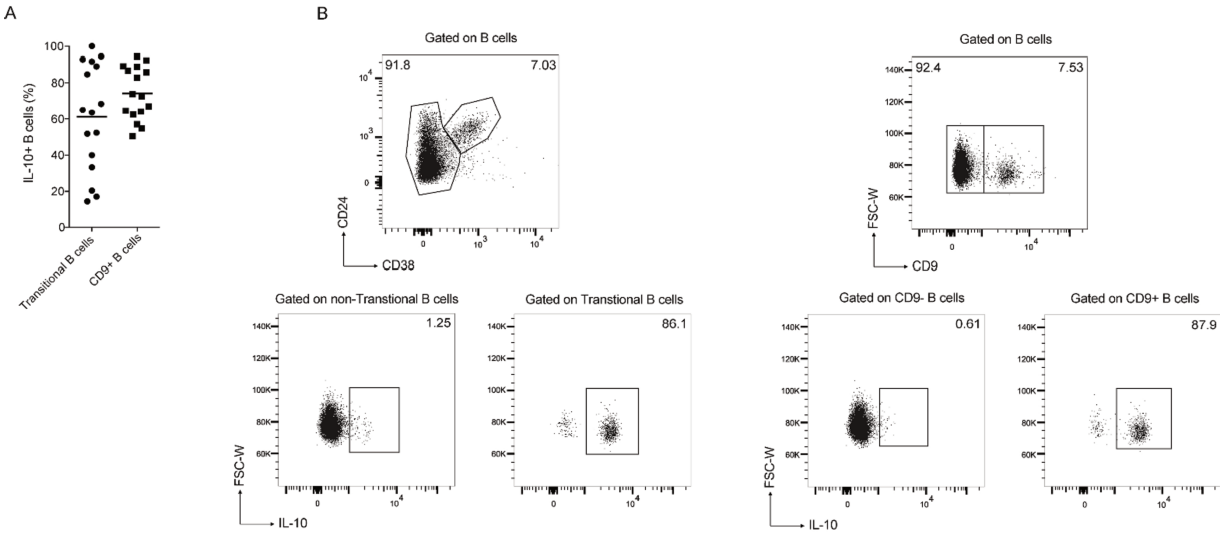


Figure 3: IL-10-secreting B cells. A) Percentage of transitional and CD9+ B cells secreting IL-10 B) Representative staining of IL-10^{+} B cells in CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi} transitional, non-transitional, CD9^{+}, and CD9^{-} B cells.

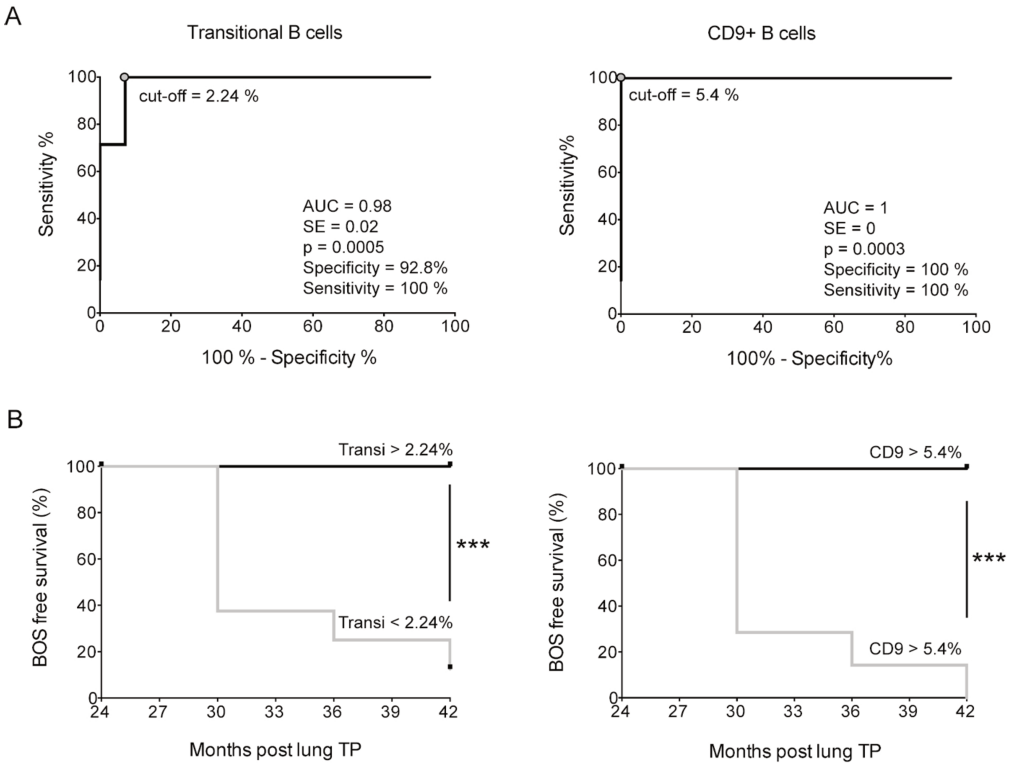


Figure 4: Correlation between CD19^{+}CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells and CD9^{+} level at 24 months and BOS incidence. A) ROC curve and B) Kaplan-Meier analysis of the level of transitional and CD9+ B cells 24 months post-LT in BOS and STA patients (AUC = 0.98, SE = 0.02, cut-off = 2.24 at 100% sensitivity and 92.8% specificity and AUC = 1, SE = 0, cut-off = 5.4 at 100% sensitivity and 100% specificity; respectively).

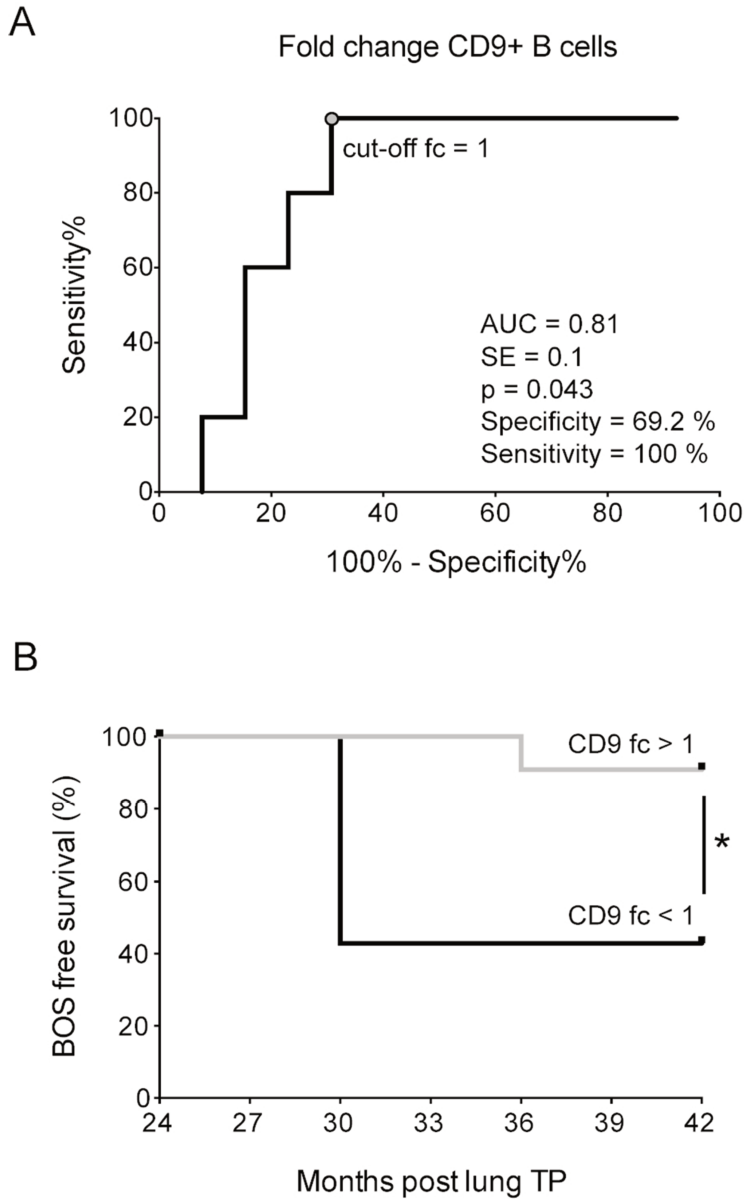
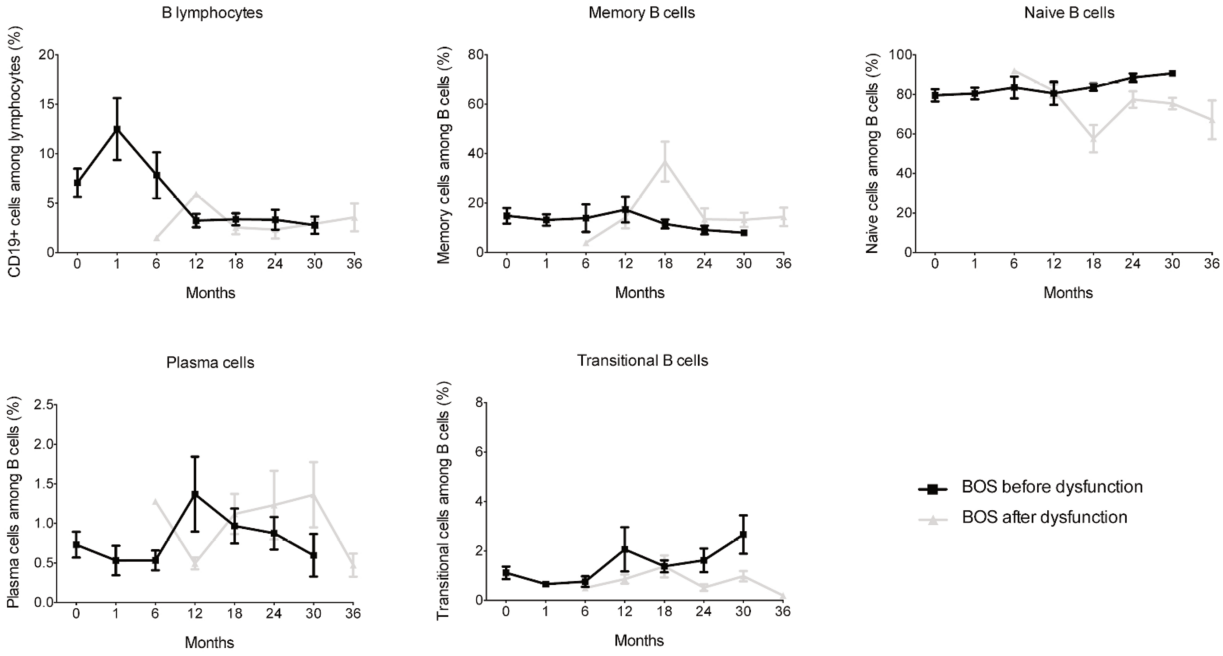


Figure 5: CD9+ B cell frequency is a predictive marker of long-term BOS-free survival at 24 months post-LT. A) ROC curve and B) Kaplan-Meier analysis of the 24- to 1-month $CD9^{+}$ fold change in BOS and STA patients (AUC = 0.81, SE = 0.1, cut-off = 1 at 100% sensitivity and 69.2% specificity).



Supplementary data 1: Longitudinal immunomonitoring of B lymphocyte subpopulations in BOS patients. Longitudinal immunomonitoring of $CD19^{+}$ B cells, transitional, memory, naive, and plasma cells before LT and at 1, 6, 12, 18, 24, and 30 months post-LT in BOS patients (*n* = 21) before (black) or after (grey) lung dysfunction.

B. Revue n°2

COLT : 10 ans de recherche en transplantation pulmonaire, résultats et perspectives

COLT: ten years of research in lung transplantation, results and perspectives

A. Tissot, A. Foureau, C. Brosseau, R. Danger, A. Roux, E. Bernasconi, C. Gomez, M. Durand, B. Renaud Picard, J. Le Pavec, J. Claustre, P. Lacoste, M. Benmerad, M. Pain, V. Siroux, P.J. Royer, P. Mordant, M. Reynaud-Gaubert, R. Kessler, O Brugière, J.F. Mornex, C. Dromer, M. Dahan, C. Knoop, V. Boussaud, A. Koutsokera, K. Botturi-Cavailles, E. Durand, J. Loy, L. Nicod, C. Pison, S. Brouard, X. Blanc, A. Magnan, pour le COLT consortium.

(Soumis)

COLT : 10 ans de recherche en transplantation pulmonaire, résultats et perspectives

Adrien TISSOT[1,2], Aurore FOUREAU[3], Carole BROSSEAU[2], Richard DANGER[2], Antoine ROUX[4], Eric BERNASCONI[5], Carine GOMEZ[6], Maxime DURAND[2], Benjamin RENAUD PICARD[7], Jérome LE PAVEC[8], Johanna CLAUSTRE[9], Philippe LACOSTE[10], Myriam BENMERAD[11], Mallory PAIN[3], Valérie SIROUX[11], Pierre-Joseph ROYER[3], Pierre MORDANT[12], Martine REYNAUD-GAUBERT[6], Romain KESSLER[7], Olivier BRUGIÈRE[13], Jean-François MORNEX[14], Claire DROMER[15], Marcel DAHAN[16], Christiane KNOOP[17], Véronique BOUSSAUD[18], Angela KOUTSOKERA[5], Karine BOTTURI-CAVAILLÈS[3], Eugénie Durand[3], Jennifer Loy[3], Laurent NICOD[5], Christophe PISON[8], Sophie BROUARD[2], Xavier BLANC[1], Antoine MAGNAN[1,3] pour le consortium COLT*

Contributions à l'étude : ATabcd, AFabcd, CBbcd, RDbd, ARad, EBbd, CGacd, MDbd, BRPd, JLPd, JCabcd, PLbd, MBbd, MPbd, VSbd, PJRbd, PMbd, MRGacd, RKacd, OBad, JFMacd, CDad, MDad, CKd, VBad, AKbd, KBCabd, EDbd, JLbd, LNbcd, CPabcd, SBbd, XBd, AMabcd

1. Service de Pneumologie, Institut du Thorax, CHU Nantes, Nantes, France
2. Centre d'étude en transplantation et immunologie, INSERM 1064, Université de Nantes, Nantes, France.
3. Institut du Thorax - INSERM 1087/CNRS 6291, CHU de Nantes, Nantes, France.
4. Service de Pneumologie, Hôpital Foch, Suresnes, Université Versailles Saint-Quentin, France
5. Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Suisse
6. Service de Pneumologie et transplantation pulmonaire, CHU Nord de Marseille, Aix Marseille Université, Marseille, France
7. Pôle Pathologie thoracique, CHU de Strasbourg, Strasbourg, France
8. Service de Chirurgie Thoracique, Vasculaire et Transplantation Cardiopulmonaire, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France.
9. Clinique Universitaire de Pneumologie, Pôle Thorax et Vaisseaux, Fédération Grenoble Transplantation, CHU Grenoble Alpes, INSERM 1055; Université Grenoble Alpes, Grenoble, France
10. Service de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire, L'institut du Thorax, CHU Nantes, Nantes, France
11. CNRS 5309, IAB, Team of Environmental Epidemiology applied to Reproduction and Respiratory Health, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.
12. Service de chirurgie vasculaire et thoracique, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France.
13. Unité Pneumologie, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France
14. Université de Lyon, UMR754, INRA, hospices civils de Lyon, Lyon, France
15. Unité d'insuffisance respiratoire et transplantation, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France
16. Chirurgie thoracique, Hôpital Larrey, CHU de Toulouse, Toulouse, France
17. Service de pneumologie, Hôpital Erasme, Brussels, Belgium.
18. Chirurgie cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges-Pompidou, AP-HP, Paris, France.

***COhort in Lung Transplantation-COLT** associant chirurgiens; anesthésiste-réanimateurs; médecins, personnels de recherche) **Bordeaux:** J. Jougon, J.-F. Velly; H. Rozé; E. Blanchard, C. Dromer; **Bruxelles:** M. Antoine, M. Cappello, M. Ruiz, Y. Sokolow, F. Vanden Eynden, G.

Van Nooten; L. Barvais, J. Berré, S. Brimioulle, D. De Backer, J. Créteur, E. Engelman, I. Huybrechts, B. Ickx, T. J.C. Preiser, T. Tuna, L. Van Obberghe, N. Vancutsem, J.-L. Vincent; P. De Vuyst, I. Etienne, F. Féry, F. Jacobs, C. Knoop, J.L. Vachiéry, P. Van den Borne, I. Wellemans ; G. Amand, L. Collignon, M. Giroux; **Grenoble :** D. Angelescu, O. Chavanon, G. Frey,R. Hacini, C. Martin, A. Pirvu, P. Porcu; P. Albaladejo, C. Allègre, A. Bataillard, D. Bedague, E. Briot, M. Casez-Brasseur, D. Colas, G. Dessertaine, M. Durand, G. Francony, A. Hebrard, M.R. Marino, D. Protar, D. Rehm, S. Robin, M. Rossi-Blancher; C. Augier, P. Bedouch, A. Boignard, H. Bouvaist, , A. Briault, B. Camara, J. Claustre, S. Chanoine, M. Dubuc, S. Quétant, J. Maurizi, P. Pavèse, C. Pison, C. Saint-Raymond, O. Stephanov, N. Wion; C. Chérion; **Lyon :** R. Grima, O. Jegaden, J.-M. Maury, F. Tronc; C. Flamens, S. Paulus; J.-F. Mornex, F. Philit, A. Senechal, J.-C. Glérant, S. Turquier; D. Gamondes; L. Chalabresse, F. Thivolet-Bejui; C Barnel, C. Dubois, A. Tiberghien; **Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou :** F. Le Pimpec-Barthes, A. Bel, P. Mordant, P. Achouh; V. Boussaud; R. Guillemain, D. Méléard, M.O. Bricourt, B. Cholley ; V. Pezella; **Marseille:** G. Brioude, X.B. D'Journo , C. Doddoli. P. Thomas, D. Trousse ; S. Dizier, M. Leone, L. Papazian; F. Bregeon, B. Coltey, N. Dufeu, H. Dutau, S. Garcia, JY. Gaubert, C. Gomez, S. Laroumagne, G. Mouton, A. Nieves, - Ch. Picard, M. Reynaud-Gaubert, JM. Rolain, E. Sampol, V. Secq ; **Nantes :** P. Lacoste, C. Perigaud, J.C. Roussel, T. Senage, A Mugniot; I. Danner, A Haloun A. Magnan, A Tissot, C Bry, FX Blanc; T. Lepoivre, K. Botturi-Cavaillès, S. Brouard, R. Danger, M. Bernard, E. Godard, R. Valéro, P.-J. Royer, E. Durand, M. Durand, C. Brosseau, A.Foureau ; **Le Plessis Robinson, Hôpital Marie Lannelongue** : Ph. Dartevelle, D. Fabre, E. Fadel, O. Mercier, S. Mussot; F. Stephan, P. Viard; J. Cerrina, P. Dorfmuller, S. Feuillet M. Ghigna, Ph. Hervén F. Le Roy Ladurie, J. Le Pavec, V. Thomas de Montpreville; L. Lamrani; **Paris, Hôpital Bichat :** Y. Castier, P. Mordant, P. Cerceau, P. Augustin, S. Jean-Baptiste, S. Boudinet, P. Montravers ; O. Brugière, G. Dauriat, G. Jébrak, H. Mal, A. Marceau, A.-C. Métivier, G. Thabut, E. Lhuillier, C. Dupin, V. Bunel; **Strasbourg :** P. Falcoz, G. Massard, N. Santelmo; G. Ajob, O. Collange O. Helms, J. Hentz, A. Roche; B. Bakouboula, T. Degot, A. Dory, S. Hirschi, S. Ohlmann-Caillard, L. Kessler , R. Kessler, A. Schuller; K. Bennedif, S. Vargas; **Suresnes** :P. Bonnette, A. Chapelier, P. Puyo, E. Sage; J. Bresson, V. Caille, C. Cerf, J. Devaquet, V. Dumans-Nizard, ML. Felten, M. Fischler, AG. Si Larbi, M. Leguen, L. Ley, N. Liu, G. Trebbia; S. De Miranda, B. Douvry, F. Gonin, D. Grenet, A.M. Hamid, H. Neveu, F. Parquin, C. Picard, A. Roux, M. Stern; F. Bouillioud, P. Cahen, M. Colombat, C. Dautricourt, M. Delahousse, B. D'Urso, J. Gravisse, A. Guth, S. Hillaire, P. Honderlick, M. Lequintrec, E. Longchampt, F. Mellot, A. Scherrer, L. Temagoult, L. Tricot; M. Vasse, C. Veyrie, L. Zemoura; **Toulouse :** M Dahan, M Murris, H Benahoua, J Berjaud, A Le Borgne Krams, L Crognier, L Brouchet, O Mathe, A Didier.

Soutiens : Associations Vaincre la Mucoviscidose et Grégory Lemarchal, European Union Seventh Framework Programme, Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Agence Nationale de la Recherche, Swiss National Research Foundation, Nantes métropole et Région Pays de la Loire, Agence de la Biomédecine, Novartis.

Titre court : COLT: 10 ans de recherche

Auteur-correspondant : Adrien Tissot, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de Pneumologie, 44093 Nantes Cedex 1 ; tel : +33 240165235 ; adrien.tissot@chu-nantes.fr

Mots-clés : transplantation pulmonaire, rejet du greffon, biologie des systèmes, marqueurs biologiques

Introduction

Cohort in Lung Transplantation (COLT) est une aventure collective née il y a 10 ans, qui a permis de faire émerger une dynamique de recherche translationnelle et collective en transplantation pulmonaire en France. Il s'agit maintenant de la plus large cohorte européenne adossée à une bio collection. Après la période de construction, d'obtention des premiers résultats et publications issues de COLT, nous proposons de faire le point et de dégager de nouvelles perspectives.

Historique

COLT a vu le jour le 2 septembre 2009 avec l'inclusion du premier patient. L'étude est née dans le contexte du groupe de travail issue de la Société de Pneumologie de Langue Française, de l'Etablissement français des Greffes et de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire sur la transplantation pulmonaire. Des travaux précurseurs de cette collaboration impliquant la plupart des centres avaient déjà été réalisés auparavant [1–4]. La conception de COLT avait commencé fin 2007 avec le souhait de plusieurs transplanteurs de réaliser un projet multicentrique afin de mettre en évidence des facteurs prédictifs de la dysfonction chronique du greffon (CLAD) dont, à l'époque, seule la bronchiolite oblitérante (BOS) était la forme clinique connue.

Nous avons alors profité du savoir-faire Nantais en transplantation rénale avec Divat (www.DIVAT.fr) qui a permis de développer une expertise locale dans la constitution de cohortes et de bio collections, notamment dans le domaine de la transplantation. La dotation « AVENIR » de l'INSERM obtenue par A Magnan à son arrivée au CHU de Nantes, assortie d'un financement de la région Pays de la Loire au titre de l'implantation d'une nouvelle équipe et d'une nouvelle thématique ont fait le socle du financement, sur lequel est venue s'apposer la contribution majeure et jamais réalisée ailleurs des associations Vaincre La Mucoviscidose et Grégory Lemarchal. Les deux associations ont été depuis 10 ans au rendez-vous, avec une grande confiance dans le projet. Leurs Conseils Scientifiques ont en effet compris rapidement que l'entreprise nécessitait du temps et ne porterait ses fruits que plusieurs années plus tard. Ces financements conséquents nous ont permis de commencer et d'obtenir un succès au programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) national en 2009. D'autres financements sont venus ensuite, notamment avec le projet européen System prediction of Chronic Lung Allograft Dysfunction (SysCLAD) en 2013 qui proposait une approche de médecine systémique en transplantation pulmonaire. L'approche systémique a pour but d'intégrer plusieurs niveaux d'analyse (clinique, fonctionnel, cellulaire, moléculaire, génomique…) pour aboutir à une médecine prédictive, préventive, participative et personnalisée (4P).

L'objectif principal de COLT est la découverte de facteurs précoces capables de prédire le CLAD. La méthode est la constitution d'une cohorte de patients vus initialement avant la greffe,

puis régulièrement sur une durée de 10 ans. A chaque visite jusqu'aux 5 ans de suivi du patient des prélèvements sanguins sont recueillis. Les résultats obtenus à ce jour portent sur les patients ayant 3 ans de suivi au moins. Autour de ce noyau constitué des 11 centres français de transplantation pulmonaire puis du centre de Bruxelles, se sont réunis des chercheurs issus de différents laboratoires de recherche qui ne s'étaient jamais jusqu'alors impliqués en transplantation pulmonaire, faute de masse critique de patients exploitables. Une vraie dynamique s'est alors constituée. COLT compte aujourd'hui 1807 patients dont 1448 transplantés ; 749 patients ont plus de trois ans de suivi et 349 plus de 5 ans.

SysCLAD, porté par Laurent Nicod à Lausanne a pu voir le jour grâce à la rencontre de deux cohortes européennes déjà constituées, différentes dans leurs structures, mais capables d'interagir, COLT d'une part et Swiss Transplant Cohort Study (SCTS) d'autre part [5]. C'était un projet européen court, sur 2 ans, pour lequel la période d'inclusion était réduite. Ce projet proposait la transplantation comme démonstrateur de la médecine systémique. A son tour, SysCLAD a permis d'attirer à la transplantation pulmonaire plusieurs laboratoires européens, reconnus pour leur expertise en immunologie (INSERM 1064 - Nantes), en physiopathologie respiratoire (INSERM 1087 - Nantes, INSERM 1152 - Bichat, INSERM 7200 - Strasbourg), en épidémiologie (INSERM U1209/CNRS 5309 - Grenoble) sur le microbiote (Centre Hospitalier Universitaire Vaudoise-Université Lausanne) et pour leur approche intégrative tel que l'European Institute for Systems Biology and Medicine (EISBM) .

Aujourd'hui, COLT doit trouver de nouveaux financements. Après 10 ans, la cohorte doit être actualisée et reprise avec des idées neuves par la génération suivante de transplanteurs. Cette transmission est notre plus grande fierté.

Résultats, Publications et brevets

1. Clinicome

Une des forces de COLT est d'avoir inclus assez de patients sur une période assez courte pour que les standards de traitements et de prises en charge ne soient pas modifiés dans l'intervalle. De plus, la cohorte compte assez de patients pour qu'il soit possible de se concentrer sur des patients porteurs de CLAD sans autre complication significative au cours de leur évolution, et les comparer à des patients parfaitement stables, à nouveau sans comorbidité marquée depuis leur transplantation. Cette distinction en deux groupes de malades aux phénotypes très contrastés est rendue possible par l'animation régulière de comités d'adjudication qui permettent de classer les patients de façon concertée et robuste [6]. Des signatures prédictives contrastées et de forte spécificité deviennent possibles. La limite de cette approche est qu'elle ne permet pas encore d'utiliser au lit du patient ces modèles

intégrant les facteurs de risques de CLAD identifiés. Seules des études prospectives de validation répondront à cette question et aboutiront à des « Clinical Decision Support Systems (CDSS) ».

.

L'analyse des patients de COLT et de STCS a été réalisée à partir des caractéristiques cliniques, biologiques et fonctionnelles de routine, dans le but d'identifier de nouveaux facteurs ou des combinaisons de facteurs de risque de CLAD. Ainsi 149 patients stables, 51 patients atteints de BOS à trois ans de suivi et 30 patients porteurs de la forme restrictive du CLAD (Restrictive Allograft Syndrome, RAS) ont été analysés. Parmi un large panel de caractéristiques analysées en multivariée, seule la présence dans le sérum d'anticorps spécifiques du donneur étaient prédictifs de la survenue d'un CLAD quel qu'en soit la forme. La broncho-pneumopathie chronique obstructive et la fibrose pulmonaire étaient les deux diagnostics pré-greffe associés au risque de RAS [7].

2. Transcriptome

Une première étude sur le transcriptome des patients inclus dans COLT a recherché des facteurs communs liés à l'insuffisance respiratoire chronique terminale ou des facteurs au contraire discriminants les patients en pré-greffe selon leurs pathologies initiales, dans le but d'identifier de nouvelles voies physiopathologiques dans ces maladies. Ainsi une signature commune aux patients en attente de greffe a été identifiée, indiquant une sous-expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'immunité, et soulignant en cela l'immunosuppression des patients en rapport avec l'hypoxie chronique. De plus cette étude a mis en évidence certains gènes et réseaux de gènes différemment exprimés dans la mucoviscidose, l'HTAP et la BPCO [8].

Une deuxième étude portant sur l'analyse des ARN messagers des éléments figurés du sang a été réalisée chez 40 patients stables et 40 BOS. Elle a permis d'identifier 47 gènes exprimés de façon différentielle entre les deux groupes. Une validation externe a été réalisée chez 24 patients supplémentaires par qPCR. Trois gènes impliqués dans la régulation du système immunitaire ont été identifiés comme prédictifs de BOS plus de six mois avant le diagnostic : POU Class 2 Associating Factor 1 (*POU2AF1*), T-cell leukaemia/lymphoma protein 1A (*TCL1A*) et B-cell lymphocyte kinase (*BLK*), avec une sensibilité respectivement de 82%, 73% et 68% et une spécificité de 85%, 92% et 100% (soumis pour publication).

3. Exposome

Grâce à la géolocalisation des patients de COLT, nous avons pu connaître pour chacun l'exposition cumulée aux polluants depuis la transplantation et corréler cette exposition avec l'évolution de la fonction respiratoire. Une première étude a permis de montrer chez 525

patients qu'une augmentation de l'exposition aux PM10 de 5µg/m^3, aux PM2,5 de 2µg/m^3 ou encore au NO_2 de10µg/m^3 était associée à une diminution de la capacité vitale forcée exprimée en pourcentage de la valeur théorique attendue. De nombreux facteurs de confusion furent intégrés dans ces modèles dont le recours aux macrolides. Il est intéressant de noter que l'effet protecteur de ce dernier fut démontré par rapport à ce risque environnemental [10]. Les résultats d'une analyse complémentaire indiquent que la pollution de l'air augmente la mortalité (soumis pour publication).

4. Génome

Le polymorphisme du gène *Club Cell Secretory Protein (CCSP)* G38A a été impliqué dans la susceptibilité épithéliale aux agressions externes. Ici, le but du travail était de démontrer le lien entre ce polymorphisme retrouvé chez le donneur, non pas avec le CLAD mais avec une complication précoce de la transplantation, elle-même fréquemment retrouvée comme un facteur de risque de CLAD, appelée dysfonction primaire du greffon (DPG), liée aux lésions d'ischémie-reperfusion. Les concentrations sériques de CCSP et le polymorphisme de son gène G38A ont été déterminés chez 104 donneurs et receveurs dont 84 avaient présenté une DPG de grade 1 ou 2 et 20 une DPG de grade 3. La CCSP sérique était significativement plus élevée chez les donneurs que chez les receveurs mais n'avait pas de rapport avec la DPG. En revanche le polymorphisme CCSP G38A chez le donneur avait une influence sur le risque de DPG grade 3 en analyse uni- et multivariée (OR = 0,082, 95CI: 0,004-0,52, p=0,026) (soumis pour publication).

5. Microbiome

Le microbiome pulmonaire joue un rôle majeur dans l'homéostasie de l'appareil respiratoire. Le groupe de B. Marsland et L. Nicod dans le cadre du projet européen SysCLAD a valorisé de façon exceptionnelle l'accès à ces lavages broncho-alvéolaires parfaitement annotés grâce à leur savoir-faire en matière d'analyse du microbiote respiratoire. Une première étude a montré que les caractéristiques du microbiote du lavage alvéolaire étaient associées à des profils particuliers d'expression de gènes de l'immunité innée, orientés vers l'inflammation (associés à la présence de *Staphylococcus* ou de *Pseudomonas*) ou le remodelage et la régulation (associés au *Streptococcus* et à *Prevotella*) [9]. Plus récemment, et en accord avec les autres données expérimentales issues de COLT concernant le devenir des greffons pulmonaires à long terme, 4 profils d'expression génique codant pour des protéines de la matrice extracellulaire ou pour des facteurs impliqués dans la synthèse ou la dégradation de celle-ci ont été mis en évidence dans 189 lavages alvéolaires de patients greffés, et des corrélations avec le microbiote ont été établies. Alors qu'un profil « catabolique » (MMP-7, 9,

12) était associé à un microbiote « pro-inflammatoire », un profil « anabolique » (PDGF, thrombospondine) était lié à un microbiote plus « commensal » [10].

6. Immunome

L'importance de l'immunité dans le processus de dysfonction chronique du greffon est certaine et nombreuses sont les publications ayant mis en évidence l'importance de sous populations T en transplantation pulmonaire. Cependant les résultats obtenus le plus souvent de façon transversale et sur un nombre réduit de patients sont souvent contradictoires. La meilleure connaissance de l'existence et de la fonction des populations T régulatrices mais aussi B régulatrices (Breg) a été mise à profit pour obtenir des résultats extrêmement prometteurs dans COLT.

Le premier travail concerne les T régulateurs (Treg). Une augmentation des Treg dans le sang des patients ayant développé une bronchiolite oblitérante trois ans après la greffe a été retrouvée dès 6 mois post transplantation. Les résultats ont été validés sur une seconde cohorte. Ces Treg ont un phénotype mémoire CD25+, CD45RA+ et CD39+. Le deuxième travail a été de réaliser un suivi des différentes sous-populations lymphocytaires B au cours du temps chez des patients transplantés pulmonaires. Le résultat marquant a été de mettre en évidence l'association du taux à 24 mois post-transplantation de cellules transitionnelles $CD24^{hi}CD38^{hi}$ et de cellules B $CD9^{+}$ sécrétrices d'IL-10 avec un meilleur pronostique de l'allogreffe pulmonaire. L'identification des cellules B exprimant CD9 comme nouveau biomarqueur prédictif de la bonne fonction du greffon permet d'envisager de nouvelles stratégies de prédiction du BOS et de traitement de la pathologie (Brevet déposé en association avec l'université de Nantes, l'INSERM et le CHU de Nantes. n° 17 305479.2) (soumis pour publication).

7. Biomarqueurs protéiques

Une approche plus classique a été mise en œuvre pour valoriser MMP-9 comme biomarqueur protéique prédictif de la survenue de la BOS. Le point de départ a été la démonstration que la coculture de cellules épithéliales bronchiques (CEB) issues de trachées de donneur et de lymphocytes T allogéniques entraînait une modification du phénotype des CEB en induisant le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)[11], classiquement impliqué dans les processus fibrosants notamment pulmonaires et dans la dysfonction chronique des greffons solides. La TEM est bien un processus induit par les lymphocytes T, avec une production importante par les CEB de MMP-9, à l'exclusion de nombreuses autres protéines. Cette sécrétion est dépendante de la production de la chimiokine CCL2 par les lymphocytes T et de la présence de son récepteur CCR2 à la surface des CEB. Le dosage de MMP-9 dans

le plasma des patients de COLT a permis de montrer que ce marqueur était associé au risque de bronchiolite oblitérante plus de 12 mois avant le diagnostic fonctionnel de celle-ci [12].
Par ailleurs, nous avons également montré que la molécule C-type lectin-like receptor-1 (CLEC-1), exprimée par les cellules dendritiques humaines diminuait l'activation des cellules Th17 et que son activité était elle-même augmentée par le TGF-ßeta. De façon intéressante, elle est diminuée dans le sang des patients porteurs de BOS et corrélée chez ces patients à un niveau élevé d'IL-1[13].

Perspectives

Les perspectives de COLT sont nombreuses et enthousiasmantes. En 10 ans, nous serons parvenus à instaurer de façon durable un projet collaboratif entre 12 centres francophones européens de transplantation, à créer un réseau d'investigateurs et de chercheurs autour de la transplantation pulmonaire et à créer les conditions pour qu'une autre génération de transplanteurs et de chercheurs s'empare de ce projet, le modernise et le transforme. Bien sûr, nous aurons apporté des éléments de connaissance nouveaux au processus physiopathologique conduisant au CLAD.

1. Suivi au-delà de 3 ans

Un des premiers défis va être de répondre à l'objectif principal qui est la prédiction de la survenue du CLAD à 5 ans des patients transplantés. Certains patients considérés comme stables à 3 ans auront pu changer de groupe en développant un CLAD plus tardif. Ces nouvelles données permettront d'affiner la pertinence des biomarqueurs découverts et de tester leur robustesse. Les autorisations sont obtenues pour que les patients soient suivis à 10 ans, ce qui permettra d'aller encore plus loin dans l'exploration du pouvoir de prédiction des marqueurs et facteurs de risque précoces.

2. Signature pré-greffe ?

Des résultats préliminaires indiquent que certains marqueurs détectés après la transplantation sont déjà présents dans le sérum des patients avant la greffe (résultats non publiés). Ces marqueurs ne sont pas forcément les mêmes selon la pathologie respiratoire sous-jacente, et doivent être validés. La découverte de tels marqueurs pré-greffe, susceptibles d'intervenir dans la décision même de l'intervention, revêtent bien évidemment une importance particulière et doivent être testés de façon prospective pour mieux stratifier le risque de CLAD.

3. Validation prospective de biomarqueurs combinés

C'est la perspective principale de COLT dans les années qui viennent. Les biomarqueurs identifiés doivent être testés de façon prospective pour être valider et démontrer leur capacité

à effectivement être utilisés en pratique, avec une intervention thérapeutique personnalisée comme l'intensification/modification de l'immunosuppression en cas de risque de CLAD *versus* une diminution de celle-ci en cas d'absence de risque pour limiter ses effets secondaires. De plus, la combinaison de biomarqueurs sous forme de score complexe « multi-omique » devra également être testée dans le but d'améliorer le caractère prédictif positif ou négatif des marqueurs pris individuellement.

Conclusion : la transplantation pulmonaire comme démonstrateur de la médecine de précision ou personnalisée

La transplantation d'organe solide, qu'il s'agisse du rein, du cœur, du poumon ou du foie est une situation exceptionnelle en médecine dans laquelle la maladie étudiée, la dysfonction du greffon, apparaît après que le suivi du patient a commencé. Cela permet d'enrôler les patients dans des cohortes prospectives capables de délivrer des facteurs prédictifs précoces. De plus, la gravité de la maladie sous-jacente et le caractère exceptionnel de la transplantation elle-même garantissent que les patients suivis ne soient pas perdus de vus, participent aux visites et soient particulièrement investis dans les protocoles de recherche. Enfin, la dysfonction chronique du greffon, pour être un événement tardif, reste assez précoce pour permettre l'obtention de résultats en quelques années seulement. C'est ainsi que cette pathologie se présente comme un champ expérimental exemplaire pour la médecine 4P, qui puisse être pertinent pour l'ensemble du domaine des maladies chroniques, en particulier inflammatoires.

Les conséquences de cette approche sont multiples et dépassent la recherche en biologie. En effet, au-delà de la découverte de biomarqueurs combinés ou de signatures, il s'agit de renouveler les algorithmes et à terme transformer le parcours de soins, en tenant à distance des structures hospitalières, par exemple par télémédecine, les patients à faible risque en se concentrant sur les patients à plus fort risque. Se concentrer ainsi sur un sujet bien portant mais à risque de dysfonction chronique du greffon c'est aussi renouveler la relation soignant – soigné en proposant une relation prévenant-prévenu supposant la création de nouveaux métiers de la santé.

III. LE RÔLE DES BREGS DANS L'ASTHME ALLERGIQUE

A. Article n°5

Une sous-population de lymphocytes B aux propriétés régulatrices, exprimant le CD9, inhibe l'inflammation des voies aériennes dans un modèle d'asthme allergique aux acariens

A regulatory CD9+ B-cell subset inhibits HDM-Induced allergic airway inflammation

F. Braza, J. Chesne*, M. Durand, S. Dirou, C. Brosseau, G. Mahay, M.A. Cheminant, A. Magnan, S. Brouard*

* Les auteurs ont participé à ce travail à part égale

(Publié dans Allergy : 70, 1421–31 ; 2015)

Contexte : L'exposition à des allergènes respiratoires déclenche une hyperréactivité bronchique et une inflammation caractérisée par l'expansion de cellules TH2 et la production d'IgE spécifiques de l'allergène. L'asthme allergique est caractérisé par une altération des mécanismes de régulation immunitaire conduisant à un déséquilibre entre les composants pro- et anti-inflammatoires du système immunitaire.
Objectifs : Récemment, les cellules lymphocytaires B ont été décrites comme des régulateurs centraux d'une l'inflammation exacerbée, notamment dans le cas de l'auto-immunité. Cependant, les mécanismes utilisés par ces cellules dans la régulation l'inflammation des voies respiratoires et l'asthme restent à élucider.
Matériels et méthodes : Notre étude porte sur un modèle murin d'asthme allergique induit par une sensibilisation percutanée et une provocation respiratoire avec un extrait d'acarien.
Résultats : Dans cette étude, nous avons montré que l'induction de l'asthme allergique altère l'homéostasie des Bregs IL-10+ et favorise la production de cytokines inflammatoires par les cellules B. Une analyse transcriptomique et phénotypique plus approfondie des lymphocytes Bregs a révélé qu'ils étaient enrichis dans un sous-ensemble de lymphocytes B exprimant la molécule CD9. Chez les souris asthmatiques, le transfert adoptif des lymphocytes B CD9+ inhibe l'inflammation des voies aériennes et améliore leur fonction pulmonaire en régulant, via l'IL-10, l'inflammation Th2 et Th17, rétablissant ainsi un équilibre immunologique favorable dans les tissus pulmonaires. En effet, nous avons en outre montré que l'injection de Bregs CD9+ permet le contrôle de l'expansion des cellules T effectrices dans le poumon. Ceci favorise l'établissement d'une balance lymphocytes T régulateurs / T effecteurs favorable dans les poumons.
Conclusion : Cette découverte renforce le potentiel thérapeutique des lymphocytes Bregs dans l'asthme allergique.

Allergy EUROPEAN JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY

Allergy

ORIGINAL ARTICLE EXPERIMENTAL ALLERGY AND IMMUNOLOGY

A regulatory CD9$^+$ B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation

F. Braza[1,2,3,4,5,6,*], J. Chesne[1,2,3,4,5,6,*], M. Durand[3,4,5,6], S. Dirou[1,2,7], C. Brosseau[1,2,3,4,7], G. Mahay[1,2], M. A. Cheminant[1,2], A. Magnan[1,2,6,7] & S. Brouard[3,4,5,6]

[1]INSERM, UMR 1087, l'institut du thorax, [2]CNRS, UMR 6291, [3]INSERM, UMR 1064, [4]CHU de Nantes, ITUN, [5]CIC biothérapie, [6]Université de Nantes, [7]CHU Nantes, l'institut du thorax, Service de Pneumologie, Nantes, France

To cite this article: Braza F, Chesne J, Durand M, Dirou S, Brosseau C, Mahay G, Cheminant MA, Magnan A, Brouard S. A regulatory CD9* B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy* 2015; **70**: 1421–1431

Keywords
airway inflammation; allergic asthma; IL-10; regulatory B cells.

Correspondence
Dr. Sophie Brouard, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.
Tel.: 33 2 40 08 78 42
Fax: 33 2 40 08 74 11
E-mail: sophie.brouard@univ-nantes.fr

*Authors contributed equally to this work.

Accepted for publication 14 July 2015

DOI:10.1111/all.12697

Edited by: Hans-Uwe Simon

Abstract

Background: Exposure to respiratory allergens triggers airway hyperresponsiveness and inflammation characterized by the expansion of T_H2 cells and the production of allergen specific IgE. Allergic asthma is characterized by an alteration in immune regulatory mechanisms leading to an imbalance between pro- and anti-inflammatory components of the immune system.

Aims: Recently B cells have been described as central regulators of exacerbated inflammation, notably in the case of autoimmunity. However, to what extent these cells can regulate airway inflammation and asthma remains to be elucidated.

Materials & Methods: We took advantage of a allergic asthma model in mice induced by percutaneous sensitization and respiratory challenge with an extract of house dust mite.

Results: In this study, we showed that the induction of allergic asthma alters the homeostasis of IL-10$^+$ Bregs and favors the production of inflammatory cytokines by B cells. Deeper transcriptomic and phenotypic analysis of Bregs revealed that they were enriched in a CD9$^+$ B cell subset. In asthmatic mice the adoptive transfer of CD9$^+$ B cells normalized airway inflammation and lung function by inhibiting T_H2- and T_H17-driven inflammation in an IL-10-dependent manner, restoring a favorable immunological balance in lung tissues. Indeed we further showed that injection of CD9$^+$ Bregs controls the expansion of lung effector T cells allowing the establishment of a favorable regulatory T cells/effector T cells ratio in lungs.

Conclusion: This finding strengthens the potential for Breg-targeted therapies in allergic asthma.

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airway hyper-responsiveness and deregulated inflammation in response to allergens. This pathology is controlled by CD4$^+$ T helper (T_H) lymphocytes, which cause cellular infiltration in the lungs, overproduction of mucus, and airway constriction. In general, B cells have been described in asthma as deleterious cells secreting allergen-specific IgE under pro-T_H2 inflammatory conditions. IgE interacts with Fcε receptor I at the surface of basophils and mast cells, promoting the release of pro-inflammatory mediators such as chemokines, prostaglandins, and leukotrienes, which leads to airway inflammation and airway narrowing (1).

Beyond their antibody secretion capacities, B cells can also present antigens, produce cytokines, and regulate T-cell-mediated immune responses (2). Indeed, B cells can secrete both pro-inflammatory and inhibitory cytokines, the balance of which influences the immune response (2). Recently, a sub-

Abbreviations
BAL, bronchoalveolar lavage; Bregs, regulatory B cells; HDM, house dust mite; LPS, lipopolysaccharide; MZ, marginal zone; PIM, PMA + ionomycin + monensin; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate.

population of regulatory B cells (Bregs) that produces large amounts of IL-10 was identified in both mice and humans (3, 4). These cells are able to suppress inflammation by constraining T_H1 and T_H17 responses and inducing regulatory T cells (Tregs) (3, 4). Accordingly, functional impairment of the IL-10-producing B-cell subset is associated with exacerbated persistent autoimmunity and dermal allergic inflammation (5–7). In allergic asthma models, infection with parasites protects mice from the development of lung inflammation and airway hyper-responsiveness through the generation of IL-10-producing B cells (8, 9). Notably, elevated levels of allergen-specific, IL-10-producing Bregs have been found after immunotherapies for food and bee venom allergies, suggesting that increased proportions of Bregs are a specific feature of induced tolerance toward allergens (10, 11). However, to what extent the development of allergic asthma influences the homeostasis of Bregs has not yet been clearly addressed. To investigate this, we took advantage of an acute model of house dust mite (HDM)-induced allergic airway inflammation.

Herein, we show that B cells from allergic mice preferentially secrete a pro-inflammatory cytokine profile that counters the effects of the anti-inflammatory cytokine IL-10. Consistently, the frequency of IL-10$^+$ Bregs was decreased in the spleen and lungs of asthmatic mice. Microarray and cytometry analysis further demonstrated that Bregs were enriched in a CD9$^+$ B-cell subset that was decreased in asthmatic mice, and adoptive transfer of these CD9$^+$ B cells abrogated asthma in an IL-10-dependent manner.

Materials and methods

Mice

Six- to eight-week-old wild-type and IL-10$^{-/-}$ BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France). Allergic inflammation was induced in mice using a total HDM extract *(Dermatophagoïdes farinae)* provided by Stallergenes (Antony, France). Induction of allergic inflammation was performed as previously described (12) (see Appendix S1 for more details).

Flow cytometry – The following antibodies were used for flow cytometric analyses

Ly6G-PercP.Cy5.5 (1A8), CD8-APC-H7 (53–6.7) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), CD3-APC (145.2C11), CD19-PeCy7 (1D3), F4/80-FITC (BM8) (eBioscience, Paris, France), CCR3-PE (83101; R&D systems, Lille, France). CD3-APC (145-2C11), CD4-FITC (OKT4), CD25-PE (PC61), Foxp3-PECy7 (FJK-16s), CD19-PeCy7 (1D3), IgM-APC or PE (II/41), IgD-eFluor®450 or APC (11-26c), GL7-A488 (GL-7), CD9-FITC (KMC8), CD70-PerCP-eFluor®710 (FR70), Ctla4-APC (UC10-4B9), CD73-eFluor®450 (TY/11.8), CD5-APC (53–7.3), CD1d A488 (1B1), CD23-FITC (B3B4), CD21-eFluor®450 (4E3), IL-4-APC (11B11) and IL-13-FITC (eBio13A) (all from eBioscience), CD95-Bv421® (Jo2), PD-1-Bv421® (J43) and IL-17A (TC11-18H10) (BD Biosciences). For all experiments, dead cells were excluded using DAPI or Fixable Viability Dye 450 (BD Biosciences). Cells were fixed and permeabilized with the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) before the intracellular staining (see Appendix S1 for more details).

Analysis of IL-10 production

We analyzed IL-10-producing B cells as previously described (13). In some experiments, splenic B-cell subsets were purified using the Pan B Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) or the FACS ARIA III (BD Biosciences) and then incubated for 2 days with a CD40 agonist (BD Biosciences, 2 μg/ml), Tim-1 (BioXcell, 10 μg/ml), IL-21 (eBiosciences, 100 ng/ml), or BAFF (R&D system, 20 ng/ml) and activated with LPS + PIM (PMA, Ionomycin and monensin) for the last 5 h (see Appendix S1 for more details).

Adoptive transfer

Spleen cells from asthmatic WT or IL-10$^{-/-}$ mice were stained for CD19 and CD9. Fluorescence minus one was used as a negative control for CD9 expression. CD9$^+$ and CD9$^-$ B cells were sorted using a FACSAria III (BD Bioscience). Purity was routinely superior of 95%. HDM-treated mice received 5×10^5 sorted cells intravenously (i.v.) 1 day before the second challenge. To follow the migration of B cells into the lungs, we stained them with PKH26 before the sorting.

Statistical analysis

Comparisons of experimental values between two groups were analyzed using the Mann–Whitney *U*-test. The nonparametric Kruskal–Wallis test with Dunn's posttest was used for comparisons between more than two groups. Enhanced pause (Penh) and lung resistance results were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA). All statistic analyses were performed in GraphPad Prism v6, La jolla, USA.

Results

Exposure to allergen elicits attraction of B cells to the airways

As previously published by our team (12, 14), exposure to total *Dermatophagoides farinae* (Der f) extract induced airway hyper-responsiveness (Fig. S1A,B) associated with severe inflammation, as characterized by the presence of mucus-secreting cells, eosinophilic-neutrophilic influx, production of systemic Der f1-specific IgE, and T_H2-T_H17 cytokine secretion (Fig. S1C–E).

We found an increased expression of the B-cell chemoattractant factor, CXCL13, in the lungs and a higher level of CXCL13 in the BAL of asthmatic mice 24 h after the last challenge (Fig. S2A). This was associated with a significant increase of B cells in the BAL and lungs of house dust mite-treated mice (HDM mice) (Fig. 1A–B). Notably, we detected perivascular and peribronchial B-cell infiltrate in the lung tis-

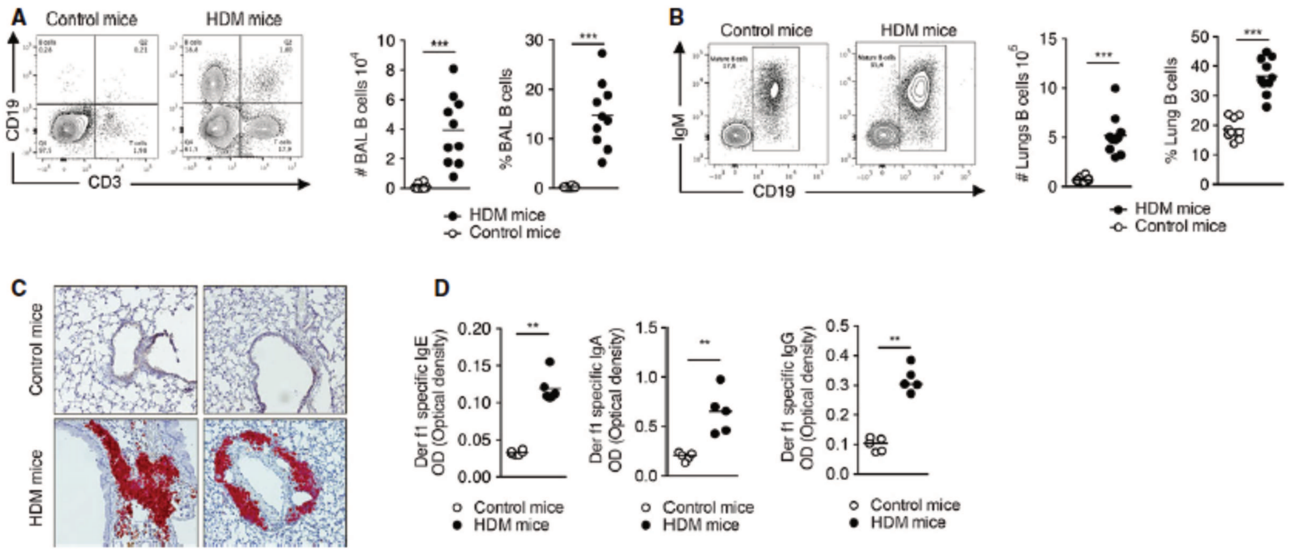


Figure 1 HDM promotes the infiltration and maturation of B cells. (A) Quantification of B cells in the BAL. (B) Quantification of total B cells in lungs of mice. (C) Representative B-cell staining in the lung tissue (Red staining = B220$^+$ B cells). (D) Levels of Der f1-specific IgE, IgG, and IgA in BAL. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

sues from mice exposed to the allergen (Fig. 1C). Our cytometry analysis highlighted in lung of HDM mice an increase of germinal center B cells (CD19$^+$ Fas$^+$ GL7$^+$) and total switched memory B cells (CD19$^+$ IgM$^-$ IgD$^-$) (Fig. S2B,C), which was associated with the production of Der f1-specific IgE, IgG, and IgA in BAL fluid, supporting the establishment of a local B-cell response toward the allergen (Fig. 1D).

Allergic inflammation influences the cytokine profile of B cells and importantly alters the homeostasis of IL-10$^+$ regulatory B cells

Various cytokine-producing B cells able to regulate the immune response have been recently described (2). To more precisely define the cytokine profile of B cells in asthma, we assessed the mRNA levels of a panel of cytokines including IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and TGF-β, in purified *ex vivo* lung B cells obtained from control and HDM-treated mice (Fig. 2A). We observed a higher mRNA expression of IL-4 and IL-6 cytokines in B cells from lungs of asthmatic mice (Fig. 2A), whereas the expression of IL-10 was significantly decreased in the lung B cells from HDM mice (Fig. 2A).

The decreased expression of IL-10 in lung B cells of asthmatic mice prompted us to examine whether allergic inflammation affects the homeostasis of Bregs. Lung cells were isolated and stimulated during 5 h with LPS and PIM, followed by staining for cytoplasmic IL-10 expression (13). IL-10-secreting B cells represented 3.14% (±0.4) of total B cells in the lungs of control mice, whereas only 2.1% (±0.2, $P < 0.01$) was observed in the lungs of asthmatic mice (Fig. 2B). Consistently LPS-stimulated lung B cells from allergic mice produce lower levels of IL-10 than LPS-stimulated lung B cells from control mice (Fig. 2C). Finally, a lower frequency of IL-10-secreting B cells was found in the lung of allergic mice after restimulation of total lung cells with HDM extract (Fig. 2D). Altogether, these results indicate an altered homeostasis of IL-10-secreting B cells in the context of allergy.

Transcriptomic analysis highlights new specific surface markers for IL-10-secreting B cells

Stimulation with CD40 agonist optimally induces IL-10 in purified spleen B cells (Fig. S3A–C). CD40-stimulated B cells were labeled with anti-IL-10 antibody conjugated to anti-CD45 antibody and incubated to allow secretion and capture of IL-10 to the cell surface for the purification of live IL-10$^+$ B cells (Fig. S3D,E). To better define Bregs, we analyzed the transcriptomic profile of sorted IL-10$^+$ B cells and IL-10$^-$ B cells of asthmatic and control mice using whole-genome microarray expression analysis (Fig. 3A and Table S1). We identified 3420 and 5374 differentially expressed probes in IL-10$^+$ and IL-10$^-$ B cells in control and HDM mice, respectively (Fold >0.3; $P < 0.01$, Table S1). A total of 954 common probes were differentially expressed in both control and HDM mice (Table S1).

To investigate the Breg phenotype, we focused on the expression of surface markers that were differentially expressed in IL-10$^-$ and IL-10$^+$ cells in both control and HDM mice. Interestingly, classical markers described for Bregs, including CD5, CD1d, CD23, CD21, CD43, IgM, and TIM-1, were not differentially expressed between IL-10$^-$ and IL-10$^+$ B cells in our microarray experiments (Table S1). Instead, surface proteins with higher expression in IL-10$^+$ B cells were CD80, CD70, Nt5e (coding for CD73), CD9, CTLA4, and Pdcd1 (coding for PD-1). Surface markers with significantly lower expression in IL-10$^+$ B cells included

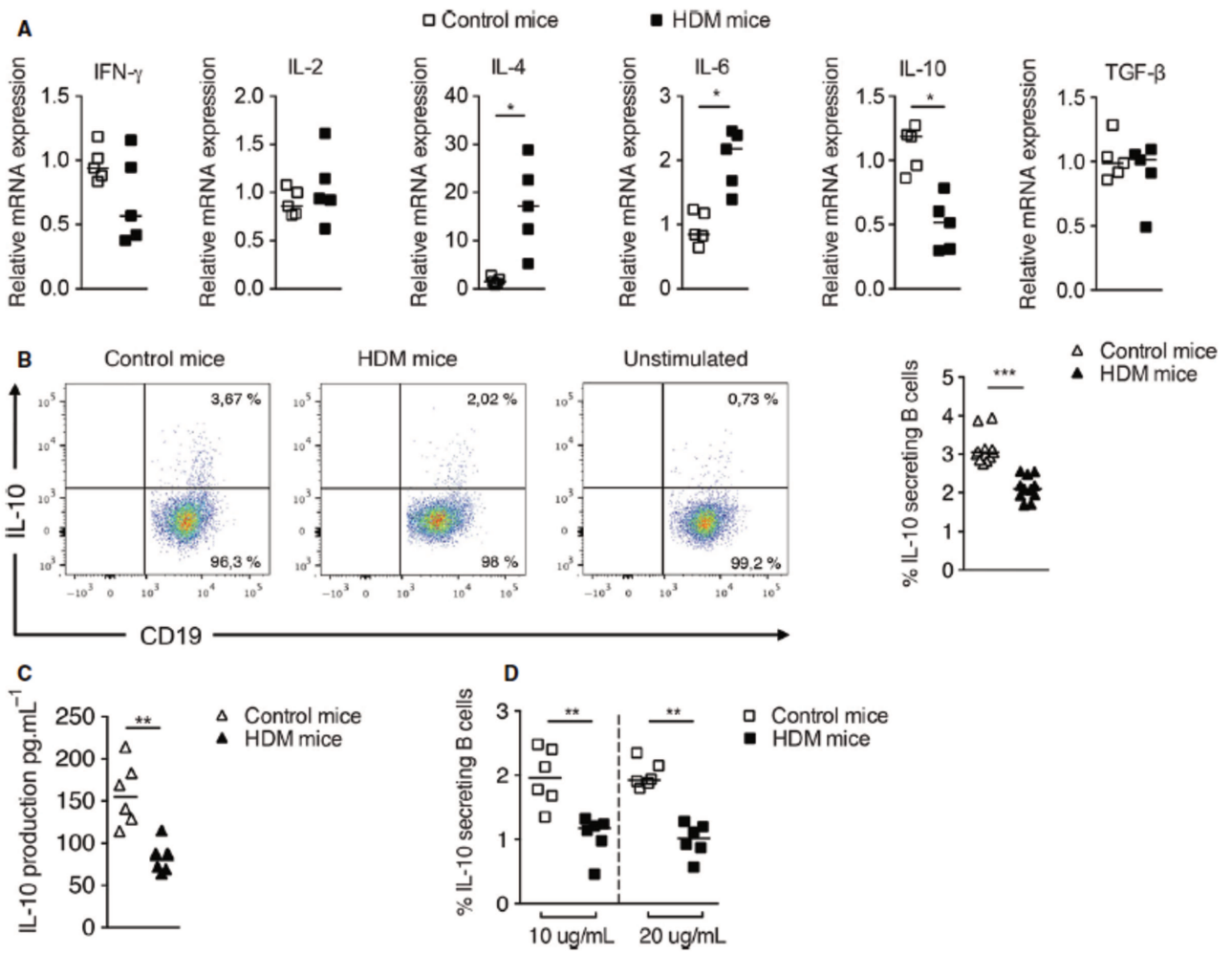


Figure 2 HDM-induced asthma alters the homeostasis of Bregs. (A) The mRNA levels of cytokines were analyzed using RT-PCR in purified B cells from the lungs of control and allergic mice. (B) IL-10⁺ B-cell frequencies in the lungs of mice. Lungs were cultured with LPS + PIM for 5 h, stained with CD19 mAb, permeabilized, and stained with IL-10 mAb for flow cytometric analysis. Representative results demonstrate the frequency of IL-10-producing cells within the indicated gates among total CD19⁺ B cells in lungs. (C) IL-10 protein levels in the supernatant of purified lung B cells activated with LPS + PIM for 5 h. (D) Lung cells from control and HDM-treated mice were stimulated for 3 days with a total extract of HDM. At the end of the culture period, the cells were restimulated with PMA, and the IL-10⁺ B-cell frequency was analyzed by flow cytometry. ***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, and *$P < 0.05$.

Pdpn (coding for podoplanin), Itga10, and Itgb3 (Fig. 3A). Differential expression of surface CD9, CD70, CD73, CD80 was confirmed by flow cytometric analysis (Fig. 3B), further supporting the identification of new markers to phenotype IL-10⁺ Bregs in mice.

CD9 is a specific marker for Bregs in mice and humans

To phenotype Bregs, we focused on the expression of CD9, CD73, and CD70 (Fig. 3C). Other B-cell markers that have been linked to Breg cells in previous reports (15, 16) were analyzed as well (Fig. 3C), and we found an equivalent enrichment in IL-10⁺ B cells in the CD5⁺ CD1d^{hi} and T2-MZP populations (Fig. 3C–D). However, a higher enrichment in IL-10 production was found in splenic CD9-expressing B-cell subsets (Fig. 3C–D).

Because the differential expression of CD9, CD70, and CD73 could be induced by our protocol of activation, we stimulated spleen purified B cells with LPS-PIM for 5 h to identify spontaneous Bregs (Fig. 4A). In this setting, only the expression of CD9 remains differential between IL-10⁺ and IL-10⁻ B cells (Fig. 4A). Additionally, around 16.3% (±1.8) of these CD9⁺ B cells express IL-10, whereas less than 1% of CD9 express IL-10 (Fig. S4A). Consistently sorted CD9⁺ splenic B cells produce the highest levels of IL-10 after *in vitro* activation (Fig. 4B) further confirming the reliability of this marker to identify Bregs.

In spleen, the CD9 expression pattern is heterogeneous and is not restricted to one B-cell subset. Indeed, overexpres-

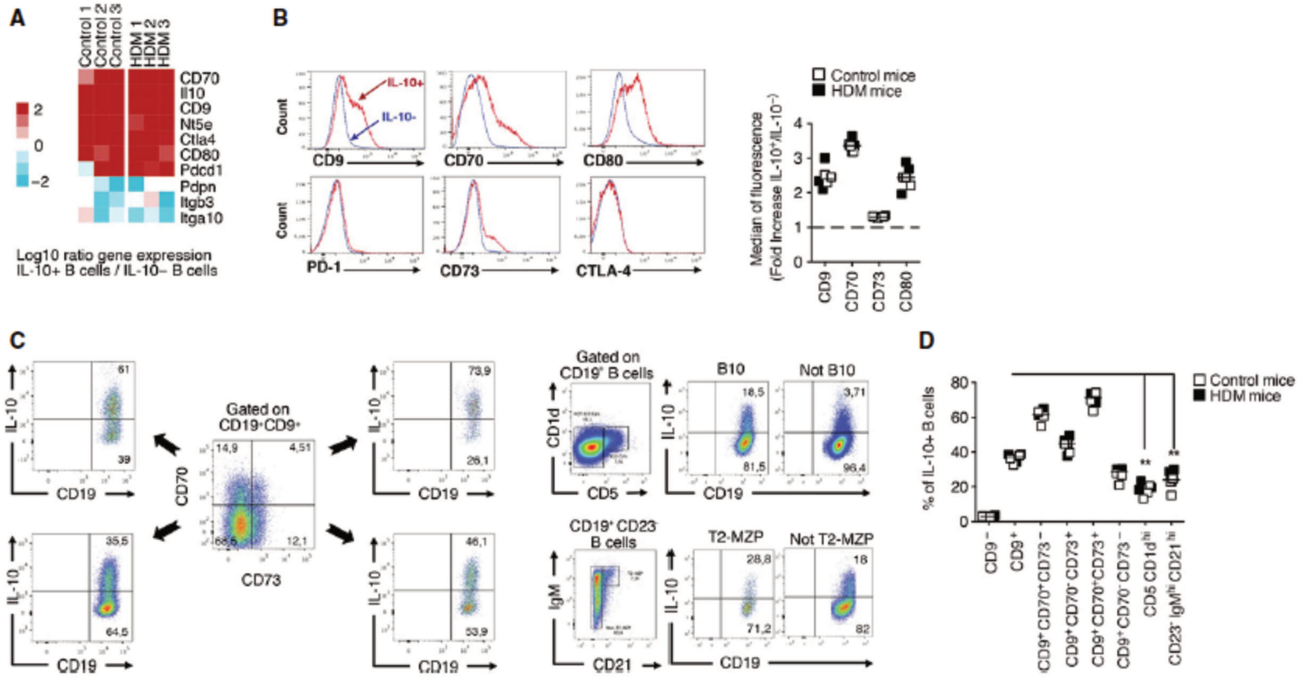


Figure 3 Characterization of IL-10$^+$ and IL-10$^-$ B cells. (A) Heat map showing upregulated and downregulated genes coding for surface proteins between IL-10$^+$ and IL-10$^-$ B cells. (B) Representative staining of CD9, CD70, CD73, CD80, CTLA4, and PD-1 at the surface of IL-10$^+$ and IL-10$^-$ B cells and differential protein expression of CD9, CD70, CD73, and CD80 at the surface of IL-10$^+$ B cells of control and HDM mice. (C) Purified B cells from the spleens of control and HDM mice were activated for 2 days with CD40 mAb agonist and LPS + PIM during the last 5 h. Then, IL-10-secreting B cells were quantified in the CD5$^+$ CD1d$^+$ (B10), CD23$^-$ CD21^{hi} IgM^{hi} (T2-MZP) and newly identified CD9$^+$ B-cell subsets. (D) Quantification of IL-10$^+$ B cells in CD9-expressing B-cell subsets, CD5$^+$ CD1d$^+$ (B10), and in CD23$^-$ CD21^{hi} IgM^{hi} (T2-MZP) $^{**}P < 0.01$.

sion of CD9 is found in B1a B cells (CD5$^+$), MZ B cells, and T2-MZP B cells (Fig. 4C; Gating strategy is available in Fig. S5). These three populations have been described for their role in the regulation of inflammation in many experimental mouse models (4, 17).

In lungs, the phenotype of IL-10 Bregs was similar, with higher expression of CD9, CD73, and CD70 at the surface of IL-10-secreting B cells (Fig. 4D). Also, cytometry analysis revealed that 6.6% (±0.3) of lung CD9$^+$ B cells express IL-10 in control mice (Fig. S4B). Interestingly, frequency of these cells was decreased in allergic mice confirming the defect in Bregs (Fig. S4C).

Finally, in humans, expression of CD9 was dramatically increased at the surface of CD24^{hi} CD38^{hi} immature B cells describing as an important IL-10 Breg subset able to control T-cell inflammation (Fig. 4E) (18–20). Altogether, our findings suggest that CD9 can be a reliable marker to purify both mouse and human Bregs.

Injected CD9$^+$ B cells home to the lungs and reduce airway inflammation

In a last step, we explored the ability of CD9$^+$ B cells to regulate airway inflammation and asthma exacerbation *in vivo*. A total of 5 × 10^5 splenic CD9$^+$ or CD9$^-$ B cells were isolated by cell sorting and were intravenously injected in asthmatic mice 24 h before the second challenge (Fig. S6A). To follow the migration of injected B cells, we labeled them with a fluorescent tracer. Interestingly, a fraction of injected CD9$^+$ B cells were found in the lungs of mice 24 h after the second challenge (Fig. S6B-D). Lung function and allergic airway inflammation were then analyzed, and we found that the recipients of splenic CD9$^+$ B cells from HDM mice were protected from HDM-induced asthma, with lower bronchial hyper-reactivity (Fig. 5A), lower levels of systemic Der f1-specific IgE, and dampened cellular infiltration in BAL (Fig. 5B) including significantly lower levels of neutrophils and eosinophils (Fig. 5D,E). In contrast, CD9$^-$ B cells from the spleens of HDM mice did not influence the course of HDM-induced allergic airway inflammation, with comparable levels of airway hyper-responsiveness (Fig. 5A), Der f1-specific IgE (Fig. 5C), and cellular infiltration (Fig. 5B,D,E) than HDM mice treated with PBS (Fig. 5B–E). Similarly, transfer of CD9$^+$ B cells from IL-10$^{-/-}$ allergic animals was not protective, confirming the IL-10-dependent regulatory mechanism *in vivo* (Fig. 5A–E).

Next, we investigated to what extent CD9$^+$ B cells influenced T-cell responses in the airways. Figure 6A–C shows that injection of CD9$^+$ Bregs significantly reduced the production of IL-4, IL-13, and IL-17 by CD4$^+$ T cells in the lung tissues. Additionally, the levels of inflammatory cytokines were significantly reduced in the BAL after the second

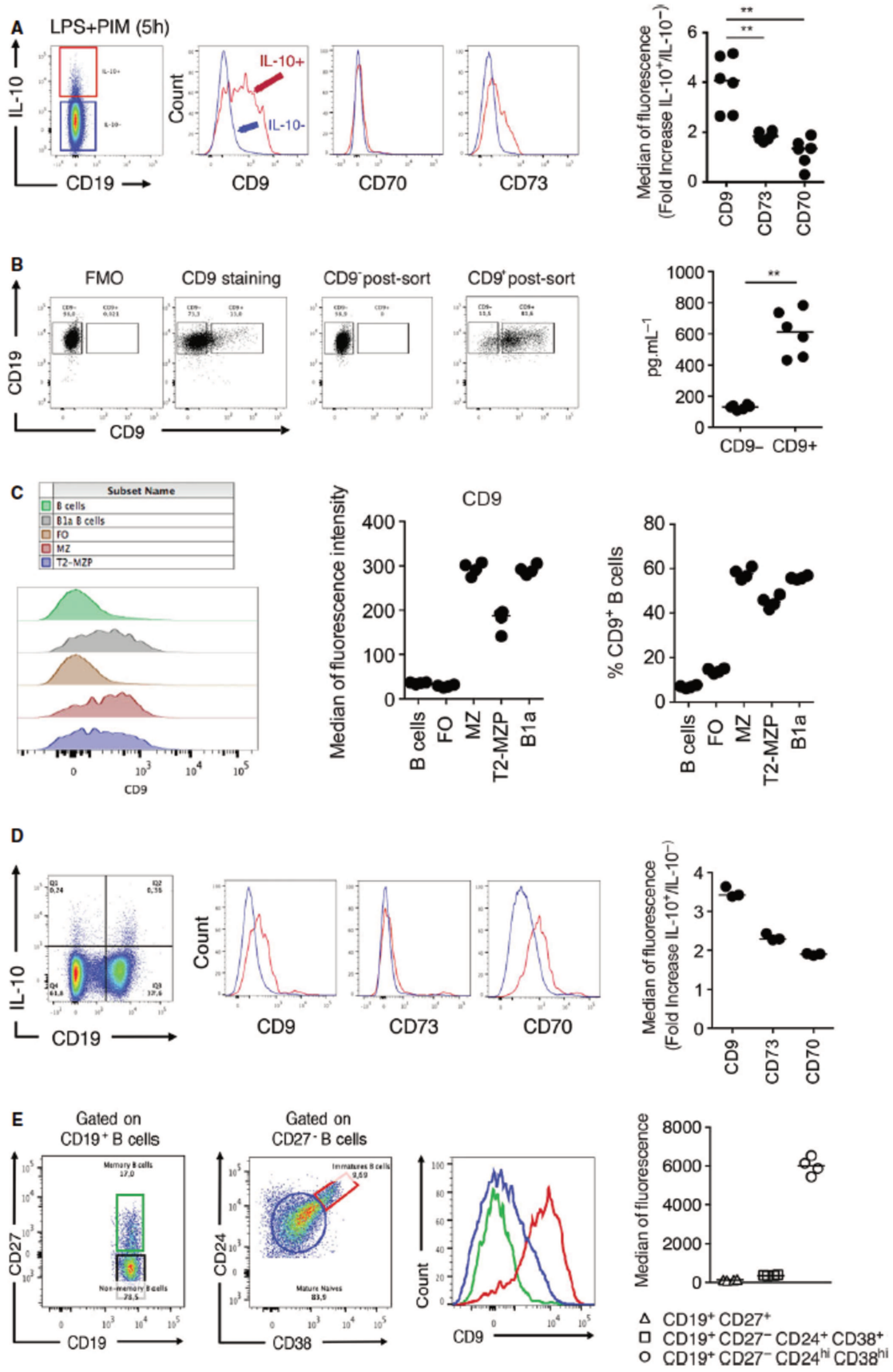

A
LPS+PIM (5h)
IL-10
CD19
Count
IL-10+
IL-10-
CD9
CD70
CD73
Median of fluorescence (Fold Increase IL-10⁺/IL-10⁻)
**
**
CD9
CD73
CD70
B
FMO
CD9 staining
CD9⁻ post-sort
CD9⁺ post-sort
CD19
CD9
pg.mL⁻¹
**
CD9– CD9+
C
Subset Name
B cells
B1a B cells
FO
MZ
T2-MZP
CD9
Median of fluorescence intensity
B cells
FO
MZ
T2-MZP
B1a
% CD9⁺ B cells
D
IL-10
CD19
Count
CD9
CD73
CD70
Median of fluorescence (Fold Increase IL-10⁺/IL-10⁻)
E
Gated on CD19⁺ B cells
Gated on CD27⁻ B cells
CD27
CD19
CD24
CD38
Count
CD9
Median of fluorescence
CD19⁺ CD27⁺
CD19⁺ CD27⁻ CD24⁺ CD38⁺
CD19⁺ CD27⁻ CD24^hi CD38^hi

Figure 4 CD9 is a specific marker of Bregs. (A) Protein expression of CD9, CD73, and CD70 in spleen IL-10$^+$ B cells (relative to IL-10$^-$ cells) after 5 h of activation with LPS + PIM. (B) Sorted CD9$^+$ and CD9$^-$ B cells were stimulated for 48 h with CD40 agonist and with LPS + PIM for the last 5 h, and then, the IL-10 levels were measured in the supernatants by ELISA. (C) Expression of CD9 in spleen B-cell subsets. (D) Total lung cells were isolated from naïve BALB/c mice and stimulated for 5 h with LPS + PIM, and then the expression of CD9, CD70, and CD73 was quantified at the surface of IL-10$^+$ B cells. (E) Phenotype of human CD9-expressing B cells. $^{**}P < 0.01$.

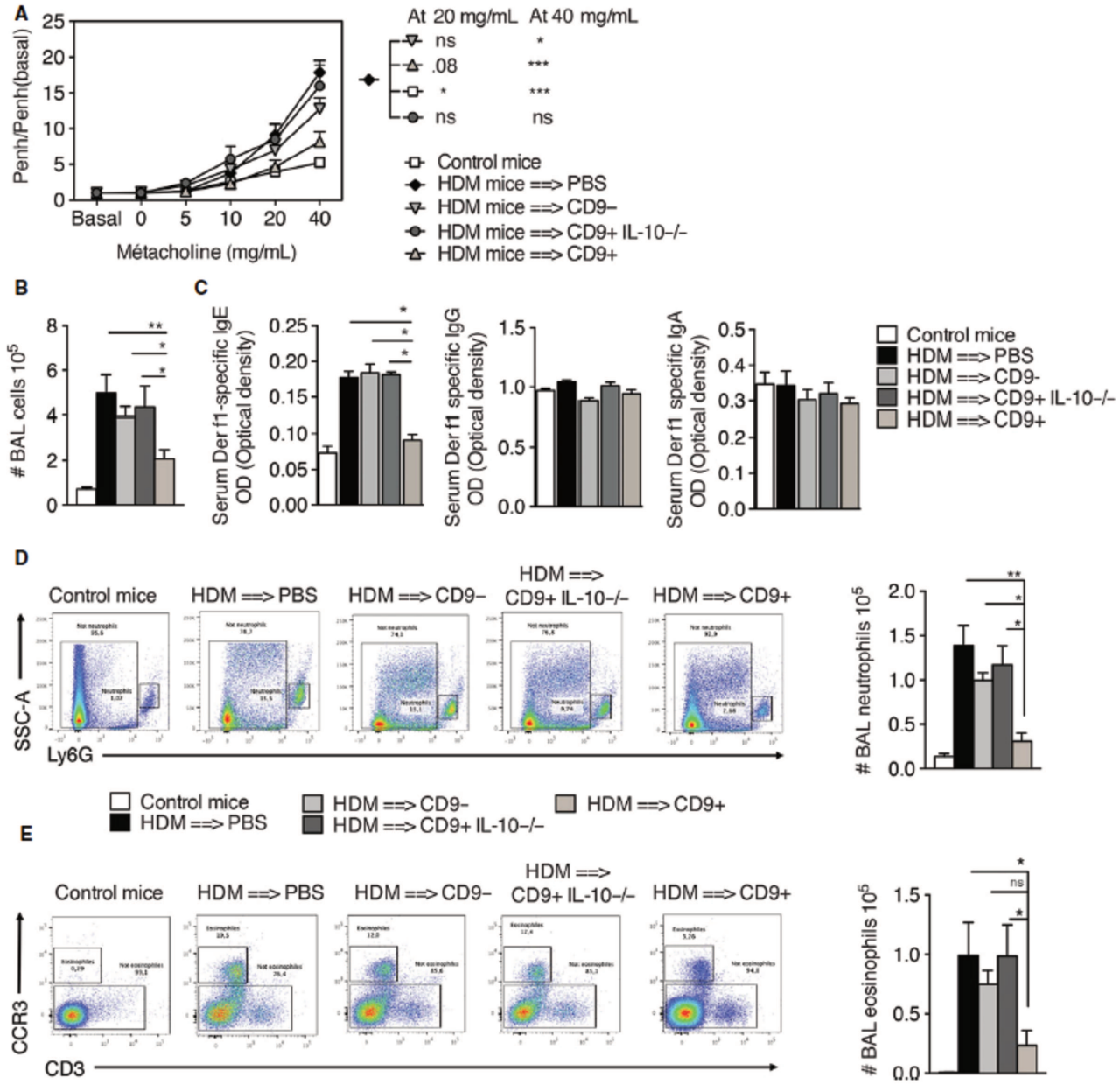


Figure 5 CD9$^+$ B cells control asthma exacerbation. (A) Penh values at day 35 after the adoptive transfer of B cells ($n = 5$–10 mice per group). (B) Total BAL cell counts after injection of CD9$^+$ regulatory B cells ($n = 5$–10 mice per group). (C) Levels of Der f1-specific IgG, IgA, and IgG in the sera of mice ($n = 5$ by groups). (D) Neutrophil, and (E) eosinophil BAL cell counts after injection of B-cell subsets ($n = 5$–10 mice per group) $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

challenge in CD9$^+$ recipient mice (Fig. 6D). Interestingly, level of IL-10 was increased in the BAL of CD9$^+$ recipient supporting a local release of this cytokine after Breg transfer (Fig. 6E).

Given the intimate link between Tregs and Bregs (5, 8) and the potent role of Tregs in asthma (21), we investigated whether injection of CD9$^+$ Bregs promoted the expansion of Tregs in the lung mucosa. As shown in

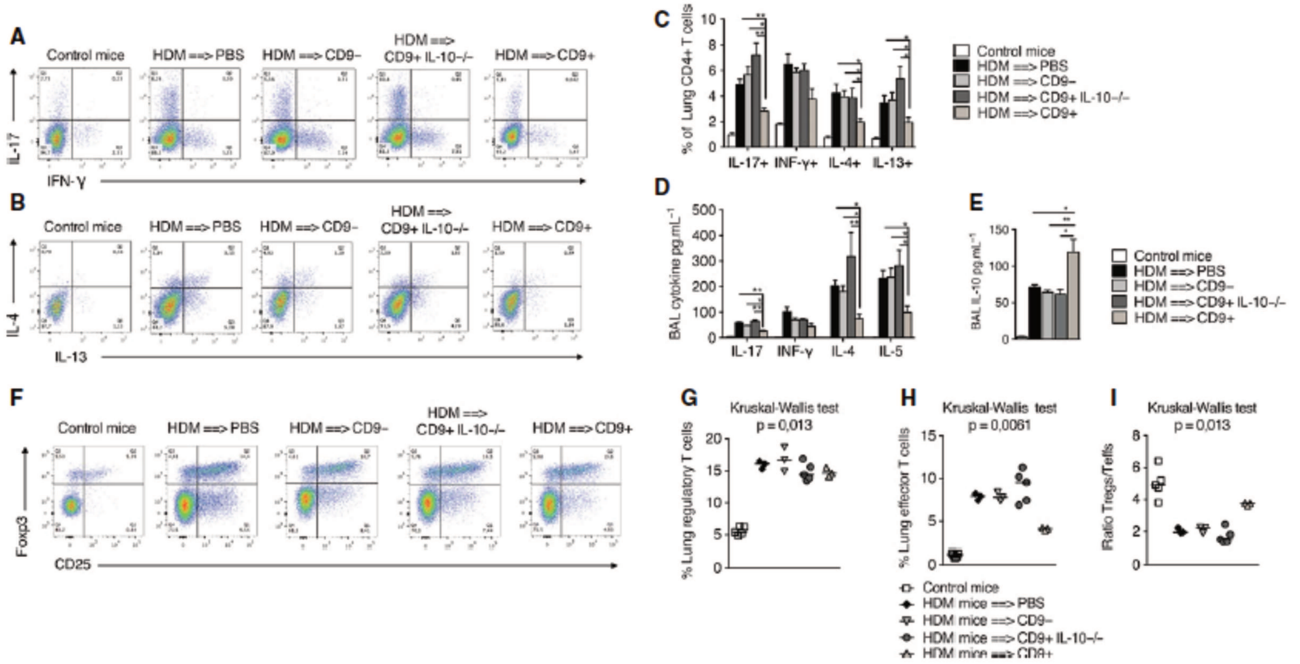


Figure 6 Adoptive transfer of CD9⁺ B cells influences airway inflammatory T-cell responses. (A–D) Quantification T_H2 and T_H17 responses after supplementation with CD9⁺ B cells by flow cytometry in lung and multiplex technologies in BAL (n = 5–10 mice per group). (E) Quantification of IL-10 in BAL of mice after supplementation with CD9⁺ B cells (n = 5–10 mice per group). (F–I) Frequency of regulatory T cells and effector T cells and the regulatory T-cell: effector T-cell ratio in the lungs of control mice and asthmatic mice injected with CD9⁺ B cells, CD9⁻ B cells, or CD9⁺ IL-10$^{-/-}$ B cells. $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$; and ns, nonsignificant.

Fig. 6F,G, adoptive transfer of CD9⁺ Bregs did not affect the proportion of lung CD25⁺ Foxp3⁺ Tregs. Consistent with our findings, we found a decreased frequency of CD25⁺ Foxp3⁻ effector T cells (Teff) after injection of CD9⁺ B cells, resulting in a higher Treg/Teff cell ratio (Fig. 6H,I). These data confirm that CD9⁺ Breg cells prevent the development of asthma by inhibiting allergic airway inflammation via IL-10-dependent mechanisms. Finally, by increasing the Treg/Teff ratio, injection of CD9⁺ Bregs is likely to contribute to immunological tolerance in allergic airway inflammation.

Discussion

The delicate balance between allergen-induced inflammation and tolerance is crucial for the management of exacerbated inflammatory responses in allergic diseases (22). Tregs have been extensively described as key protective cells against the development of these pathologies (22). However, a major role for IL-10-producing Bregs has also been recently reported in the control of exacerbated inflammation in different animal models as well as humans and uncontrolled inflammation can arise from a Breg deficit (3, 4). Notably, allergen immunotherapy using bee venom (11) or casein (10) was shown to promote the generation of IL-10⁺ Bregs, thus ensuring the establishment of allergen tolerance. Here, our results demonstrate that Bregs were less prevalent in lungs of mice after allergen exposure confirming that the development of asthma alters the homeostasis of IL-10⁺ regulatory B cells. Similar results have recently been reported in the context of allergy, in which patients displayed altered Breg functions and a lower frequency of IL-10-secreting B cells when compared to healthy volunteers or allergen-tolerant patients (9, 10). In contrast, we found that exposure to HDM preferentially induced the expression of inflammatory cytokines by B cells. In particular, we detected elevated IL-4 and IL-6 mRNA levels in the lung B cells of allergic mice. These findings fit perfectly with data obtained in experimental autoimmune encephalitis (EAE) and diabetes mouse models, demonstrating a key role for inflammatory B cells in the development of the pathology and maintenance of T-cell-mediated inflammation (23–26). The ability of B cells to preferentially produce inflammatory cytokines under pathogenic conditions suggests that pathogenic B cells and Breg responses might be generated with different kinetics and under specific conditions (23, 25, 26). Future investigations should assess why allergic inflammation alters the differentiation of Bregs and rather favors the emergence of inflammatory B cells. This would give very interesting findings concerning the biology of B cells in allergy.

Contrary to regulatory T cells (Tregs), a definitive characterization of Bregs still remains elusive (3, 4). No specific markers or transcriptional factors permit to characterize these cells, in rodents or in humans. In mice, IL-10⁺ Bregs have been associated with many phenotypes (15, 16, 27–29). Our microarray and flow cytometric analysis allowed us to identify new surface markers that were significantly and differentially expressed on IL-10⁺ B cells. In particular, we demonstrated that the expression of CD9 was sufficient to

identify the majority of IL-10$^+$ Bregs in both spleen and lungs of animals. Interestingly, the expression of this molecule was upregulated at the surface of human CD24^{hi} CD38^{hi} immature B cells, a Breg subset described for its capacity to inhibit T-cell-mediated inflammation and induce Tregs *in vitro* (18–20). This supports the idea that CD9 may be used to identify Bregs both in mice and humans.

CD9 is a tetraspanin molecule involved in the enhancement and maintenance of IL-10 secretion in murine and human antigen-presenting cells (30, 31), most likely by enhancing calcium signaling (32), an important pathway for Breg generation (33). CD9 knockout mice do not display abnormalities in their B-cell compartments (34). As previously described, we showed that this marker was essentially expressed at the surface of B1a, T2-MZP, and MZ B cells (35). All of these B-cell subsets have been described to be regulatory (4, 17). Consequently, the expression of CD9 is a good tool to purify B-cell subsets displaying potent regulatory functions in mice (4).

The existence of CD9$^+$ IL-10$^+$ B cells has already been demonstrated in mice (36). However, no data regarding their regulatory capacities have yet been reported. Herein, we establish for the first time a role for CD9$^+$ Bregs in the regulation of allergic asthma inflammation by demonstrating that injection of CD9$^+$ B cells altered the course of HDM-induced airway inflammation and bronchial hyper-reactivity. We showed that injected CD9$^+$ B cells home to the lungs and constrain T_H2- and T_H17-driven inflammation. These results are in accordance with previously published data in humans and mice demonstrating that IL-10-producing Bregs can inhibit T_H17- (20, 37) and T_H2-mediated inflammation (8). The ability of Bregs to inhibit IL-17-producing T cell is of particular interest given the suspected role of IL-17 in severe asthma (12, 38). Administration of splenic CD9$^+$ B cells from IL-10$^{-/-}$ mice did not regulate the asthmatic response mediated by HDM, demonstrating the IL-10-dependent mechanism of CD9$^+$ Bregs *in vivo*. As IL-10 is absolutely required to dampen allergic inflammation at mucosal surfaces such as the gut or lungs (21), our results support an important role for Bregs in allergic diseases.

IL-10-producing Bregs can mediate many immune regulatory mechanisms (3, 4). For example, several studies have demonstrated that IL-10-producing B cells are important for the generation or maintenance of Foxp3 Tregs (5, 8). In our study, the injection of Bregs did not influence Tregs in the lungs. Instead, the Bregs controlled T-cell activation, restoring a favorable immunological balance and most likely leading to less severe inflammation. Similar findings have also supported the idea that IL-10$^+$ Bregs are not necessary for the induction of Tregs (26, 39). However, we cannot exclude here the induction of type-1 regulatory T cells as we observed increased levels of IL-10 in the BAL of CD9$^+$ recipient mice. Additionally, Bregs can limit the maturation of antigen-presenting cells and influence the antigen presentation to T cells by inhibiting of MHC-II and costimulatory molecules (29, 40, 41). Moreover, IL-10-secreting B cells can inhibit the production of IL-6 and IL-23 by dendritic cells *in vitro*, which might explain how Bregs can reduce T_H17 responses *in vivo* (42). Nevertheless, how Bregs regulate T_H2 responses is less clear. Indeed, T_H2 cells might be induced independently of dendritic cells via basophil-dependent or innate lymphoid cell-dependent mechanisms (43). IL-10-producing B cells might therefore regulate T_H2 immunity by acting on other immune components besides dendritic cells.

In conclusion, our data show how the development of asthma modulates the profile of B cells, with a notable alteration of the Breg pool. We identify the CD9 protein as interesting marker to purify both mouse and human Bregs. The ability of Bregs to normalize lung function and airway inflammation points to these cells as an interesting target in allergic diseases. Also, our results emphasize the importance of B cells in asthma, not only as IgE producers but also as suppressive cells able to constrain the pathological process.

Acknowledgments

F.B. and J.C. were supported by a French Research Ministry grant. This work was supported by grants from the Pays de la Loire Region, the Fondation Recherche Médicale, the Société Française d'Allergologie, Fonds de Recherche en Santé Respiratoire des Pays de La Loire, a CENTAURE foundation grant, Agence de la Biomédecine Française (ABM) grant, and a IHU-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. The authors thank the Cytocell platform of Nantes, especially Juliette Desfrançois, for assistance with the flow cytometry data. The authors are also grateful to the members of *UTE* IRT-UN animal facility.

Author contributions

F.B. and J.C., performed experiments, analyzed data, and wrote the study. M.D., C.B., S.D., G.M., and M-A.C. gave support to experiments and analyzed data. A.M. and S.B. designed the study and wrote the study.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Exposure to HDM induces mixed inflammation in the lungs of mice

Figure S2. Accumulation of memory and germincal center B cells in lungs of asthmatic mice.

Figure S3. Expansion and sorting of IL-10 producing B cells.

Figure S4. Frequency of IL-10 secreting cells in CD9+ B cells.

Figure S5. Gating strategy to identify spleen B cell subsets.

Figure S6. Adoptive transfer of CD9$^+$ B cells.

Table S1. Log10 IL-10+/10- producing B cells from HDM mice

Appendix S1. Supplemental methods.

References

1. Dullaers M, De Bruyne R, Ramadani F, Gould HJ, Gevaert P, Lambrecht BN. The who, where, and when of IgE in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**129**:635–645.
2. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**:236–247.
3. Candando KM, Lykken JM, Tedder TF. B10 cell regulation of health and disease. *Immunol Rev* 2014;**259**:259–272.
4. Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. *Allergy* 2014; **69**:1454–1463.
5. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Munoz-Suano A, Kamanaka M et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol* 2011;**186**:5569–5579.
6. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 2002;**3**:944–950.
7. Jin G, Hamaguchi Y, Matsushita T, Hasegawa M, Le Huu D, Ishiura N et al. B-cell linker protein expression contributes to controlling allergic and autoimmune diseases by mediating IL-10 production in regulatory B cells. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1674–1682.
8. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 2010;**125**:1114–1124.
9. van der Vlugt LE, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhan A, Lievers E, Gloudemans AK, Liu KY et al. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS ONE* 2012;**7**:e30883.
10. Noh J, Lee JH, Noh G, Bang SY, Kim HS, Choi WS et al. Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br 1) in Cow Milk Allergy. *Cell Immunol* 2010;**264**:143–149.
11. van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Sollner S, Akdis DG et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2013;**131**:1204–1212.
12. Chesne J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant MA, Loy J et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**35**:1643.
13. Matsushita T, Tedder TF. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol Biol* 2011;**677**:99–111.
14. Bihouee T, Bouchaud G, Chesne J, Lair D, Rolland-Debord C, Braza F et al. Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respir Res* 2014;**15**:142.
15. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR et al. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* 2007;**178**:7868–7878.
16. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008;**28**:639–650.
17. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:221–241.
18. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010;**32**:129–140.
19. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *J Am Soc Nephrol* 2014;**25**:1575–1585.
20. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA et al. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013;**5**:173ra23.
21. Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009;**31**:438–449.
22. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:621–631.
23. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012;**209**:1001–1010.
24. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* 2013;**210**:2921–2937.
25. DeFuria J, Belkina AC, Jagannathan-Bogdan M, Snyder-Cappione J, Carr JD, Nersesova YR et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;**110**:5133–5138.
26. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* 2008;**118**:3420–3430.
27. Ding Q, Yeung M, Camirand G, Zeng Q, Akiba H, Yagita H et al. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J Clin Invest* 2011;**121**:3645–3656.
28. Maseda D, Candando KM, Smith SH, Kalampokis I, Weaver CT, Plevy SE et al. Peritoneal cavity regulatory B cells (B10 cells) modulate IFN-gamma+CD4+ T cell numbers during colitis development in mice. *J Immunol* 2013;**191**:2780–2795.
29. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H et al. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 2014;**41**:1040–1051.
30. Ha CT, Waterhouse R, Wessells J, Wu JA, Dveksler GS. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1. *J Leukoc Biol* 2005;**77**:948–957.
31. Peng WM, Yu CF, Kolanus W, Mazzocca A, Bieber T, Kraft S et al. Tetraspanins CD9 and CD81 are molecular partners of trimeric FcvarepsilonRI on human antigen-presenting cells. *Allergy* 2011;**66**:605–611.
32. Halova I, Draberova L, Bambouskova M, Machyna M, Stegurova L, Smrz D et al. Cross-talk between tetraspanin CD9 and transmembrane adaptor protein non-T cell activation linker (NTAL) in mast cell activation and chemotaxis. *J Biol Chem* 2013;**288**:9801–9814.
33. Matsumoto M, Fujii Y, Baba A, Hikida M, Kurosaki T, Baba Y. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity* 2011;**34**:703–714.
34. Cariappa A, Shoham T, Liu H, Levy S, Boucheix C, Pillai S. The CD9 tetraspanin is not required for the development of peripheral B cells or for humoral immunity. *J Immunol* 2005;**175**:2925–2930.
35. Won W-JJ, Kearney JF. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J Immunol* 2002;**168**:5605–5611.

36. Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Zamorano PI, Sadir AM, Geffner JR et al. The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. *J Virol* 2007;**81**:9357–9367.
37. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012;**491**:264–268.
38. Chesne J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in severe asthma: where do we stand? *Am J Respir Crit Care Med* 2014;**190**:1094–1101.
39. Hoehlig K, Shen P, Lampropoulou V, Roch T, Malissen B, O'Connor R et al. Activation of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells proceeds normally in the absence of B cells during EAE. *Eur J Immunol* 2012;**42**:1164–1173.
40. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 2008;**223**:114–131.
41. Matsushita T, Horikawa M, Iwata Y, Tedder TF. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J Immunol* 2010;**185**:2240–2252.
42. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Calderon Gomez E, Sweenie CH et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* 2008;**180**:4763–4773.
43. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 2010;**10**:225–235.

B. Article n°6

Les lymphocytes B régulateurs CD9+ induisent l'apoptose des cellules T effectrices : une nouvelle stratégie thérapeutique pour l'asthme sévère

CD9+ Regulatory B Cells Induce Effector T Cell Apoptosis: a New Therapeutic Strategy For Severe Asthma

C. Brosseau, M. Durand, L. Colas, E. Durand, A. Foureau, M.A. Cheminant, G ; Bouchaud, L. Castan, M. Klein, A. Magnan, S. Brouard.

(Soumis)

Contexte : Un défaut dans la proportion de lymphocytes B régulateurs CD9+ sécréteurs d'IL-10 est associée à une augmentation de l'inflammation et de l'hyperréactivité des voies bronchiques dans un modèle murin d'asthme allergique. Dans ce même modèle, l'ensemble des caractéristiques pathologiques de l'asthme allergique peuvent être limitées par le transfert adoptif de lymphocytes B CD9+. Nous avons donc cherché à identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les capacité immunorégulatrices des lymphocytes B CD9+ chez la souris, ainsi que leur profil moléculaire chez l'Homme, à l'aide d'échantillons de sang périphérique de patients atteints d'asthme allergique sévère.
Méthodes : L'effet des lymphocytes B CD9+ sur la mort, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la dépolarisation mitochondriale des lymphocytes T effecteurs a été étudié par analyse des marquages Yellow Dye, Iodure du propidium, Annexine V et JC-1 après co-culture. Le clivage des caspases et l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ont été analysés par Western Blot. Enfin, nous avons réalisé un phénotypage des sous-population lymphocytaires B circulantes chez les patients asthmatiques sévère.
Résultats : Chez la souris, les lymphocytes B CD9+ inhibent la prolifération lymphocytaire T avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, et induisent l'apoptose IL-10 dépendante des lymphocytes T effecteurs via les voies extrinsèque et intrinsèque. Ces lymphocytes B CD9+ sécréteurs d'IL-10 induisent l'expression de molécules pro-apoptotiques pas les lymphocytes T effecteurs et préviennent l'expression des molécule anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ces résultats mis en évidence chez la souris sont aussi observés chez l'Homme. De plus, un défaut dans la proportion de ces cellules lymphocytaires B CD9+ circulantes est observé chez les patients atteints d'asthme allergique sévère.
Conclusion : Les lymphocytes B CD9+ induisent l'apoptose des lymphocytes T via la sécrétion d'IL-10 à la fois chez l'Homme et chez la souris. Le défaut en lymphocytes B CD9+ observé chez les patients atteints d'asthme allergique sévère suggèrent un rôle potentiel de ces cellules comme nouvelles cible thérapeutique.

CD9+ Regulatory B Cells Induce Effector T Cell Apoptosis: a New Therapeutic Strategy For Severe Asthma

Carole Brosseau[1-4], Maxim Durand[1,2,5], Luc Colas[1,2,4,5], Eugénie Durand[1,2], Aurore Foureau[3,4], Marie-Aude Cheminant[3], Gregory Bouchaud[3,6], Laure Castan[3,5,6], Martin Klein[3,5], Antoine Magnan[3,4$], Sophie Brouard[1,2,7$*]

1 Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France
2 Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France
3 Institut du thorax, Inserm UMR 1087, CNRS UMR 6291, Université de Nantes, Nantes, France
4 Institut du thorax, CHU de Nantes, Nantes, France
5 Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France
6 INRA Centre Angers-Nantes, Nantes, France
7 Centre d'Investigation Clinique (CIC) Biothérapie, CHU Nantes, Nantes, France

$ Last authors contributed equally to this work.

Corresponding author
* Sophie BROUARD, DVM, PhD. Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France. Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France. 30, Boulevard Jean-Monnet, 44093 Nantes CEDEX 1, France. Phone : +33 2 40 08 78 42, Mail : sophie.brouard@univ-nantes.fr.

Running title: CD9+ Breg induce T cell apoptosis via IL-10

ABSTRACT

Background: Functional impairment or defects in CD9+ IL-10-secreting regulatory B cells is associated with enhanced asthma-like inflammation and airway hyperresponsiveness. In mouse models, all asthma-related features can be abrogated by CD9+ B cell adoptive transfer. We aimed to decipher the molecular mechanisms of the regulatory properties of CD9+ B cells in mouse models, and their molecular profile in a cohort of severe asthmatic human patients.

Methods: The effects of CD9+ B cells on effector T cell death, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial depolarization were determined by Yellow Dye, propidium iodide, Annexin V and JC-1 staining. Caspase cleavage and expression of the pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family were analyzed by western blotting. Blood cells from severe asthmatic patients were analyzed by flow cytometry.

Results: Mouse CD9+ B cells inhibit T cell proliferation with a cell cycle arrest in sub G0/G1, and induce T cell apoptosis via IL-10 through both intrinsic and extrinsic pathways as illustrated by the mitochondrial depolarization and cleavage of caspase 8 and 9. CD9+ B cells induce expression of pro-apoptotic molecules and prevent expression of Bcl-2 family anti- apoptotic molecules. Similar results were observed in humans where severe asthma was associated with a lack of peripheral CD9+ B cells.

Conclusion: CD9+ B cells induce effector T cell apoptosis via IL-10 secretion in both mice and humans. Defects in CD9+ B cells in blood from patients with severe asthma highlights their potential role as a new therapeutic target.

Keywords: Regulatory B cells, CD9+ B cells, severe asthma, apoptosis, effector T cells

INTRODUCTION

Beyond their capacity to secrete antibodies, B cells are also able to produce cytokines1, to express major histocompatibility complex and co-stimulatory molecules2, to present antigens3 and to regulate T-cell-mediated immune responses4. Depending on the specific B cell subset, they may promote, enhance and/or regulate inflammation depending on the pro- and anti-inflammatory cytokines secreted, the balance of which influences the immune response4. It is now well established that specific subtypes of B cells are involved in the maintenance of homeostasis of the immune system and regulate inflammation in pathological situations5,6. Also called regulatory B cells (Breg), these cells have immunosuppressive properties and are associated with a state of tolerance in transplantation7-12 and their functional impairment is associated with exacerbated and/or persistent autoimmune processes 13-17. Allergic patients display a lower frequency of IL-10-secreting B cells with altered function when compared to healthy volunteers or allergen-tolerant patients18,19. Patients with allergic asthma harbor a defective expansion of IL-10–producing B cells in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation, and a weaker IL-10 response to house dust mite allergen–activated T cells20-22. Whilst the presence and role of Bregs are clearly evidenced in different models and pathologies, their full molecular characterization remains elusive, primarily because no specific markers or transcription factors have been identified in rodents and humans23. To date, the most commonly admitted marker is IL-10 secretion13,23. We previously demonstrated that murine IL-10+ Bregs were enriched in a CD9+ B cell subset24. This was confirmed by others25-27, and CD9 thus appears to be a reliable marker for defining both mouse and human Bregs. CD9+ B cells are decreased in the spleen and lungs of asthmatic mice and adoptive transfer of CD9+ B cells alone is sufficient to abrogate asthma in an IL-10-dependent manner24. Finally, we showed in humans that expression of CD9 is dramatically increased at the surface of CD24hiCD38hi immature B cells, thus defining an important IL-10 Breg subset24. Whilst these results emphasize a role of CD9+ B cells in asthma, their full regulatory mechanisms remain unknown. In this study, we demonstrate that CD9+ B cells induce effector T cell apoptosis via the secretion of IL-10. Proliferation of T cells is blocked at the sub G0/G1 cell cycle phase leading to activation of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. We also show for the first time in humans, that CD9+ B cells elicit regulatory properties through IL-10 secretion, and demonstrate decreased levels of transitional CD24hiCD38hi and CD9+ B cells in the blood of severe asthmatic patients. These data reveal a new insight on the lack of regulation of inflammation in these patients and open the way to potential novel therapies.

RESULTS

CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell cycle arrest in sub G0/G1 and cell death

We previously reported that CD9+ B cells block CD3+CD4+CD25- effector T cell proliferation in an IL-10-dependent manner24. In order to further decipher the mechanisms of regulation of these cells, we analyzed their effect on effector T cell death. Splenic CD19+CD9- or CD19+CD9+ B cells from wild-type BALB-c mice were activated for 48h with anti- CD40/LPS. CD3+CD4+CD25- effector T cells were activated for 48h with IL-2. CD19+CD9- or CD19+CD9+ B cells were then co-cultured with CD3+CD4+CD25- effector T cells at different ratios. At 1:1 and 1:2 CD3+CD4+CD25- effector T cell/CD19+ B cell ratios, the percentage of yellow dye positive CD3+CD4+CD25- effector T cells was significantly higher when co-cultured with CD19+CD9+ B cells than when co-cultured with or without CD19+CD9- B cells (27.8%±1.24 and 40.2%±4.28 for T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells and 14.4%±1.4 and 16.7%±1.7 for T cells alone respectively; $p<0.001$) (Figure 1A). No significant difference was observed when CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured with or without CD19+CD9- B cells at any ratios. Moreover, CD19+CD9+ B cells but not CD19+CD9- B cells induced significant CD3+CD4+CD25- effector T cell cycle arrest in sub G0/G1 as shown by propidium iodide staining (37.8%±4.28 and 20.2%±3.29 for T cells co- cultured with CD19+CD9+ B cells and T cells co-cultured with CD19+CD9- B cells respectively; $p<0.01$) (figure 1B-C). No difference was observed when T cells were co-cultured with or without CD19+CD9- B cells. Overall, these data show that CD19+CD9+ B cells but not CD19+CD9- B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell cycle arrest in sub G0/G1 and result in cell death.

CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell apoptosis

Cells having reduced DNA content is characteristic of apoptotic cells28. Activated CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured with CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells for 48 hours and then stained with Annexin V (Figure 2A). The percentage of Annexin V positive CD3+CD4+CD25- effector T cells was significantly higher when co-cultured with CD19+CD9+ B cells compared to T cells alone (42.1%±5.5 vs 18.6%±3.3 respectively; $p<0.001$), whereas no difference was observed for T cells cultured alone compared to T cells co-cultured with CD19+CD9- B cells (18.6%±3.3 vs 21%±6.5 respectively; non-significant (ns)) (Figure 2B). Treatment with Z-VAD, a specific inhibitor of apoptotic cell death, blocked T cell apoptosis induced by CD19+CD9+ B cells (18.8%±5.6; $p<0.01$ compared to T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells) whereas treatment with Necrostatin-1, a specific inhibitor of necroptosis, had no effect (36.8%±4.3; ns compared T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells). This shows that CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell death by apoptosis.

CD19+CD9+ B cells induce apoptosis of CD3+CD4+CD25- effector T cells by both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways

Caspase 8 and 9 cleavage is characteristic of activation of the extrinsic and intrinsic pathway respectively. We assessed CD3+CD4+CD25- effector T cells by western-blotting after co-culture with or without CD19+CD9+ B cells (Figure 3A). Both caspase 8 and 9 were cleaved when CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured with CD19+CD9+ B cells. This correlates with the cleavage and activation of the pro-apoptotic protein Bid, and links the intrinsic and extrinsic pathways. Finally, both caspase 8 and 9 cleaved/uncleaved ratios were higher when CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured with CD19+CD9+ B cells than with or without CD19+CD9- B cells (data not shown). To further analyze the role of the apoptotic intrinsic pathway in this cell death process, the expression of other Bcl-2 family members were assessed. The pro-apoptotic member Bax was overexpressed and the anti-apoptotic member Bcl-2 was less expressed in CD3+CD4+CD25- effector T cells when co-cultured with CD19+CD9+ B cells compared with T cells alone. The other Bcl-2 family members, Mcl-1, Bcl-XL, Bak, Bik, Noxa, Puma, were not detected. Finally, the significantly higher percentage of monomeric JC-1 in CD3+CD4+CD25- effector T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells confirmed mitochondrial depolarization of T cells and activation of the intrinsic pathway of apoptosis (43.6%±2.7 vs 30.4%±1; $p<0.05$) (Figure 3B). Altogether these data show that CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell apoptosis by both extrinsic and intrinsic pathways.

CD19+CD9+ B cells induce MAPK phosphorylation in CD3+CD4+CD25- effector T cells

To determine the molecular pathways activated upstream of the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by CD19+CD9+ B cells, we analyzed by cytometry the phosphorylation levels of the MAPK p38, extracellular signal–regulated kinases (ERK1/2) and c-Jun N- terminal kinases (JNK), transcription factors which are known to be major activators of apoptosis29,30, in CD3+CD4+CD25- effector T cells after co-culture with or without CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells. Only CD19+CD9+ B cells but not CD19+CD9- B cells induced phosphorylation of p38, JNK and ERK1/2 in CD3+CD4+CD25- effector T cells (Figure 4A).

Induction of T cell apoptosis by CD19+CD9+ B cells is dependent of IL-10 secretion

To determine if direct B cell-T cell ligation was necessary for CD19+CD9+ B cells to induce T cell apoptosis, CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured with CD19+CD9+ B cells in classical or transwell plate assays (Figure 4B). CD19+CD9+ B cells induced T cell death in both situations (44%±4.1 vs 40%±2 with and without transwell respectively, ns). T cell death induced by CD19+CD9+ B cells was not affected when co-culture was performed in the presence of anti-TGF-β (40%±2 vs 33.8%±3.6 with or without anti-TGF-β respectively, ns). In

contrast, anti-IL-10 prevented T cell death induced by CD19+CD9+ B cells and fully restored T cell viability (17.2%±1.9 vs 17.6%±4.1 for T cells alone and T cell co-cultures with CD19+CD9+ B cells/anti-IL-10 respectively, ns). In summary, these data show that T cell-B cell contact is not necessary for T cell apoptosis induction by CD19+CD9+ B cells and that apoptosis induction is dependent on IL-10.

Asthmatic mice lack CD19+CD9+ B cells

To decipher the role of CD19+CD9+ B cells in inflammatory conditions, induction of allergic asthma was performed in a mouse model using House Dust Mite (HDM) as previously described28 and summarized in Figure 5A. The percentage of CD19+CD9+ B cells was estimated in the spleen and the lungs of control and asthmatic mice using flow-cytometry (Figure 5B). Asthmatic mice have significantly reduced CD19+CD9+ B cells in the spleen and the lungs compared to control mice (4.5%±0.3 and 3.1%±0.2 vs 7.8%±0.7 and 6.8%±1 in the spleen and the lung of asthmatic and control mice respectively, $p<0.05$). We then analyzed the effects of CD19+CD9+ B cells from asthmatic and wild type control mice on CD3+CD4+CD25- effector T cell death in 48h co-cultures as described above (Figure 5C). No significant difference was observed for the percentage of Annexin V positive T cells when co- cultured with CD19+CD9+ B cells from asthmatic mice or controls (T cells alone: 22.1%±3.1 vs 28.3%±3.4; T cell co-cultures with CD19+CD9+ B cells: 44.5%±3.8 vs 49.6%±6; T cells co-cultured with CD19+CD9- B cells: 25.3%±2.5 vs 28.3%±5.6 in control and asthmatic mice respectively, ns). These data show that although asthmatic mice lack CD19+CD9+ B cells these CD19+CD9+ B cells display no defect in their capacity to induce T cell apoptosis.

Human CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell apoptosis via IL-10

To determine if the regulatory effect of CD19+CD9+ B cells was similar in mouse and human, CD19+CD9- B cells, CD19+CD9+ B cells and CD3+CD4+CD25- effector T cells were sorted from PBMC from 9 healthy volunteers free from asthma, allergies, atopic dermatitis and any other inflammatory diseases. Cells were activated for 48h (anti-CD40 + CpG for CD19+CD9- and CD19+CD9+B cells and IL-2 for CD3+CD4+CD25- effector T cells) as previously described above. CD3+CD4+CD25- effector T cells were co-cultured for 48h with CD19+CD9- B cells or CD19+CD9+ B cells at ratios 1:1 or alone as controls. The percentage of apoptotic T cells was analyzed by Annexin V staining (Figure 6). As for mice, human CD19+CD9+ B cells, but not CD19+CD9- B cells induced apoptosis of T cells (2.8%± 0.8 for T cells alone, 14.3%±1.7 for T cell co-cultures with CD19+CD9- B cells and 21.4%±2.7 for T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells; T cells alone vs T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells = $p<0.001$). Treatment with anti-IL-10 abrogated apoptosis induced by human T cells (15.7%±1.1; T cells alone vs T cells co-cultured with CD19+CD9+ B cells/anti-IL-10 = $p<0.01$).

Altogether, these data show that, as in mouse, human CD19+CD9+ B cells induce CD3+CD4+CD25- effector T cell apoptosis via IL-10.

Patients displaying severe asthma harbor less CD19+CD9+ B cells

To validate in human the lack of CD19+CD9+ B cells observed in asthmatic mice, PBMCs from 9 severe asthmatic patients were analyzed by flow-cytometry. PBMCs from ten healthy volunteers (HV) were analyzed as controls. The frequencies of CD19+ B lymphocytes, CD19+CD27+ memory cells, CD19+CD27- naïve cells, CD19+CD24hiCD38hi transitional cells, CD19+CD24-CD38+ plasma cells and CD19+CD9+ B cells were assessed by flow-cytometry (gating strategy in sup 1). Importantly, the total CD19+ B cell frequency was not significantly different between HV and severe asthmatic patients (Figure 6) suggesting an absence of a systemic effect of the treatment. No significant difference was observed for naive, memory and plasma cell subtypes between the two groups. The frequencies of CD19+CD24hiCD38hi transitional and CD19+CD9+ B cells were however significantly lower in asthmatic patients compared with HV (2.9%±0.3 and 9.9% ± 1.3 vs 1.3% ± 0.2 and 1.8% ± 0.3, for HV and asthmatic patients respectively, $p<0.05$ and $p<0.01$). These data show that, as for asthmatic mice, patients with severe asthma lack CD19+CD9+ B cells.

DISCUSSION

The prevalence of allergic asthma has dramatically increased worldwide during the last decade. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways associated with airway hyper-responsiveness to inhaled allergens and deregulation of type 2 immunity31, however its pathogenesis is still not fully understood. Asthma is characterized by an expansion of CD4+ helper T lymphocytes (Th2, Th17), an increased production of Th2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-13), increased level of allergen specific immunoglobulin E (IgE), eosinophilia and inflammation of the airways32. Other T cells, including natural killer T cells, γδ T cells and CD8 T cells, have also been implicated in asthma, although their importance remains to be confirmed33. Several studies in both mice and humans have demonstrated a role for Breg cells in suppression and control of airway inflammation. Their number is a crucial determinant that clearly contributes to the regulation of the immune system and their deficiency in asthma is thus now well established6,16,20,21,34. The most commonly recovered marker of Breg cells is IL-10 secretion but other cytokines or molecules such as TGF-β, IL-35 and granzyme B have been shown to mediate regulatory properties on different immune cell targets1,8,10,22, and no exclusive cell surface marker has been evidenced for this population yet5,23. We previously reported that IL-10 secreting Bregs were enriched in a CD9+ B-cell subset that was decreased in asthmatic mice, and adoptive transfer of these CD9+ B cells alone was sufficient to abrogate asthma in an IL-10-dependent manner24. The ability of Bregs to normalize lung function and

airway inflammation and the notable alteration of this Breg pool in asthmatic mice points to these cells as an interesting target in allergic diseases. We also demonstrated that these cells regulate effector T cell proliferation but the mechanisms of such an effect were unknown. In this study, we demonstrate that CD9+ B cells induce death of effector T cells via intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in an IL-10 dependent manner. We also report for the first time in humans that CD9+ B cells display regulatory properties through IL-10 secretion and that severe asthmatic patients lack CD9+ B cells. CD9 is a tetraspanin molecule involved in a plethora of mechanisms including adhesion, migration, cell fusion and membrane signaling35,36. Interestingly CD9 is also involved in the enhancement and maintenance of IL-10 secretion in murine and human antigen-presenting cells37. We demonstrated that an IL10+ B cell population was enriched in a CD9+ B cell subset that was decreased in asthmatic mice24. Similar data were published by Sun and Matsushita who identified CD9 as a marker of murine IL-10 competent Bregs26-27. The PI3K-Akt pathway is essential for their development and is involved in their regulatory effects in a model of contact hypersensitivity27. These data confirmed the study of the group of Ostrowski in a model of foot-and-mouth disease virus-infected mice in which CD9+ B cells were the main source of splenic IL-1025. These data clearly point to CD9 not only as a potential biomarker of Bregs but also suggest a possible role for CD9+ B cells in asthma physiopathology, differing from the classical role of B cells as IgE producers. However, no mechanisms of action of CD9+ B cells have yet been reported.

The unique link between CD9 and asthma is related to the fact that some tetraspanins interact with tetrameric high-affinity IgE receptors (FcεRI) on effector cells37,38. This interaction is associated with negative regulation of FcεRI-mediated degranulation of mast cells that may at least in part explain their possible role in asthma. We suggest here another or complementary potential mechanism for CD9 Breg cells. We showed that CD9+ B cells induce T cell cycle arrest in sub G0/G1 leading to cell death of effector T cells by apoptosis via IL-10 secretion and activation of the MAPK pathway. Apoptosis is a physiologically programmed cell death that is also involved in defense mechanisms against damaged, stressed or stimulated cells by any agents, to prevent accumulation of non-functional cells in the tissues39. Apoptosis may be activated via two different pathways: the intrinsic and the extrinsic pathway40,41. After the activation of different signaling cascades, both pathways converge at the final caspase 3 activation step and commonly leads to cleavage of different proteins leading to cell death. The link between IL-10 and apoptosis is clear and our data are concordant with O'Farrell's data which reported that IL-10 increases expression of p19 to inhibit macrophage proliferation through cell cycle arrest implicating the p21–MAPK–p19 cascade42. IL-10 inhibits the proliferation of other cells with various other effects such as induction of endoplasmic reticulum stress43. In our experiments, CD9+ B cells did not induce cleavage of caspase 12 which is characteristic of endoplasmic reticulum stress (data not shown), nor necroptosis, as treatment

with necrostatin-1 did not abrogate T cell death.

The intrinsic apoptosis pathway is initiated by activation of the pro-apoptotic mediators Bax or Bak44, and is modulated by the Bcl-2 family members. To this end, these proteins have to be free from pro-survival members (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) thanks to the BH3-only subfamily members (Bad, Bim, Noxa, and Puma). Activation of pro-apoptotic Bax and Bak proteins leads to mitochondrial depolarization, release of cytochrome c and cleavage of caspase 9. The extrinsic pathway is activated when death receptors are ligated resulting in caspase 8 activation45. Caspase 8 can directly induce apoptosis or activate the intrinsic pathway by cleavage of Bid. Here, we report that CD9+ B cells induce T cell apoptosis by both extrinsic and intrinsic pathways, and involves caspases 8 and 9 and cleavage of the molecule Bid required for apoptosis activation. Activation of the intrinsic pathway in T cells by CD9+ Bregs was confirmed by mitochondrial depolarization, the overexpression of the pro-apoptotic molecule Bax and the down-regulation of the anti-apoptotic molecule Bcl-2. These data corroborate Bailey's results, which reported IL-10 as inducing apoptosis in mast cells and macrophages via the intrinsic cascade through mechanisms involving caspase 3 cleavage, mitochondrial depolarization and Bcl-2 modulation46. Surprisingly, when T cells are co-cultured with non-regulatory CD9- B cells, low levels of caspase 8 and 9 and Bid were cleaved (data not shown). This could explain the small but substantial number of apoptotic cells when compared with T cells alone. This low level of T cell death is more likely due to the fact that CD9 is a marker of enrichment of IL-10-secreting B cells and that few regulatory B cells may be found in the CD9- subset. We next confirmed that CD9+ B cells also exist in humans and show for the first time that they display the same suppressive properties as for mouse CD9+ B cells. CD9+ B cells from healthy volunteers induced apoptosis of autologous effector T cells in an IL-10-dependent manner. Finally, we report for the first time that CD19+CD24hiCD38hi transitional and CD9+ B cells, both known for their regulatory properties, are lacking in blood from severe asthmatic patients. There is evidence in different models that enhanced activity of Bregs producing IL-10 strongly suppresses inflammatory processes4-6,13-19, and the group of Van Der Vlugt reported that patients with allergic asthma displayed B cells with impaired regulatory activity20. In our severe asthmatic patients, the number of peripheral blood CD19+CD9+ B cells was too low to perform regulatory experiments or assess their function. Nevertheless, they secrete IL-10 and our data clearly shows that asthmatic mice lack CD19+CD9+ B cells whereas these cells display no functional defect. Furthermore, they are able to induce effector T cell apoptosis in the same manner as CD19+CD9+ B cells from wild type mice. Moreover, we also report here that our cohort of severe asthmatic patients not only have less CD19+CD24hiCD38hi/CD9+ B cells at basal levels between exacerbations, but also following acute inflammation events (data not shown) suggesting that even under a strong inflammatory environments, patients are not able to upregulate CD19+CD9+ Breg production.

These data suggest that restoration of a normal number of CD19+CD24hiCD38hi/CD9+ B cells may "correct" a potential defect and suggest that increasing Breg cells in allergic/asthmatic patients may be envisioned as a new therapeutic strategy. In mice, adoptive transfer of CD9+ B cells reverses asthma24 and adoptive transfer of CD1dhi Breg suppresses airway inflammation by inducing natural forkhead box protein 3-positive CD4+ regulatory T cell recruitment into the lungs16. Interestingly, parasites and infectious agents drive Breg expansion and have been proposed as a potential mechanism for reducing host immune responses18,48-50. The potential for use of helminth molecules as a new-anti-inflammatory therapy has been postulated, with the use of the worm's molecules to generate Breg cells50-51. Modulation of anti-inflammatory cytokines52, the possibility to expand Breg cells in vitro53 or strategies aimed at controlling signaling pathways in favor of in vivo Breg expansion54 are also under consideration. Compared with allergen specific immunotherapy or non-specific treatments, such strategies may offer the possibility for reduced treatment time and superior effects resulting from self-sustaining or induction of regulatory mechanisms, since targeting regulatory B cells may embrace other regulatory systems simultaneously, such as IL-10 producing regulatory T cells18.

In conclusion, our data are the first to identify CD9+ B cells as regulatory B cells and characterize the molecular mechanism of induction of effector T cell apoptosis both in mice and humans. The lack of CD19+CD9+ regulatory B cells in severe asthmatic patients suggests Bregs may be a major target for future therapeutic strategies. A better understanding of the immunological mechanisms underlying allergic diseases is essential for the development of new preventive and therapeutic Breg interventions.

MATERIALS AND METHODS

Cell sorting

Six week-old wild-type BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France). Splenic cells were isolated and stained with the following antibodies for cell sorting by flow cytometry: CD19-APC-H7 (1D3), CD9-BV421 (KMC8), CD4-FITC (GK1.5) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), CD3-APC (145-2C11), CD25-PE (PC61.5) (eBioscience, Paris, France). These markers were used to distinguish CD19+CD9- non-regulatory B cells, CD19+CD9+ regulatory B cells and CD3+CD4+CD25- effector T cells. Cells were sorted on a BD FACSARIA III (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France).

Cell activation, co-culture, and treatments

Mouse cells (1 million/ml) were cultured for 48h in RPMI-1640 medium with 10% fetal calf serum and 2mM glutamine. CD19+CD9- non-regulatory B cells or CD19+CD9+ regulatory B cells were activated with 2µg/ml anti-CD40 (HM40-3) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix,

France) for 48h and 10µg/ml LPS for 5h. CD3+CD4+CD25- effector T cells were activated with 100U/mL interleukin-2 (IL-2) for 48h. Effector T cells were then co-cultured for 48h with non-regulatory or regulatory B cells at a ratio of 1:1 and at 1 million/ml on plates coated with anti-CD3< (145-2C11) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). T cells alone were cultured as controls. For human co-culture experiments, the same protocol was used except that B cells were activated with 50ng/mL recombinant human soluble CD40L (R&D Systems Europe, Lille, France) plus 2.5mg/mL CpG oligodeoxynucleotide 2006 (InvivoGen, San Diego, CA) and T cells were activated with 50U/mL recombinant IL-2 (SARL Pharmaxie, Aigueperse, France). During co-culture, cells were treated with 100µM Necrostatin-1 (Sigma- Aldrich Chimie, Lyon, France) or 50nM Z-VAD (R&D Systems Europe, Lille, France) to inhibit necroptosis and apoptosis respectively. To inhibit IL-10 and Transforming Growth Factor-beta (TGF-β) pathways, cells were treated during co-culture with 10µg/mL anti–IL-10 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) or 10µg/mL anti–TGF-β1 (Abcam, Inc., Cambridge, UK).

Viability, apoptosis and cell cycle assays

To determine the percentage of dead cells, cells were stained using a LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit according to the manufacturers recommendation (Invitrogen, Waltham, US). Cell cycle stages were assessed using propidium iodide (PI) staining (Beckman Coulter, Roissy CDG, France) and the percentage of apoptosis by Annexin V-FITC staining (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). Samples were run on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, US).

Western blotting

The analysis of protein expression was performed by western blotting. The following primary antibodies were used: anti-Bcl-2 (D17C4), anti-Bid, anti-Bax (D3R2M), anti-actin, anti- cleaved and total caspase 8 and 9 (Cell Signaling technology, St Quentin en Yvelines, France).

Measurement of mitochondrial membrane potential

Mitochondrial membrane potential was measured using the potential-sensitive fluorescent probe tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) (Life Technologies, Saint-Aubin, France). Cells were incubated in Hank's Balanced Salt Solution (Gibco Life Technologies, Saint-Aubin, France) with JC-1 at 5mg/mL for 30 min at 37°C. Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, US).

Measurement of Mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation

After 48h of co-culture, cells were stained with the following Phosflow antibodies: anti phospho-p38-PeCy-7 and anti phospho-JNK-PE (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and anti phospho-ERK1/2-PE (eBioscience, Paris, France). Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, US).

Asthmatic mouse model

Six week-old wild-type BALB/c mice were purchased from Charles River Laboratories (Ecully, France). Allergic inflammation was induced using a total house dust mite (HDM) extract (Dermatophagoïdes farinae) provided by Stallergenes (Antony, France), as previously described55. This study was carried out in accordance with the recommendations of Regional Ethical Committee for Animal Experiments of Pays de la Loire (ceea.2012.77) under accreditation number: 3455. The protocol was approved by the Regional Ethical Committee for Animal Experiments of Pays de la Loire

Asthmatic patients

This study was carried out in accordance with the recommendations of the University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks. Blood samples were collected from patients included in the EXPRESA cohort (cohort of severe asthmatic patients, NCT00721097). Pulmonary function tests, clinical data and blood samples were collected each month for one year. Nine severe asthmatic patients were selected and 10 healthy volunteers (HV) were used as controls. The age and sex of the severe asthmatic and HV patients were not different.

Immunophenotyping of asthmatic patient samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation and frozen. PBMC were rapidly thawed by placing cryovials at 37°C, washed and stained according to standard protocols using the following mAbs: CD19-BUV395, CD27-BUV737, CD38-BV605, CD138-APC, CD24-PerCP-Cy5.5, and CD9-BV510 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). These markers were used to distinguish CD19+ B lymphocytes, CD19+CD27+ memory cells, CD19+CD27- naïve cells, CD19+CD24hiCD38hi transitional cells, CD19+CD24-CD38+ plasma cells and CD19+CD9+ regulatory B cells. For all experiments, dead cells were excluded using the

Zombie NIR™ Fixable Viability kit (BioLegend, London, UK). Samples were assessed on a BD LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and data were analyzed using FlowJo v10 software (FlowJo LLC, Ashland, US).

Statistical analysis

Comparisons of experimental values between the two groups were analyzed using the Mann–Whitney U-test. The nonparametric Kruskal–Wallis test with Dunn's posttest were used for comparisons between more than two groups. All statistical analysis were performed in GraphPad Prism v7, La jolla, USA.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank the participating patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We also thank the main EXPRESA investigators: Pr Patrice Diot, Dr Christophe Leroyer, Dr Chantal Belleguic, Dr Marion Verdaguer, and Dr Hakima Ouksel. We also thank the team of pulmonology of CIC-Thorax (Megguy Bernard, Régine Valéro and Annick Joly) for the EXPRESA follow up. We also thank J. Desfrancois-Noel, N. Marec, and L. Haro from the Cytocell Cytometry Facility in Nantes (SFR Bonamy), and the Unité Thérapeutique Expérimentale in Nantes for the animal experimentation facility.

This work was supported by a grant from l'Institut de Recherche en Santé Respiratoire-Pays de la Loire. This work was realized in the context of the BASAL project financed by Région Pays de la Loire and the IHU-Cesti project, the DHU Oncogreffe and the LabEX IGO thanks to French government financial support managed by the National Research Agency via the "Investment into the Future" program (ANR-10-IBHU-005 and ANR-11- LABX-0016-01). The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Métropole and Région Pays de la Loire. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Conflicts of interest: the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Fillatreau S. Cytokine-producing B cells as regulators of pathogenic and protective immune responses. Ann Rheum Dis 2013;72:2012-202253.
2. Crow MK. Costimulatory molecules and T-cell-B-cell interactions. Rheum Dis Clin North Am 2004;30:175-91.
3. Zanetti M, Castiglioni P, Rizzi M, Wheeler M, Gerloni M. B lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines. Immunol Rev 2004;199:264-78.
4. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. Nat Rev Immunol 2010;10:236-47.
5. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. Immunity 2015;42:607-12.
6. van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. J Allergy Clin Immunol 2016;138:654-65.
7. Chong AS, Khiew SH. Transplantation tolerance: don't forget about the B cells. Clin Exp Immunol 2017;189:171-180.
8. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, Carter CR, Davison A, Hernandez-Fuentes M, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-α expression ratio in regulatory B cells. J Am Soc Nephrol 2014;25:1575-85.
9. Nouël A, Simon Q, Jamin C, Pers JO, Hillion S. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. Front Immunol 2014;5:11.
10. Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, et al. Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. J Am Soc Nephrol 2015;26:2588-98.
11. Shabir S, Girdlestone J, Briggs D, Kaul B, Smith H, Daga S, et al. Transitional B lymphocytes are associated with protection from kidney allograft rejection: a prospective study. Am J Transplant 2045;15:1384-91.
12. Khoder A, Sarvaria A, Alsuliman A, Chew C, Sekine T, Cooper N, et al. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood 2014;124:2034-45.
13. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol 2002;3:944-50.
14. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. J Clin Med 2017;6.
15. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr

mice. J Immunol 2009;182:3492-502.

16. Amu S, Saunders SP, Kronenberg M, Mangan NE, Atzberger A, Fallon PG. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. J Allergy Clin Immunol 2010;125:1114-1124.e8.

17. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. J Exp Med 2003;197:489-501.

18. van der Vlugt LE, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhan A, Lievers E, Gloudemans AK, Liu KY, et al. Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d(hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. PLoS One 2012; 7:e30883.

19. Noh J, Lee JH, Noh G, Bang SY, Kim HS, Choi WS, et al. Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. Cell Immunol 2010;264:143-9.

20. van der Vlugt LE, Mlejnek E, Ozir-Fazalalikhan A, Janssen Bonas M, Dijksman TR, Labuda LA, et al. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. Clin Exp Allergy 2014;44:517-28.

21. Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, Jitsukawa S, Kawata K, Yamashita K, et al. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. Clin Immunol 2015;158:204

22. Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S. Regulatory functions of B cells in allergic diseases. Allergy 2014;69:1454-63.

23. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. Int Immunol 2015;27:479-86.

24. Braza F, Chesne J, Durand M, Dirou S, Brosseau C, Mahay G, et al. A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. Allergy 2015;70:1421-31.

25. Ostrowski M, Vermeulen M, Zabal O, Zamorano PI, Sadir AM, Geffner JR, Lopez OJ. The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. J Virol 2007;81:9357-67.

26. Sun J, Wang J, Pefanis E, Chao J, Rothschild G, Tachibana I, et al. Transcriptomics Identify CD9 as a Marker of Murine IL-10-Competent Regulatory B Cells. Cell Rep 2015;13:1110-7.

27. Matsushita T, Le Huu D, Kobayashi T, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Naka K, et al. A novel splenic B1 regulatory cell subset suppresses allergic disease through phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway activation. J Allergy Clin Immunol 2016;138:1170-1182.

28. Crowley LC, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow

Cytometry. Cold Spring Harb Protoc 2016;2016:pdb.prot087247.

29. Brosseau CM, Pirianov G, Colston KW. Involvement of stress activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D3-induced breast cell death. Steroids 2010;75:1082-8.

30. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 2004;23:2838-49.

31. Edwards MR, Saglani S, Schwarze J, Skevaki C, Smith JA, Ainsworth B, et al. Addressing unmet needs in understanding asthma mechanisms: From the European Asthma Research and Innovation Partnership (EARIP) Work Package (WP)2 collaborators. Eur Respir J 2017;49.

32. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. J Allergy Clin Immunol 2014;133:621-31.

33. Robinson DS. The role of the T cell in asthma. J Allergy Clin Immunol 2010;126:1081-91.

34. Lundy SK, Berlin AA, Martens TF, Lukacs NW. Deficiency of regulatory B cells increases allergic airway inflammation. Inflamm Res 2005;54:514-21.

35. Peng WM, Yu CF, Kolanus W, Mazzocca A, Bieber T, Kraft S, Novak N. Tetraspanins CD9 and CD81 are molecular partners of trimeric FcεRI on human antigen-presenting cells. Allergy 2011;66:605-11.

36. Ha CT, Waterhouse R, Wessells J, Wu JA, Dveksler GS. Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-ßeta1. J Leukoc Biol 2005;77:948-57.

37. Higginbottom A, Wilkinson I, McCullough B, Lanza F, Azorsa DO, Partridge LJ, Monk PN. Antibody cross-linking of human CD9 and the high-affinity immunoglobulin E receptor stimulates secretion from transfected rat basophilic leukaemia cells. Immunology 2000;99:546-52.

38. Moseley GW. Tetraspanin-Fc receptor interactions. Platelets 2005;16:3-12.

39. Dillon CP, Green DR. Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer. Adv Exp Med Biol 2016;930:1-23.

40. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;15:49- 63.

41. Brosseau C, Dousset C, Touzeau C, Maïga S, Moreau P, Amiot M, et al. Combination of lenalidomide with vitamin D3 induces apoptosis in mantle cell lymphoma via demethylation of BIK. Cell Death Dis 2014;5:e1389.

42. O'Farrell AM, Parry DA, Zindy F, Roussel MF, Lees E, Moore KW, Mui AL. Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage

proliferation. J Immunol 2000;164:4607-15.

43. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. Nat Med 2002;8:240-6.

44. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. J Cell Sci 2009;122:437-41.

45. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:621-32.

46. Bailey DP, Kashyap M, Bouton LA, Murray PJ, Ryan JJ. Interleukin-10 induces apoptosis in developing mast cells and macrophages. J Leukoc Biol 2006;80:581-9.

47. Liao HY, Tao L, Zhao J, Qin J, Zeng GC, Cai SW, et al. Clostridium butyricum in combination with specific immunotherapy converts antigen-specific B cells to regulatory B cells in asthmatic patients. Sci Rep 2016;6:20481.

48. Hussaarts L, van der Vlugt LE, Yazdanbakhsh M, Smits HH. Regulatory B-cell induction by helminths: implications for allergic disease. J Allergy Clin Immunol 2011;128:733-9.

49. Tian F, Hu X, Xian K, Zong D, Liu H, Wei H, et al. B10 cells induced by Schistosoma japonicum soluble egg antigens modulated regulatory T cells and cytokine production of T cells. Parasitol Res 2015;114:3827-34.

50. Haeberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalalikhan A, Chayé MAM, Veninga H, van der Vlugt LEPM, et al. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. PLoS Pathog 2017;13:e1006539.

51. Fallon PG, Alcami A. Pathogen-derived immunomodulatory molecules: future immunotherapeutics? Trends Immunol 2006;27:470-6.

52. Dong J, Wong CK, Cai Z, Jiao D, Chu M, Lam CW. Amelioration of allergic airway inflammation in mice by regulatory IL-35 through dampening inflammatory dendritic cells. Allergy 2015;70:921-32.

53. Blair PA, Chavez-Rueda KA, Evans JG, Shlomchik MJ, Eddaoudi A, Isenberg DA, et al. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. J Immunol 2009;182:3492-3502.

54. Korczak-Kowalska G, Stelmaszczyk-Emmel A, Bocian K, Kiernozek E, Drela N, Domagała-Kulawik J. Expanding Diversity and Common Goal of Regulatory T and B Cells. II: In Allergy, Malignancy, and Transplantation. Arch Immunol Ther Exp 2017;doi: 10.1007/s00005-017-0471-9.

55. Chesné J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant MA, Loy J, et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. J Allergy Clin Immunol 2015;135:1643-1643.

FIGURES

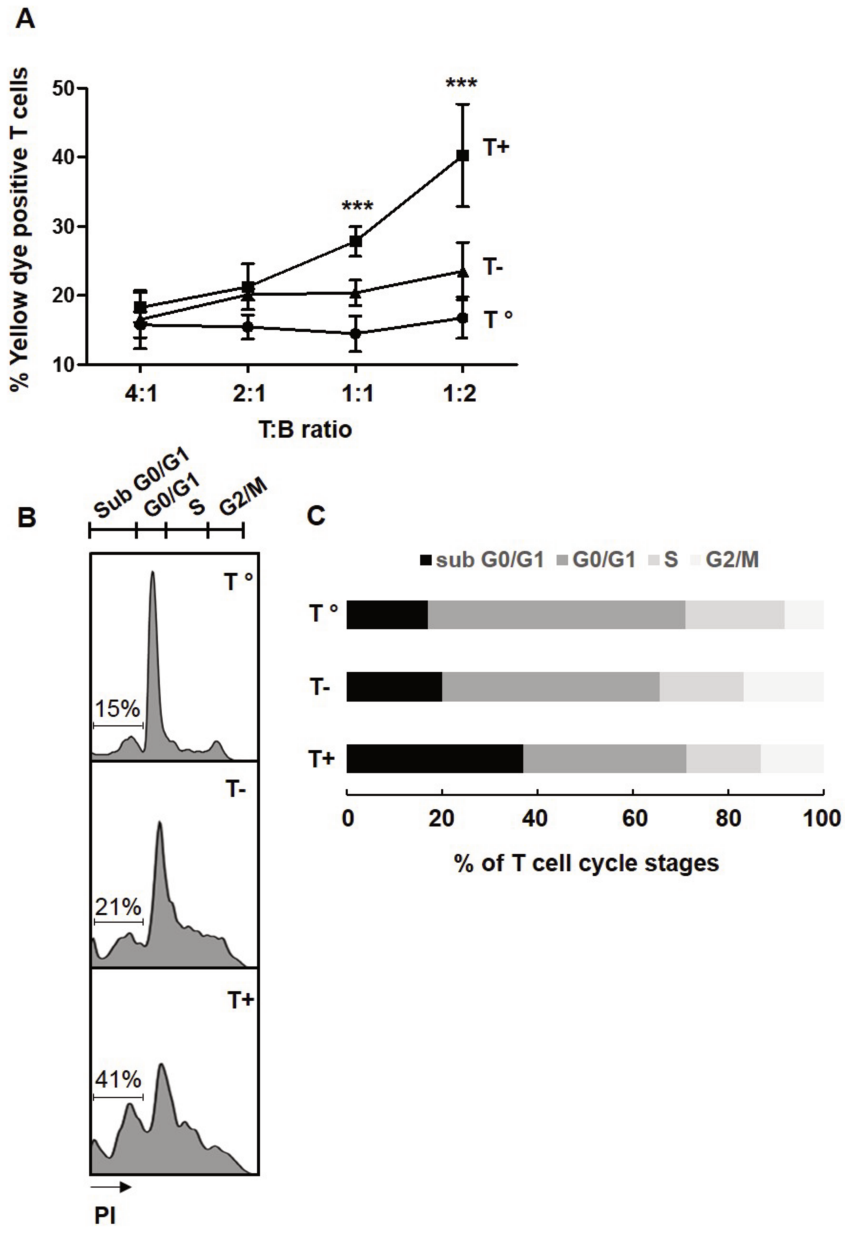


Figure 1: Effects of CD9+/- B cells on T cell proliferation and death. After 48h of activation, splenic CD3+CD4+CD25- effector T cells from Balb-c mice were co- cultured for 48h with CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells at different ratios or alone as controls. T cells co-cultured with CD9+ B cells are named "T+", T cells co-cultured with CD9- B cells are named "T-" and T cells alone "T°". A) Cells were stained with yellow dye to measure T cell death level (n=6, *** = $p<0.001$). B) Cells were stained with propidium iodide to measure T cell cycle phases. Representative staining of the different cell cycle stages. C) Percentage of T cells in the different cell cycle stages (n=6).

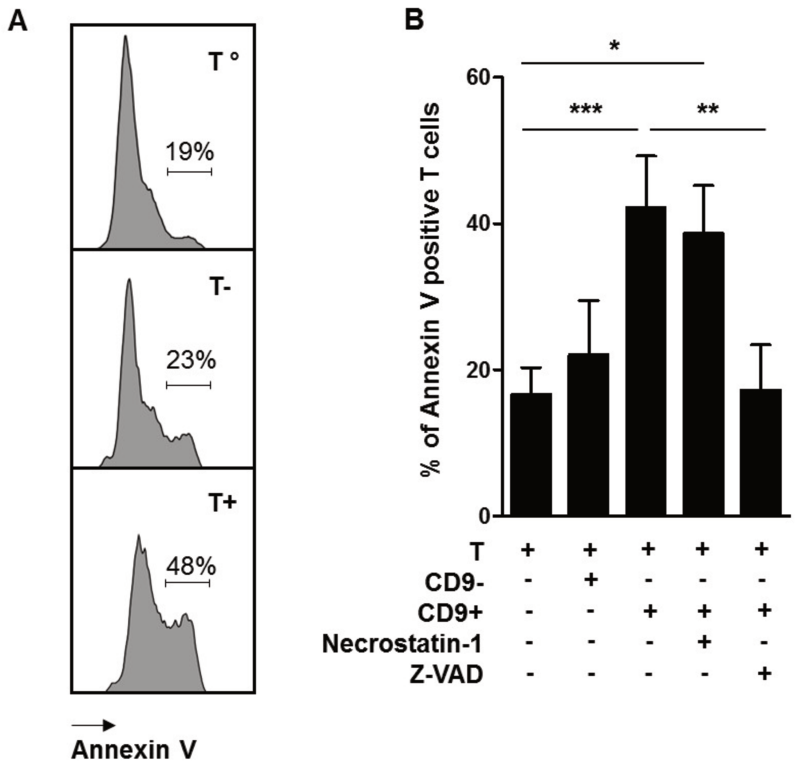


Figure 2: Effects of CD9+/- B cells on T cell apoptosis. After 48h of activation, splenic CD3+CD4+CD25- effector T cells from Balb-c mice were co- cultured for 48h with CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells or alone as controls. T cells co- cultured with CD9+ B cells are named "T+", T cells co-cultured with CD9- B cells are named "T-" and T cells alone "T°". During co-culture, cells were also treated with 100µM Necrostatin-1 or 50nM Z-VAD to inhibit necroptosis and apoptosis respectively. Cells were stained with Annexin V to measure T cell apoptosis. A) Representative results of Annexin V staining. B) Percentage of Annexin V positive T cells in each co-culture conditions (n=6, * = $p<0.05$, ** = $p<0.01$, *** = $p<0.001$).

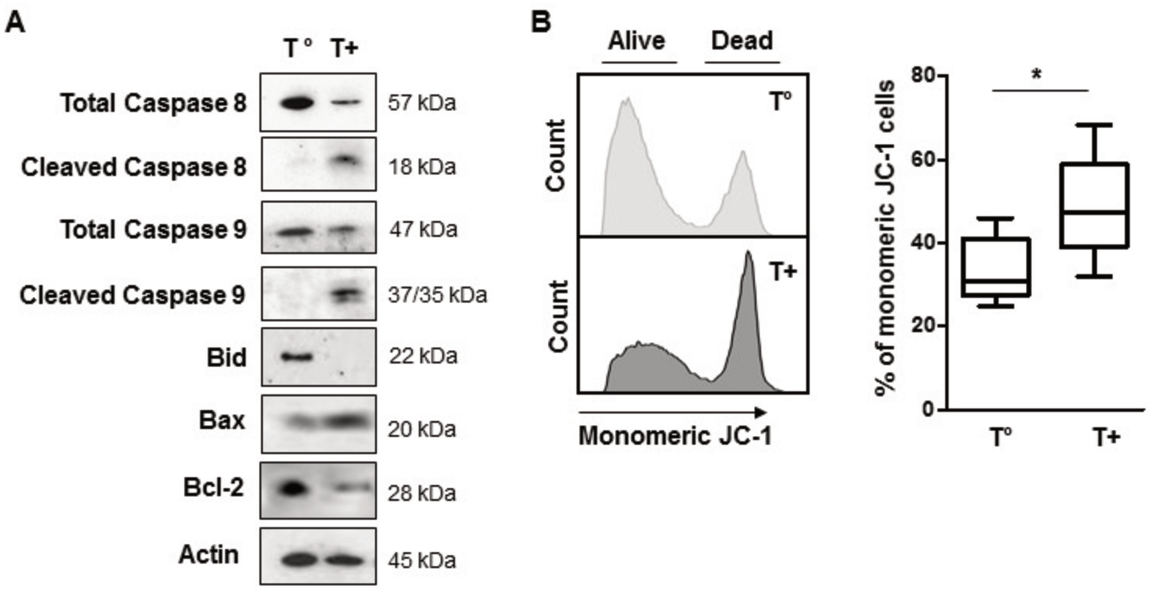


Figure 3: Effects of CD9+ B cells on caspase cleavage, expression of Bcl-2 family members and mitochondrial depolarization. After 48h of activation, splenic CD3+CD4+CD25- effector T cells from Balb-c mice were co-cultured for 48h with CD19+CD9+ or alone as controls. T cells co-cultured with CD9+ B cells are named "T+" and T cells alone "T°". A) Cleavage of caspase 8 and 9 and expression of Bcl-2 family members were assessed by western blotting. B) Mitochondrial depolarization was assessed by JC-1 staining. Representative results of JC-1 staining and percentage of monomeric JC-1 T cells (n=4, * = $p<0.05$).

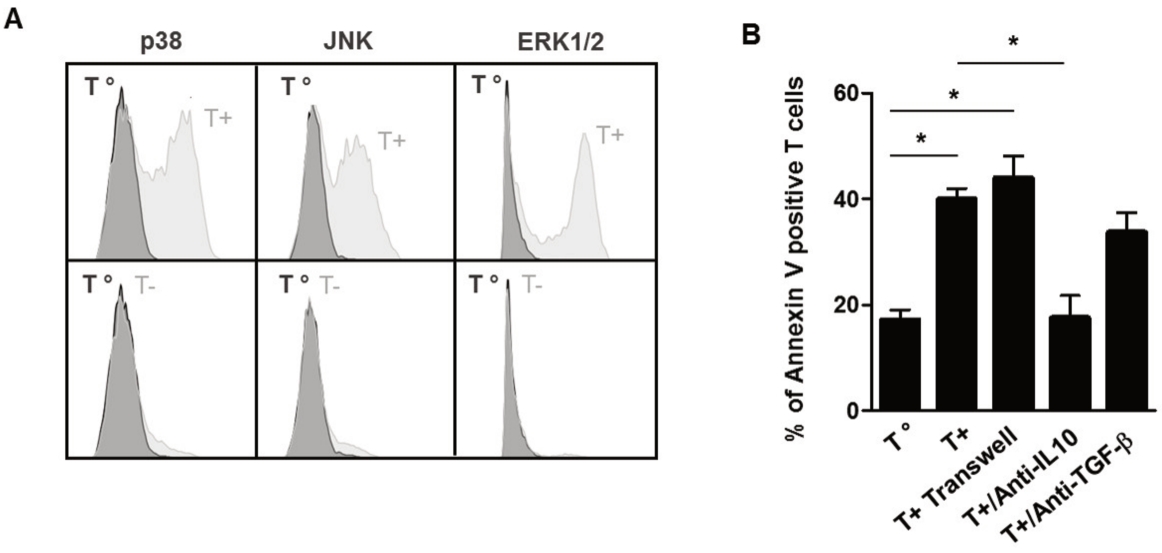


Figure 4: Effects of CD9+/- B cells on MAPK phosphorylation and implication of cell-cell contact and IL-10 secretion on the induction of apoptosis. After 48h of activation, splenic CD3+CD4+CD25- effector T cells from Balb-c mice were co-cultured for 48h with CD19+CD9+, CD19+CD9- B cells or alone as controls. T cells co-cultured with CD9+ B cells are named "T+", T cells co-cultured with CD9- B cells are named "T-" and T cells alone "T°". A) Phosphorylation of the MAPK p38, JNK and ERK1/2 was assessed by flow cytometry. Representative results of MAPK staining. B) Cells were also co- cultured in transwells or treated with 10µg/ml anti–IL-10 or 10µg/ml anti–TGF-β1 and stained with Annexin V to measure T cell apoptosis. Percentage of Annexin V positive T cells in the different co-culture conditions (n=3, * = $p<0.05$).

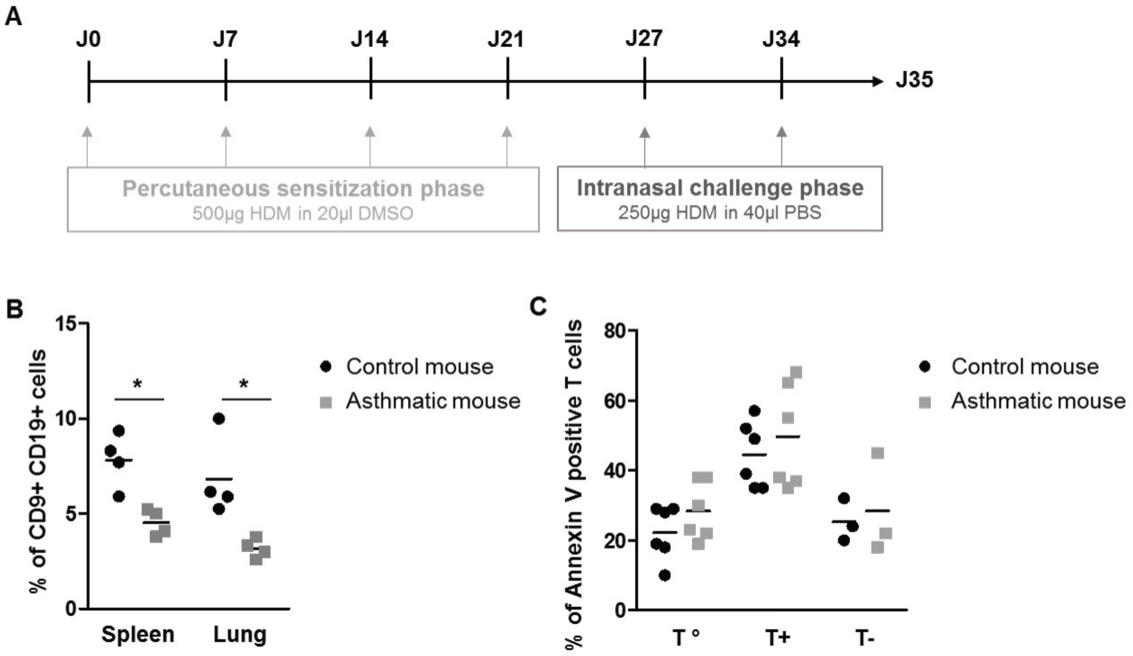


Figure 5: Number and regulatory properties of CD9+ B cells in asthmatic mouse

A) Protocol of induction of asthma in mice: House Dust Mite model. B) Percentage of CD9+ B cells among CD19+ cells in the spleen and lungs of control and asthmatic mice (n=4, * = $p<0.05$). C) After 48h of activation, splenic CD3+CD4+CD25- effector T cells from asthmatic (or not) Balb-c mice were co-cultured for 48h with CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells or alone as controls. T cells co-cultured with CD9+ B cells are named "T+", T cells co-cultured with CD9- B cells are named "T-" and T cells alone "T°". Cells were stained with Annexin V to measure T cell apoptosis. Percentage of Annexin V positive T cell staining (n=6).

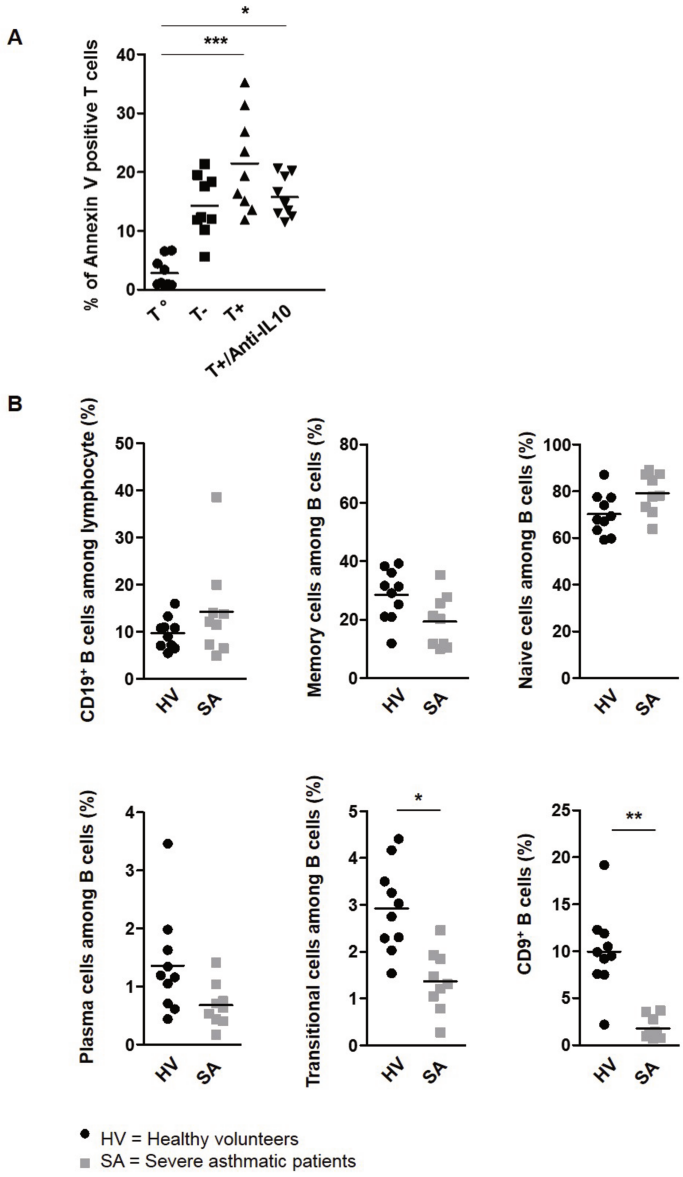
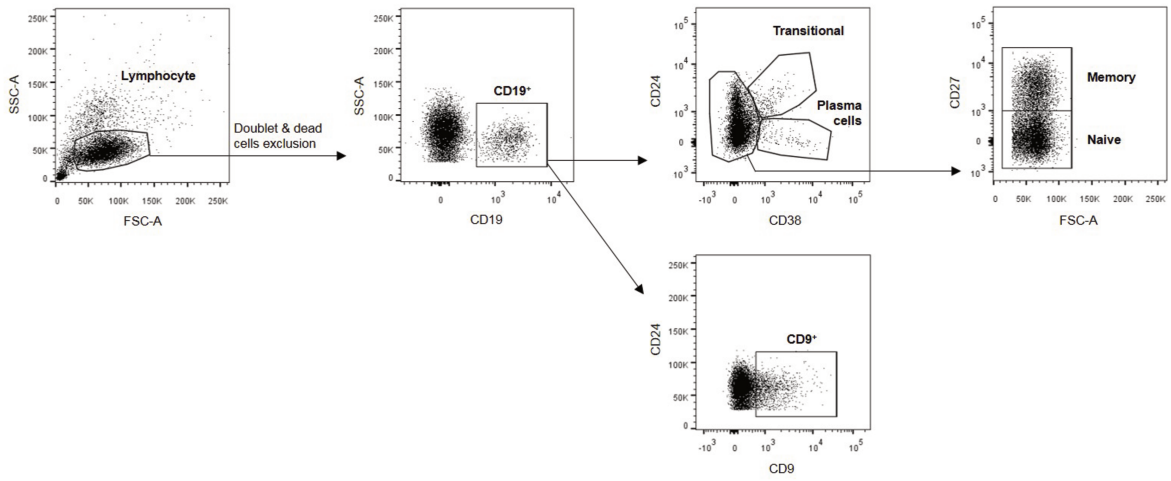


Figure 6: Effects of human CD9+/- B cells on T cell apoptosis and IL-10 secretion A) After 48h of activation, CD3+CD4+CD25- effector T cells from 9 healthy volunteers were co-cultured for 48h with CD19+CD9+ or CD19+CD9- B cells or alone as controls. T cells co- cultured with CD9+ B cells are named "T+", T cells co-cultured with CD9- B cells are named "T-" and T cells alone "T°". Cells were also treated with 20µg/ml anti–IL-10 and stained with Annexin V to measure T cell apoptosis. Percentage of Annexin V positive T cells in the different co-culture conditions (* = p<0.05, *** = p<0.001). B) Assessment of CD19+ B lymphocytes, CD19+CD27+ memory cells, CD19+CD27– naive cells, CD19+CD24–CD38+ plasma cells, CD19+CD24hiCD38hi transitional cells and CD9+ B cells in 10 healthy volunteers (HV) and 9 severe asthmatic patients (SA) (* = p<0.05, ** = p<0.01).



Supplementary Figure 1: gating strategy for B lymphocyte subpopulations in severe asthmatic patients.

RÉFÉRENCES

Abbas, A.K., Benoist, C., Bluestone, J.A., Campbell, D.J., Ghosh, S., Hori, S., Jiang, S., Kuchroo, V.K., Mathis, D., Roncarolo, M.G., et al. (2013). Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. Nat Immunol *14*, 307–308.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. Nat. Immunol. *2*, 725–731.

Åkesson, K., Tompa, A., Rydén, A., and Faresjö, M. (2015). Low expression of CD39(+) /CD45RA(+) on regulatory T cells (Treg) cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101(+) /CD129(+) on Treg cells in children with coeliac disease. Clin Exp Immunol *180*, 70–82.

Akimova, T., Kamath, B., Goebel, J., Meyers, K., Rand, E., Hawkins, A., Levine, M., Bucuvalas, J., and Hancock, W. (2012). Differing effects of rapamycin or calcineurin inhibitor on T-regulatory cells in pediatric liver and kidney transplant recipients. Am J Transpl. *12*, 3449–3461.

Alex Bishop, G., Bertolino, P.D., Bowen, D.G., and McCaughan, G.W. (2012). Tolerance in liver transplantation. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. *26*, 73–84.

Allez, M., Brimnes, J., Dotan, I., and Mayer, L. (2002). Expansion of CD8+ T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. Gastroenterology *123*, 1516–1526.

Aluvihare, V.R., Kallikourdis, M., and Betz, A.G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. Nat. Immunol. *5*, 266–271.

Alves, N.L., van Leeuwen, E.M.M., Derks, I.A., and van Lier, R.A.A. (2008). Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling. J Immunol *180*, 5201–5210.

Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., and Fallon, P.G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. J. Allergy Clin. Immunol. *125*, 1114–1124.e8.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. J. Exp. Med. *196*, 379–387.

Arvind, R., Cho, Y.A., Yelent, B., H, K.-T., Petra, Li, D., Chen, E., Whang, M., Kang, C., Turi, T.G., and Winoto, A. (2003). Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by Nur77 orphan steroid receptor. EMBO J *22*, 6526–6536.

Ashton-Chess, J., Brouard, S., and Soulillou, J.-P. (2006). Is clinical tolerance realistic in the next decade? Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *19*, 539–548.

Asseman, C., Mauze, S., Leach, M., Coffman, R., and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. J Exp Med *190*, 995–1004.

Asseman, C., Read, S., and Powrie, F. (2003). Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. J Immunol *171*, 971–978.

Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Clin. Invest. *116*, 3252–3257.

Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J.L., Parkman, R., Tovo, P.A., Abrams, J., de Waal Malefyt, R., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1994). High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. J. Exp. Med. *179*, 493–502.

Bacchetta, R., Gambineri, E., and Roncarolo, M.-G. (2007). Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. J. Allergy Clin. Immunol. *120*, 227-235; quiz 236-237.

Bacić, D., Uravić, M., Bacić, R., Sutić, I., and Petrosić, N. (2011). Augmentation of regulatory T cells (CD4+CD25+Foxp3+) correlates with tumor stage in patients with colorectal cancer. Coll. Antropol. *35 Suppl 2*, 65–68.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., and Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 1245–1253.

Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D.A. (2002). Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. J Immunol *169*, 6210–6217.

Ballet, C., G, R.-K., Aubin, J.-T.T., Brouard, S., Giral, M., Miqueu, P., Louis, S., van der Werf, S., and Soulillou, J.-P.P. (2006). Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. Am J Transpl. *6*, 2796–2801.

Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Herminé, A., and Devergne, O. (2008). Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *181*, 6898–6905.

Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grützkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T.J., Hoffmann, P., Edinger, M., et al. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. Eur J Immunol *37*, 2378–2389.

Baskaran, G., Tiriveedhi, V., Ramachandran, S., Aloush, A., Grossman, B., Hachem, R., and Mohanakumar, T. (2014). Efficacy of extracorporeal photopheresis in clearance of antibodies to donor-specific and lung-specific antigens in lung transplant recipients. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *33*, 950–956.

Batchelor, J.R., Welsh, K.I., Maynard, A., and Burgos, H. (1979). Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. I. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys into secondary AS recipients. J. Exp. Med. *150*, 455–464.

Battaglia, A., Buzzonetti, A., Monego, G., Peri, L., Ferrandina, G., Fanfani, F., Scambia, G., and Fattorossi, A. (2008). Neuropilin-1 expression identifies a subset of regulatory T cells in human lymph nodes that is modulated by preoperative chemoradiation therapy in cervical cancer. Immunology *123*, 129–138.

Baud'huin, M., Renault, R., Charrier, C., Riet, A., Moreau, A., Brion, R., Gouin, F., Duplomb, L., and Heymann, D. (2010). Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. J. Pathol. *221*, 77–86.

Baum, C., Reichenspurner, H., and Deuse, T. (2013). Bortezomib rescue therapy in a patient with recurrent antibody-mediated rejection after lung transplantation. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *32*, 1270–1271.

Bauwens, A.M., van de Graaf, E.A., van Ginkel, W.G., van Kessel, D.A., and Otten, H.G. (2006). Pre-transplant soluble CD30 is associated with bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. J Heart Lung Transpl. *25*, 416–419.

Becker, L.E., de Oliveira Biazotto, F., Conrad, H., Schaier, M., Kihm, L.P., Gross-Weissmann, M.-L., Waldherr, R., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Zeier, M., et al. (2012). Cellular infiltrates and NFκB subunit c-Rel signaling in kidney allografts of patients with clinical operational tolerance. Transplantation *94*, 729–737.

Belkaid, Y. (2007). Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. Nat Rev Immunol *7*, 875–888.

Belperio, J.A., Bruno, D., Keane, M.P., Burdick, M.D., Ying Xue, Y., Ross, D.J., Lynch, J.P., Kunkel, S.L., and Strieter, R.M. (2002). Interleukin-1 receptor antagonist as a biomarker for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. Transplantation *73*, 591–599.

Ben-David, H., Sharabi, A., Dayan, M., Sela, M., and Mozes, E. (2007). The role of CD8+CD28 regulatory cells in suppressing myasthenia gravis-associated responses by a dual altered peptide ligand. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 17459–17464.

Benden, C., Haughton, M., Leonard, S., and Huber, L.C. (2017). Therapy options for chronic lung allograft dysfunction-bronchiolitis obliterans syndrome following first-line immunosuppressive strategies: A systematic review. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *36*, 921–933.

Benghiat, F.S., Graca, L., Braun, M.Y., Detienne, S., Moore, F., Buonocore, S., Flamand, V., Waldmann, H., Goldman, M., and Le Moine, A. (2005). Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. Transplantation *79*, 648–654.

Benichou, G. (1999). Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *4*, D476-480.

Benichou, G., and Thomson, A.W. (2009). Direct versus indirect allorecognition pathways: on the right track. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *9*, 655–656.

Benmerad, M., Slama, R., Botturi, K., Claustre, J., Roux, A., Sage, E., Martine, R.-G., Gomez, C., Kessler, R., Brugière, O., et al. (2017). Chronic effects of air pollution on lung function after lung transplantation in the Systems prediction of Chronic Lung Allograft Dysfunction (SysCLAD) study. Eur Respir J *49*, 1600206.

Bennett, C., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M., Ferguson, P., Whitesell, L., Kelly, T., Saulsbury, F., Chance, P., and Ochs, H. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. Nat Genet *27*, 20–21.

Berastegui, C., Susana, G.-O., Sara, S.-V., Culebras, M., Monforte, V., Manuel, L.-M., Bravo, C., Ramon, M.-A.A., Romero, L., Sole, J., et al. (2017). BALF cytokines in different phenotypes of chronic lung allograft dysfunction in lung transplant patients. Clin Transpl. *31*, e12898.

Berendt, M.J., and North, R.J. (1980). T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. J. Exp. Med. *151*, 69–80.

Berg, D., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Menon, S., Davidson, N., Grünig, G., and Rennick, D. (1995). Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. J Clin Invest *96*, 2339–2347.

Bernasconi, E., Pattaroni, C., Koutsokera, A., Pison, C., Kessler, R., Benden, C., Soccal, P.M., Magnan, A., Aubert, J.-D.D., Marsland, B.J., et al. (2016). Airway Microbiota Determines Innate Cell Inflammatory or Tissue Remodeling Profiles in Lung Transplantation. Am J Respir Crit Care Med.

Bestard, O., Cruzado, J.M., Rama, I., Torras, J., Gomà, M., Serón, D., Moreso, F., Salvador, G.-V., and Grinyó, J.M. (2008). Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. J Am Soc Nephrol *19*, 2020–2026.

Beyer, M., and Schultze, J.L. (2007). CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in peripheral blood are primarily of effector memory phenotype. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *25*, 2628-2630; author reply 2630-2632.

Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonneau, C. (2015). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. J Clin Invest *125*, 3952–3964.

Bharat, A., Narayanan, K., Street, T., Fields, R.C., Steward, N., Aloush, A., Meyers, B., Schuessler, R., Trulock, E.P., Patterson, A.G., et al. (2007). Early Posttransplant Inflammation Promotes the Development of Alloimmunity and Chronic Human Lung Allograft Rejection. Transplantation *83*, 150.

Bhinder, S., Chen, H., Sato, M., Copes, R., Evans, G., Chow, C.-W.W., and Singer, L. (2014). Air pollution and the development of posttransplant chronic lung allograft dysfunction. *14*, 2749–2757.

Bhorade, S.M., Chen, H., Molinero, L., Liao, C., Garrity, E.R., Vigneswaran, W.T., Shilling, R., Sperling, A., Chong, A., and Alegre, M.-L.L. (2010). Decreased percentage of CD4+FoxP3+ cells in bronchoalveolar lavage from lung transplant recipients correlates with development of bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation *90*, 540–546.

Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Bécourt, C., and Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 246–253.

Billerbeck, E., Blum, H.E., and Thimme, R. (2007). Parallel expansion of human virus-specific FoxP3- effector memory and de novo-generated FoxP3+ regulatory CD8+ T cells upon antigen recognition in vitro. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 1039–1048.

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

Blair, P.A., Noreña, L.Y., Fabian, F.-B., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunity *32*, 129–140.

Bluestone, J.A., and Tang, Q. (2005). How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? Curr. Opin. Immunol. *17*, 638–642.

von Boehmer, H., and Fehling, H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. Annu. Rev. Immunol. *15*, 433–452.

Bohl, D.L., and Brennan, D.C. (2007). BK virus nephropathy and kidney transplantation. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN *2 Suppl 1*, S36-46.

Boix-Giner, F., Millan, O., San Segundo, D., Muñoz-Cacho, P., Mancebo, E., Llorente, S., Rafael-Valdivia, L., Rimola, A., Fábrega, E., Mrowiec, A., et al. (2016). High frequency of central memory regulatory T cells allows detection of liver recipients at risk of early acute rejection within the first month after transplantation. Int. Immunol. *28*, 55–64.

Bolton, E.M. (2005). Regulatory T cells in transplantation: natural or induced? Transplantation *79*, 643–645.

Boor, P.P.C., Metselaar, H.J., Jonge, S. de, Mancham, S., van der Laan, L.J.W., and Kwekkeboom, J. (2011). Human plasmacytoid dendritic cells induce $CD8^+$ $LAG\text{-}3^+$ $Foxp3^+$ $CTLA\text{-}4^+$ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. Eur. J. Immunol. *41*, 1663–1674.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., L, D., Maria, et al. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. Blood *110*, 1225–1232.

Borthwick, L.A., Parker, S.M., Brougham, K.A., Johnson, G.E., Gorowiec, M.R., Ward, C., Lordan, J.L., Corris, P.A., Kirby, J.A., and Fisher, A.J. (2009). Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. Thorax *64*, 770–777.

Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D.A., Jury, E.C., and Mauri, C. (2012). Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. Immunity *36*, 477–490.

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

Bours, M., Swennen, E., Di Virgilio, F., Cronstein, B., and Dagnelie, P. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther *112*, 358–404.

Bowdish, M.E., Arcasoy, S.M., Wilt, J.S., Conte, J.V., Davis, R.D., Garrity, E.R., Hertz, M.L., Orens, J.B., Rosengard, B.R., and Barr, M.L. (2004). Surrogate markers and risk factors for chronic lung allograft dysfunction. Am J Transpl. *4*, 1171–1178.

Braud, C., Baeten, D., Giral, M., Pallier, A., Joanna, A.-C., Braudeau, C., Chevalier, C., Lebars, A., Léger, J., Moreau, A., et al. (2008). Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. J Cell Biochem *103*, 1681–1692.

Braza, F., Chesne, J., Durand, M., Dirou, S., Brosseau, C., Mahay, G., Cheminant, M., Magnan, A., and Brouard, S. (2015a). A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. Allergy *70*, 1421–1431.

Braza, F., Durand, M., Degauque, N., and Brouard, S. (2015b). Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? Am J Transpl. *15*, 2288–2300.

Braza, F., Dugast, E., Panov, I., Paul, C., Vogt, K., Pallier, A., Chesneau, M., Baron, D., Guerif, P., Lei, H., et al. (2015c). Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. J Am Soc Nephrol *26*, 1795–1805.

Brinkmann, V., Cyster, J.G., and Hla, T. (2004). FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *4*, 1019–1025.

Brouard, S., Dupont, A., Giral, M., Louis, S., Lair, D., Braudeau, C., Degauque, N., Moizant, F., Pallier, A., Ruiz, C., et al. (2005). Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. Am J Transpl. *5*, 330–340.

Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, L., Giral, M., Hsieh, S.C., Baeten, D., Zhang, M., Joanna, A.-C., Braudeau, C., et al. (2007). Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. Proc Natl Acad Sci USA *104*, 15448–15453.

Brouard, S., Le Bars, A., Dufay, A., Gosselin, M., Foucher, Y., Guillet, M., Anne, C.-G., Thervet, E., Legendre, C., Dugast, E., et al. (2011). Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients. Transpl Int *24*, 536–547.

Brouard, S., Pallier, A., Renaudin, K., Foucher, Y., Danger, R., Devys, A., Cesbron, A., C, G.-G., J, A.-C., Le Roux, S., et al. (2012). The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. Am J Transpl. *12*, 3296–3307.

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

Brugière, O., Thabut, G., I, K.-R., Rizzo, R., Dauriat, G., Danel, C., Suberbielle, C., Mal, H., Stern, M., Schilte, C., et al. (2015). Role of HLA-G as a predictive marker of low risk of chronic rejection in lung transplant recipients: a clinical prospective study. Am J Transpl. *15*, 461–471.

Brunkow, M., Jeffery, E., Hjerrild, K., Paeper, B., Clark, L., Yasayko, S., Wilkinson, J., Galas, D., Ziegler, S., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. Nat Genet *27*, 68–73.

Budd, S.J., Aris, R.M., Medaiyese, A.A., Tilley, S.L., and Neuringer, I.P. (2012). Increased plasma mannose binding lectin levels are associated with bronchiolitis obliterans after lung transplantation. Respir Res *13*, 56.

Budding, K., van de Graaf, E.A., Paantjens, A.W., Tineke, K.-H., Kwakkel-van Erp, J.M., van Kessel, D.A., and Otten, H.G. (2015). Profiling of peripheral blood mononuclear cells does not accurately predict the bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Transpl Immunol *32*, 195–200.

Budding, K., van de Graaf, E.A., Kardol-Hoefnagel, T., Kwakkel-van Erp, J.M., Luijk, B.D., Oudijk, E.-J.D., van Kessel, D.A., Grutters, J.C., Hack, C.E., and Otten, H.G. (2016). Soluble CD59 is a Novel Biomarker for the Prediction of Obstructive Chronic Lung Allograft Dysfunction After Lung Transplantation. Sci. Rep. *6*, 26274.

Budding, K., Rossato, M., van de Graaf, E., Kwakkel-van Erp, J., Radstake, T.R.D.J.R., and Otten, H. (2017). Serum miRNAs as potential biomarkers for the bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Transpl Immunol *42*, 1–4.

Bursuker, I., and North, R.J. (1984). Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. J. Exp. Med. *159*, 1312–1321.

Cai, J., and Terasaki, P.I. (2005). Human leukocyte antigen antibodies for monitoring transplant patients. Surg. Today *35*, 605–612.

Caramalho, Í., Nunes-Cabaço, H., Foxall, R.B., and Sousa, A.E. (2015a). Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. Front. Immunol. *6*, 395.

Caramalho, I., Vânia, N.-S., Pires, A.R., Mota, C., Pinto, A.I., Helena, N.-C., Foxall, R.B., and Sousa, A.E. (2015b). Human regulatory T-cell development is dictated by Interleukin-2 and -15 expressed in a non-overlapping pattern in the thymus. J Autoimmun *56*, 98–110.

Carlo, S., Rossi, E., Politano, G., Inghilleri, S., Morbini, P., Calabrese, F., Benso, A., Savino, A., Cova, E., Zampieri, D., et al. (2016). Identification of miRNAs Potentially Involved in Bronchiolitis Obliterans Syndrome: A Computational Study. Plos One *11*, e0161771.

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

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

Casiraghi, F., Perico, N., and Remuzzi, G. (2017). Mesenchymal stromal cells for tolerance induction in organ transplantation. Hum. Immunol.

Chandrasekharan, D., Issa, F., and Wood, K.J. (2013). Achieving operational tolerance in transplantation: how can lessons from the clinic inform research directions? Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *26*, 576–589.

Charpin, J., Stern, M., Grenet, D., and D, I.-B. (2000). Insulinlike growth factor-1 in lung transplants with obliterative bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med *161*, 1991–1998.

Chen, F., and Date, H. (2015). Update on ischemia-reperfusion injury in lung transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. *20*, 515–520.

Chen, W., and Konkel, J.E. (2010). TGF-beta and "adaptive" Foxp3(+) regulatory T cells. J. Mol. Cell Biol. *2*, 30–36.

Chen, Q., Kim, Y.C., Laurence, A., Punkosdy, G.A., and Shevach, E.M. (2011). IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. J Immunol *186*, 6329–6337.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J.J., Li, L., Marinos, N., George, M., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med *198*, 1875–1886.

Chen, X., Subleski, J.J., Hamano, R., Howard, O.M.Z., Wiltrout, R.H., and Oppenheim, J.J. (2010). Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. Eur. J. Immunol. *40*, 1099–1106.

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

Chenouard, A., Chesneau, M., Bui Nguyen, L., Le Bot, S., Cadoux, M., Dugast, E., Paul, C., S, M.-C., Ville, S., Guérif, P., et al. (2016). Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood Tfh Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. Am J Transpl.

Chesneau, M., Michel, L., Degauque, N., and Brouard, S. (2013). Regulatory B cells and tolerance in transplantation: from animal models to human. Front Immunol *4*, 497.

Chesneau, M., Pallier, A., Braza, F., Lacombe, G., Le Gallou, S., Baron, D., Giral, M., Danger, R., Guerif, P., H, A.-W., et al. (2014). Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. Am J Transpl. *14*, 144–155.

Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A.A., et al. (2015a). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. J Am Soc Nephrol *26*, 2588–2598.

Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A.A., et al. (2015b). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. J Am Soc Nephrol *26*, 2588–2598.

Chong, A.S., and Sciammas, R. (2011). Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *11*, 2555–2560.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature *450*, 566–569.

Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomin, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, S.A., et al. (2010). IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. Nat. Immunol. *11*, 1093–1101.

Conlon, T.M., Saeb-Parsy, K., Cole, J.L., Motallebzadeh, R., Qureshi, M.S., Rehakova, S., Negus, M.C., Callaghan, C.J., Bolton, E.M., Bradley, J.A., et al. (2012). Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 2643–2652.

Corris, P.A., Ryan, V.A., Small, T., Lordan, J., Fisher, A.J., Meachery, G., Johnson, G., and Ward, C. (2015). A randomised controlled trial of azithromycin therapy in bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) post lung transplantation. Thorax *70*, 442–450.

Cosimi, A.B., Colvin, R.B., Burton, R.C., Rubin, R.H., Goldstein, G., Kung, P.C., Hansen, W.P., Delmonico, F.L., and Russell, P.S. (1981). Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. N. Engl. J. Med. *305*, 308–314.

Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarlasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., et al. (2003). Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. Blood *102*, 4107–4114.

Cozzo, C., Larkin, J., and Caton, A.J. (2003). Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol *171*, 5678–5682.

Cupedo, T., Nagasawa, M., Weijer, K., Blom, B., and Spits, H. (2005). Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. Eur. J. Immunol. *35*, 383–390.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., et al. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat. Med. *10*, 942–949.

Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. Immunity *29*, 114–126.

Dai, H., Wan, N., Zhang, S., Moore, Y., Wan, F., and Dai, Z. (2010). Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. J Immunol *185*, 803–807.

Dale, D.C., Boxer, L., and Liles, W.C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. Blood *112*, 935–945.

Danger, R., Sawitzki, B., and Brouard, S. (2016). Immune monitoring in renal transplantation: The search for biomarkers. Eur J Immunol *46*, 2695–2704.

Danger, R., Chesneau, M., Paul, C., Guérif, P., Durand, M., Newell, K.A., Kanaparthi, S., Turka, L.A., Soulillou, J.-P.P., Houlgatte, R., et al. (2017). A composite score associated with spontaneous operational tolerance in kidney transplant recipients. Kidney Int *91*, 1473–1481.

Dantal, J., and Soulillou, J.-P.P. (2005). Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. N Engl J Med *352*, 1371–1373.

Darrasse-Jèze, G., Marodon, G., Salomon, B.L., Catala, M., and Klatzmann, D. (2005). Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetuses. Blood *105*, 4715–4721.

Daud, S.A., Yusen, R.D., Meyers, B.F., Chakinala, M.M., Walter, M.J., Aloush, A.A., Patterson, G., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2007). Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Respir Crit Care Med *175*, 507–513.

Davila, E., Kang, Y.M., Park, Y.W., Sawai, H., He, X., Pryshchep, S., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2005). Cell-based immunotherapy with suppressor CD8+ T cells in rheumatoid arthritis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 7292–7301.

Davis, C., Gagermeier, J., Dilling, D., Alex, C., Lowery, E., Kovacs, E., Love, R., and Fisichella, P. (2010). A review of the potential applications and controversies of non-invasive testing for biomarkers of aspiration in the lung transplant population. Clin Transpl. *24*, E54-61.

D'Cruz, L.M., and Klein, L. (2005). Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. Nat Immunol *6*, 1152–1159.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., et al. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med *204*, 1257–1265.

Del Pozo-Balado, M.D.M., Leal, M., Méndez-Lagares, G., and Pacheco, Y.M. (2010). CD4(+)CD25(+/hi)CD127(lo) phenotype does not accurately identify regulatory T cells in all populations of HIV-infected persons. J. Infect. Dis. *201*, 331–335.

DeNardo, D.G., Brennan, D.J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S.L., Madden, S.F., Gallagher, W.M., Wadhwani, N., Keil, S.D., Junaid, S.A., et al. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov. *1*, 54–67.

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. Nat. Immunol. *2*, 1032–1039.

Derhovanessian, A. (2016). The Role of TGF-β in the Association Between Primary Graft Dysfunction and Bronchiolitis Obliterans Syndrome. Am J Transpl. *16*, 640–649.

Dhamne, C., Chung, Y., Alousi, A.M., Cooper, L.J., and Tran, D.Q. (2013). Peripheral and thymic foxp3(+) regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. Front Immunol *4*, 253.

Ding, Q., Yeung, M., Camirand, G., Zeng, Q., Akiba, H., Yagita, H., Chalasani, G., Sayegh, M.H., Najafian, N., and Rothstein, D.M. (2011). Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. J. Clin. Invest. *121*, 3645–3656.

Dwyer, K.M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T.B., and Robson, S.C. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. Purinergic Signal *3*, 171–180.

Ehrenstein, M.R., Evans, J.G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J. Exp. Med. *200*, 277–285.

Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and inflammation. N. Engl. J. Med. *364*, 656–665.

Endharti, A.T., Rifa'I, M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2005). Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 7093–7097.

Ensor, C.R., Rihtarchik, L.C., Morrell, M.R., Hayanga, J.W.A., Lichvar, A.B., Pilewski, J.M., Wisniewski, S., Johnson, B.A., D'Cunha, J., Zeevi, A., et al. (2017). Rescue alemtuzumab for refractory acute cellular rejection and bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Clin. Transplant. *31*.

Erwig, L.-P., and Henson, P.M. (2007). Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis. Am. J. Pathol. *171*, 2–8.

Evans, J.G., Chavez-Rueda, K.A., Eddaoudi, A., Meyer-Bahlburg, A., Rawlings, D.J., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2007). Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *178*, 7868–7878.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. J. Clin. Invest. *101*, 890–898.

Faguer, S., Kamar, N., Guilbeaud-Frugier, C., Fort, M., Modesto, A., Mari, A., Ribes, D., Cointault, O., Lavayssière, L., Guitard, J., et al. (2007). Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. Transplantation *83*, 1277–1280.

Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D.B., Mellor, A.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U., et al. (2002). Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. Int. Immunol. *14*, 65–68.

Fan, L., Benson, H.L., Vittal, R., Mickler, E.A., Presson, R., Fisher, A.J., Cummings, O.W., Heidler, K.M., Keller, M.R., Burlingham, W.J., et al. (2011). Neutralizing IL-17 prevents obliterative bronchiolitis in murine orthotopic lung transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *11*, 911–922.

Feger, U., Tolosa, E., Huang, Y.-H., Waschbisch, A., Biedermann, T., Melms, A., and Wiendl, H. (2007). HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. Blood *110*, 568–577.

Fields, R.C., Bharat, A., Steward, N., Aloush, A., Meyers, B.F., Trulock, E.P., Chapman, W.C., Patterson, G., and Mohanakumar, T. (2006). Elevated soluble CD30 correlates with development of bronchiolitis obliterans syndrome following lung transplantation. Transplantation *82*, 1596–1601.

Fife, B.T., and Bluestone, J.A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. Immunol. Rev. *224*, 166–182.

Filaci, G., Bacilieri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., and Indiveri, F. (2001). Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. J Immunol *166*, 6452–6457.

Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., and Anderton, S.M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat. Immunol. *3*, 944–950.

Fiser, S.M., Tribble, C.G., Long, S.M., Kaza, A.K., Kern, J.A., Jones, D.R., Robbins, M.K., and Kron, I.L. (2002). Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. Ann Thorac Surg *73*, 1041-7; discussion 1047-8.

Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., and Puck, J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell *81*, 935–946.

Fishman, J.A. (2007). Infection in solid-organ transplant recipients. N. Engl. J. Med. *357*, 2601–2614.

Fletcher, J.M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., Cliona, O., Tubridy, N., and Mills, K.H. (2009). CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. J Immunol *183*, 7602–7610.

Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.-D.D., Bopp, T., Schmitt, E., et al. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. PLoS Biol *5*, e38.

Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. Sci. Transl. Med. *5*, 173ra23.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat. Immunol. *4*, 330–336.

Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for

interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. Nat Immunol *6*, 1142–1151.

Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., et al. (2008). Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. Nat Genet *40*, 1319–1323.

Franquesa, M., Hoogduijn, M.J., Reinders, M.E., Eggenhofer, E., Engela, A.U., Mensah, F.K., Torras, J., Pileggi, A., van Kooten, C., Mahon, B., et al. (2013). Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation (MiSOT) Fourth Meeting: lessons learned from first clinical trials. Transplantation *96*, 234–238.

Fukaura, H., Kent, S., Pietrusewicz, M., Khoury, S., Weiner, H., and Hafler, D. (1996). Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. J Clin Invest *98*, 70–77.

Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. J. Exp. Med. *200*, 1039–1049.

Gallon, L., Traitanon, O., Yu, Y., Shi, B., Leventhal, J.R., Miller, J., Mas, V., L, X., and Mathew, J.M. (2015). Differential Effects of Calcineurin and Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors on Alloreactive Th1, Th17, and Regulatory T Cells. Transplantation *99*, 1774–1784.

Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E.L., Greenberg, P.D., Ochs, H.D., and Rudensky, A.Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *103*, 6659–6664.

Gerber, J.S., and Mosser, D.M. (2001). Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *166*, 6861–6868.

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

Gilliet, M., and Liu, Y.-J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. J. Exp. Med. *195*, 695–704.

Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *150*, 4244–4252.

Godfrey, W.R., Spoden, D.J., Ge, Y.G., Baker, S.R., Liu, B., Levine, B.L., June, C.H., Blazar, B.R., and Porter, S.B. (2005). Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. Blood *105*, 750–758.

Golocheikine, A.S., Saini, D., Ramachandran, S., Trulock, E.P., Patterson, A., and Mohanakumar, T. (2008). Soluble CD30 levels as a diagnostic marker for bronchiolitis obliterans syndrome following human lung transplantation. Transpl Immunol *18*, 260–263.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 1783–1786.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. *5*, 953–964.

Gottlieb, J., Schulz, T.F., Welte, T., Fuehner, T., Dierich, M., Simon, A.R., and Engelmann, I. (2009). Community-acquired respiratory viral infections in lung transplant recipients: a single season cohort study. Transplantation *87*, 1530–1537.

Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2010). TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. J Exp Med *207*, 1701–1711.

Gottschalk, R.A., Corse, E., and Allison, J.P. (2012). Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. J Immunol *188*, 976–980.

Gould, D.S., and Auchincloss, H. (1999). Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. Immunol. Today *20*, 77–82.

Grainger, J.R., Smith, K.A., Hewitson, J.P., J, M., Henry, Harcus, Y., Filbey, K.J., Finney, C.A., Greenwood, E.J., Knox, D.P., Wilson, M.S., et al. (2010). Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-β pathway. J Exp Med *207*, 2331–2341.

Grant, C.R., Liberal, R., Holder, B.S., Cardone, J., Ma, Y., Robson, S.C., Giorgina, M.-V., Vergani, D., and Longhi, M.S. (2014). Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. Hepatology *59*, 1007–1015.

Greenland, J., Jewell, N., Gottschall, M., Trivedi, N., Kukreja, J., Hays, S., Singer, J., Golden, J., and Caughey, G. (2014). Bronchoalveolar Lavage Cell Immunophenotyping Facilitates Diagnosis of Lung Allograft Rejection. Am J Transpl. *14*, 831–840.

Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C.F., Hauben, E., and Roncarolo, M.-G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. Blood *116*, 935–944.

Gregson, A.L., Hoji, A., Palchevskiy, V., Hu, S., Weigt, S., Liao, E., Derhovanessian, A., Saggar, R., Song, S., Elashoff, R., et al. (2010). Protection against bronchiolitis obliterans syndrome is associated with allograft CCR7+ CD45RA- T regulatory cells. PLoS ONE *5*, e11354.

Gregson, A.L., Wang, X., Weigt, S.S., Palchevskiy, V., Lynch, J.P., Ross, D.J., Kubak, B.M., Saggar, R., Fishbein, M.C., Ardehali, A., et al. (2013). Interaction between Pseudomonas and CXC chemokines increases risk of bronchiolitis obliterans syndrome and death in lung transplantation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *187*, 518–526.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. Immunity *21*, 589–601.

Gu, J., Ni, X., Pan, X., Lu, H., Lu, Y., Zhao, J., Guo Zheng, S., Hippen, K.L., Wang, X., and Lu, L. (2017). Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. Cell. Mol. Immunol. *14*, 521–528.

Guillonneau, C., Bézie, S., and Anegon, I. (2017). Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. Cell Mol Life Sci *74*, 2569–2586.

Haberman, B., Doan, M.L., Smith, E., Schecter, M.G., Mallory, G.B., and Elidemir, O. (2010). Serum KL-6 level and the development of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. Pediatr Transpl. *14*, 903–908.

Hachem, R.R., Khalifah, A.P., Chakinala, M.M., Yusen, R.D., Aloush, A.A., Mohanakumar, T., Patterson, G., Trulock, E.P., and Walter, M.J. (2005). The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. Transplantation *80*, 1406–1413.

Hachem, R.R., Tiriveedhi, V., Patterson, G.A., Aloush, A., Trulock, E.P., and Mohanakumar, T. (2012). Antibodies to K-α 1 tubulin and collagen V are associated with chronic rejection after lung transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *12*, 2164–2171.

Hagedorn, P.H., Burton, C.M., Carlsen, J., Steinbrüchel, D., Andersen, C.B., Sahar, E., Domany, E., Cohen, I.R., Flyvbjerg, H., and Iversen, M. (2010). Chronic rejection of a lung transplant is characterized by a profile of specific autoantibodies. Immunology *130*, 427–435.

Hahn, B.H., Singh, R.P., La Cava, A., and Ebling, F.M. (2005). Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 7728–7737.

Hall, D.J., Baz, M., Daniels, M.J., Staples, E.D., Klodell, C.T., Moldawer, L.L., and Beaver, T.M. (2012). Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients. Interact Cardiovasc Thorac Surg *15*, 603–607.

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

Han, L., Sugiyama, H., Zhang, Q., Yan, K., Fang, X., S, M., Thomas, Cooper, K.D., and Huang, Q. (2017). Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T-cells in psoriasis. Australas J Dermatol.

Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.-R.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.-H.H., Voo, K.S., Cao, W., et al. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. J Immunol *184*, 2999–3007.

Hanaway, M.J., Woodle, E.S., Mulgaonkar, S., Peddi, V.R., Kaufman, D.B., First, M.R., Croy, R., Holman, J., and INTAC Study Group (2011). Alemtuzumab induction in renal transplantation. N. Engl. J. Med. *364*, 1909–1919.

Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.-H.H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. J Immunol *182*, 3461–3468.

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

Haskó, G., Pacher, P., Deitch, E.A., and Vizi, E.S. (2007). Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. Pharmacol. Ther. *113*, 264–275.

Heeger, P.S., and Dinavahi, R. (2012). Transplant immunology for non-immunologist. Mt. Sinai J. Med. N. Y. *79*, 376–387.

Heisel, O., Heisel, R., Balshaw, R., and Keown, P. (2004). New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *4*, 583–595.

Herrera, O.B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M.J., Marelli-Berg, F.M., and Lechler, R.I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *173*, 4828–4837.

Hijnen, D., Haeck, I., van Kraats, A.A., Nijhuis, E., S, de B.-W., Marjolein, A, B.-K., Carla, and Knol, E.F. (2009). Cyclosporin A reduces CD4(+)CD25(+) regulatory T-cell numbers in patients with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol *124*, 856–858.

Himmel, M.E., G, M., Katherine, Garcia, R.V., Steiner, T.S., and Levings, M.K. (2013). Helios+ and Helios− Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans. J Immunol *190*, 2001–2008.

Ho, J., Kurtz, C.C., Naganuma, M., Ernst, P.B., Cominelli, F., and Rivera-Nieves, J. (2008). A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 2573–2580.

Hodge, G., Hodge, S., Chambers, D.C., Reynolds, P.N., and Holmes, M. (2012). Increased expression of graft intraepithelial T-cell pro-inflammatory cytokines compared with native lung during episodes of acute rejection. J Heart Lung Transpl. *31*, 538–544.

Hodge, S., Holmes, M., Banerjee, B., Musk, M., Kicic, A., Waterer, G., Reynolds, P.N., Hodge, G., and Chambers, D.C. (2009). Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *9*, 727–733.

Hoffman, E.S., Passoni, L., Crompton, T., Leu, T.M., Schatz, D.G., Koff, A., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (1996). Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. Genes Dev. *10*, 948–962.

Hoffmann, P., Eder, R., Boeld, T.J., Doser, K., Piseshka, B., Andreesen, R., and Edinger, M. (2006). Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. Blood *108*, 4260–4267.

Hogquist, K.A., Baldwin, T.A., and Jameson, S.C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. Nat. Rev. Immunol. *5*, 772–782.

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

Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I., and Lebecque, S. (2006). Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 5293–5298.

Hsieh, C.-S.S., Liang, Y., Tyznik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. Immunity *21*, 267–277.

Hübner, R., Meffert, S., Mundt, U., Böttcher, H., Freitag, S., El Mokhtari, N., Pufe, T., Hirt, S., Fölsch, U., and Bewig, B. (2005). Matrix metalloproteinase-9 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Eur Respir J *25*, 494–501.

Hudrisier, D., Feau, S., Bonnet, V., Romagnoli, P., and Van Meerwijk, J.P.M. (2003). In vivo maintenance of T-lymphocyte unresponsiveness induced by thymic medullary epithelium requires antigen presentation by radioresistant cells. Immunology *108*, 24–31.

Humblet, C., Rudensky AYu, null, and Kyewski, B. (1994). Presentation and intercellular transfer of self antigen within the thymic microenvironment: expression of the E alpha peptide-I-Ab complex by isolated thymic stromal cells. Int. Immunol. *6*, 1949–1958.

Immunologists, A.A. of (1951). The Production of Antibodies (2nd Edition): by F. M. Burnet and F. Fenner. $3.00. 142 pp. Macmillan and Co., Ltd., Melbourne, Australia, 1949. J. Immunol. *66*, 485–486.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.-H.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F., Gilliet, M., and Liu, Y.-J.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. Immunity *28*, 870–880.

Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., et al. (2011). Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood *117*, 530–541.

Izawa, A., Yamaura, K., Albin, M.J., Jurewicz, M., Tanaka, K., Clarkson, M.R., Ueno, T.,

Habicht, A., Freeman, G.J., Yagita, H., et al. (2007). A novel alloantigen-specific CD8+PD1+ regulatory T cell induced by ICOS-B7h blockade in vivo. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 786–796.

Izcue, A., Coombes, J.L., and Powrie, F. (2009). Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. Annu Rev Immunol *27*, 313–338.

Jacquet, A., Francois, H., Frangie, C., Ahmad, L., Charpentier, B., and Durrbach, A. (2008). Prevention of calcineurin inhibitor nephrotoxicity in renal transplantation. Transpl. Immunol. *20*, 29–31.

Jarvis, L.B., Matyszak, M.K., Duggleby, R.C., Goodall, J.C., Hall, F.C., and Gaston, J.S.H. (2005). Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. Eur. J. Immunol. *35*, 2896–2908.

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

Jiang, H., and Chess, L. (2008). Qa-1/HLA-E-restricted regulatory CD8+ T cells and self-nonself discrimination: an essay on peripheral T-cell regulation. Hum. Immunol. *69*, 721–727.

Jonigk, D., Izykowski, N., Rische, J., Braubach, P., Kühnel, M., Warnecke, G., Lippmann, T., Kreipe, H., Haverich, A., Welte, T., et al. (2015). Molecular Profiling in Lung Biopsies of Human Pulmonary Allografts to Predict Chronic Lung Allograft Dysfunction. Am J Pathol *185*, 3178–3188.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J. Exp. Med. *193*, 1285–1294.

Joosten, S.A., van Meijgaarden, K.E., Savage, N.D.L., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M.R., Geluk, A., and Ottenhoff, T.H.M. (2007). Identification of a human CD8+ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 8029–8034.

Josefowicz, S.Z., Wilson, C.B., and Rudensky, A.Y. (2009). Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. J Immunol *182*, 6648–6652.

Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J., Anrather, J., Beaudoin, A., Bach, F., and Robson, S. (1996). Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. J Biol Chem *271*, 33116–33122.

Kadish, J.L., and Basch, R.S. (1975). Thymic regeneration after lethal irradiation evidence for an intra-thymic radioresistant T cell precursor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *114*, 452–458.

Kamekura, R., Shigehara, K., Miyajima, S., Jitsukawa, S., Kawata, K., Yamashita, K., Nagaya, T., Kumagai, A., Sato, A., Matsumiya, H., et al. (2015). Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. Clin Immunol *158*, 204–211.

Kang, H.-K., Michaels, M.A., Berner, B.R., and Datta, S.K. (2005). Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 3247–3255.

Kappler, J.W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell *49*, 273–280.

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

Kauke, T., Kneidinger, N., Martin, B., Dick, A., Schneider, C., Schramm, R., Meimarakis, G., Preissler, G., Eickelberg, O., von Dossow, V., et al. (2015). Bronchiolitis obliterans syndrome due to donor-specific HLA-antibodies. Tissue Antigens *86*, 178–185.

Kawai, K., Uchiyama, M., Hester, J., Wood, K., and Issa, F. (2017). Regulatory T cells for Tolerance. Hum. Immunol.

Kawai, T., Sachs, D.H., Sprangers, B., Spitzer, T.R., Saidman, S.L., Zorn, E., Tolkoff-Rubin, N., Preffer, F., Crisalli, K., Gao, B., et al. (2014). Long-term results in recipients of combined HLA-mismatched kidney and bone marrow transplantation without maintenance immunosuppression. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *14*, 1599–1611.

Kennedy, V., Todd, J., and Palmer, S. (2013). Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transpl. *13*, 552–561.

Khalifah, A.P., Hachem, R.R., Chakinala, M.M., Yusen, R.D., Aloush, A., Patterson, G., Mohanakumar, T., Trulock, E.P., and Walter, M.J. (2005). Minimal acute rejection after lung transplantation: a risk for bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transpl. *5*, 2022–2030.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. Nat. Immunol. *4*, 337–342.

Khoder, A., Sarvaria, A., Alsuliman, A., Chew, C., Sekine, T., Cooper, N., Mielke, S., de Lavallade, H., Muftuoglu, M., Fernandez Curbelo, I., et al. (2014). Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. Blood *124*, 2034–2045.

Kissmeyer-Nielsen, F., Olsen, S., Petersen, V.P., and Fjeldborg, O. (1966). Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. Lancet Lond. Engl. *2*, 662–665.

Kitani, A., Chua, K., Nakamura, K., and Strober, W. (2000). Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 691–702.

Kleinewietfeld, M., Starke, M., Di Mitri, D., Borsellino, G., Battistini, L., Rötzschke, O., and Falk, K. (2009). CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells. Blood *113*, 827–836.

Klimiuk, P.A., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (1999). IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *162*, 4293–4299.

Koble, C., and Kyewski, B. (2009). The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. J. Exp. Med. *206*, 1505–1513.

Koutsokera, A., Royer, P.J., Antonietti, J.P., Fritz, A., Benden, C., Aubert, J.D., Tissot, A., Botturi, K., Roux, A., L, R.-G., Martine, et al. (2017). Development of a Multivariate Prediction Model for Early-Onset Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome in Lung Transplantation. Front Med Lausanne *4*, 109.

Kreider, T., Anthony, R.M., Urban, J.F., and Gause, W.C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. Curr. Opin. Immunol. *19*, 448–453.

Kreslavsky, T., Kim, H.-J., Koralov, S.B., Ghitza, D., Buch, T., Cantor, H., Rajewsky, K., and von Boehmer, H. (2013). Negative selection, not receptor editing, is a physiological response of autoreactive thymocytes. J. Exp. Med. *210*, 1911–1918.

Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. Nat Immunol *6*, 1219–1227.

Kryczek, I., Wei, S., Zou, L., Zhu, G., Mottram, P., Xu, H., Chen, L., and Zou, W. (2006). Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 40–44.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell *75*, 263–274.

Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (1998). Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. J. Exp. Med. *188*, 409–414.

Kyewski, B.A., Fathman, C.G., and Kaplan, H.S. (1984). Intrathymic presentation of circulating non-major histocompatibility complex antigens. Nature *308*, 196–199.

Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. J Exp Med *204*, 57–63.

Lal, G., and Bromberg, J.S. (2009). Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. Blood *114*, 3727–3735.

Lal, G., Zhang, N., van der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E.P., Reid, S.P., Levy, D.E., and Bromberg, J.S. (2009). Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. J Immunol *182*, 259–273.

LaPar, D.J., Burdick, M.D., Emaminia, A., Harris, D.A., Strieter, B.A., Liu, L., Robbins, M., Kron, I.L., Strieter, R.M., and Lau, C.L. (2011). Circulating fibrocytes correlate with bronchiolitis obliterans syndrome development after lung transplantation: a novel clinical biomarker. Ann. Thorac. Surg. *92*, 470–477; discussion 477.

Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., et al. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *5*, 443–453.

Le Bras, S., and Geha, R.S. (2006). IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. J. Clin. Invest. *116*, 1473–1475.

Lee, K.M., Stott, R.T., Zhao, G., SooHoo, J., Xiong, W., Lian, M.M., Fitzgerald, L., Shi, S., Akrawi, E., Lei, J., et al. (2014). TGF-β-producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. Eur. J. Immunol. *44*, 1728–1736.

Lenaerts, K., Ceulemans, L.J., Hundscheid, I.H.R., Grootjans, J., Dejong, C.H.C., and Olde Damink, S.W.M. (2013). New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation. Curr. Opin. Organ Transplant. *18*, 298–303.

Lenardo, M.J. (1991). Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. Nature *353*, 858–861.

Lennard, L. (1992). The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. Eur. J. Clin. Pharmacol. *43*, 329–339.

Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzig, G., Herzig, R., et al. (2012). Chimerism and tolerance without GVHD or engraftment syndrome in HLA-mismatched combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation. Sci. Transl. Med. *4*, 124ra28.

Levings, M.K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M.G. (2001). Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. J. Exp. Med. *193*, 1295–1302.

Levings, M.K., Sangregorio, R., Sartirana, C., Moschin, A.L., Battaglia, M., Orban, P.C., and Roncarolo, M.-G.G. (2002). Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. J Exp Med *196*, 1335–1346.

Li, M.O., Sanjabi, S., and Flavell, R.A. (2006a). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. Immunity *25*, 455–471.

Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K.L., and Flavell, R.A. (2006b). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. Annu. Rev. Immunol. *24*, 99–146.

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. Immunity *26*, 579–591.

Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 5916–5926.

Lindley, S., Dayan, C.M., Bishop, A., Roep, B.O., Peakman, M., and Tree, T.I.M. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. Diabetes *54*, 92–99.

Lindner, S., Dahlke, K., Sontheimer, K., Hagn, M., Kaltenmeier, C., Barth, T.F., Beyer, T., Reister, F., Fabricius, D., Lotfi, R., et al. (2013). Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. Cancer Res *73*, 2468–2479.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C.C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. Nat. Immunol. *4*, 350–354.

Liu, T., Soong, L., Liu, G., König, R., and Chopra, A.K. (2009). CD44 expression positively correlates with Foxp3 expression and suppressive function of CD4+ Treg cells. Biol. Direct *4*, 40.

Liu, W., Putnam, A.L., Zhou, X.-Y., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med *203*, 1701–1711.

Liu, X.-Q., Hu, Z.-Q., Pei, Y.-F., and Tao, R. (2013). Clinical operational tolerance in liver transplantation: state-of-the-art perspective and future prospects. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. HBPD INT *12*, 12–33.

Liu, Y., Cheng, L.-S.S., Wu, S.D., Wang, S.-Q.Q., Li, L., She, W.-M.M., Li, J., Wang, J.-Y.Y., and Jiang, W. (2016). IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. Clin Sci *130*, 907–919.

Londoño, M.-C.C., Danger, R., Giral, M., Soulillou, J.-P.P., A, S.-F., and Brouard, S. (2012). A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation. Am J Transpl. *12*, 1370–1377.

Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard, N., Moreau, A., Soulillou, J.-P.P., and Brouard, S. (2006). Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. Transplantation *81*, 398–407.

Lozano, J., Pallier, A., M, M.-L., Danger, R., López, M., Giral, M., Londoño, M., Rimola, A., Soulillou, J., Brouard, S., et al. (2011). Comparison of transcriptional and blood cell-phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients. Am J Transpl. *11*, 1916–1926.

MacDonald, K.G., Han, J.M., Himmel, M.E., Huang, Q., Kan, B., Campbell, A.I., Lavoie, P.M., and Levings, M.K. (2013). Response to Comment on "Helios+ and Helios− Cells Coexist within the Natural FOXP3+ T Regulatory Cell Subset in Humans." J Immunol *190*, 4440–4441.

Mackaness, G.B. (1977). Cellular immunity and the parasite. Adv. Exp. Med. Biol. *93*, 65–73.

Madariaga, M.L.L., Kreisel, D., and Madsen, J.C. (2015). Organ-specific differences in achieving tolerance. Curr. Opin. Organ Transplant. *20*, 392–399.

Maggi, E., Cosmi, L., Liotta, F., Romagnani, P., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2005). Thymic regulatory T cells. Autoimmun. Rev. *4*, 579–586.

Mahic, M., Henjum, K., Yaqub, S., Bjørnbeth, B.A., Torgersen, K.M., Taskén, K., and Aandahl, E.M. (2008). Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation. Eur. J. Immunol. *38*, 640–646.

Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P.A., Scollay, R., and Malissen, B. (1992). Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. Immunol. Today *13*, 315–322.

Malvezzi, P., and Rostaing, L. (2015). The safety of calcineurin inhibitors for kidney-transplant patients. Expert Opin. Drug Saf. *14*, 1531–1546.

Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. Immunity *25*, 441–454.

Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *13*, 453–461.

Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A.L., and Toribio, M.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. Blood *115*, 5366–5375.

Mascanfroni, I.D., Yeste, A., Vieira, S.M., Burns, E.J., Patel, B., Sloma, I., Wu, Y., Mayo, L., Rotem, B.-H., Efroni, S., et al. (2013). IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. Nat Immunol *14*, 1054–1063.

Massart, A., Pallier, A., Pascual, J., Viklicky, O., Budde, K., Spasovski, G., Klinger, M., Sever, M.S., Sørensen, S.S.S., Hadaya, K., et al. (2016). The DESCARTES-Nantes survey of kidney transplant recipients displaying clinical operational tolerance identifies 35 new tolerant patients and 34 almost tolerant patients. Nephrol Dial Transpl. *31*, 1002–1013.

Mathew, T.H. (1998). A blinded, long-term, randomized multicenter study of mycophenolate mofetil in cadaveric renal transplantation: results at three years. Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation *65*, 1450–1454.

Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., and Cyster, J.G. (2004). Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature *427*, 355–360.

Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Immunity *41*, 1040–1051.

McGargill, M.A., Derbinski, J.M., and Hogquist, K.A. (2000). Receptor editing in developing T cells. Nat. Immunol. *1*, 336–341.

McGeachy, M.J., and Anderton, S.M. (2005). Cytokines in the induction and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. Cytokine *32*, 81–84.

McManigle, W., Pavlisko, E.N., and Martinu, T. (2013). Acute cellular and antibody-mediated allograft rejection. Semin. Respir. Crit. Care Med. *34*, 320–335.

McPherson, S.W., Heuss, N.D., and Gregerson, D.S. (2013). Local “on-demand” generation and function of antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. J Immunol *190*, 4971–4981.

Mečnikov, I.I. (1845-1916) (1901). L’Immunité dans les maladies infectieuses, par Élie Metchnikoff,... (Paris: Masson).

Meier-Kriesche, H.-U., Magee, J.C., and Kaplan, B. (2008). Trials and tribulations of steroid withdrawal after kidney transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *8*, 265–266.

Meloni, F., Vitulo, P., Cascina, A., Oggionni, T., Bulgheroni, A., Paschetto, E., Klersy, C., M, D., Andrea, Fietta, A., Bianco, A.M., et al. (2004a). Bronchoalveolar lavage cytokine profile in a cohort of lung transplant recipients: a predictive role of interleukin-12 with respect to onset of bronchiolitis obliterans syndrome. J Heart Lung Transpl. *23*, 1053–1060.

Meloni, F., Vitulo, P., Bianco, A.M., Paschetto, E., Morosini, M., Cascina, A., Mazzucchelli, I., Ciardelli, L., Oggionni, T., Fietta, A.M., et al. (2004b). Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. Transplantation *77*, 762–766.

Ménager-Marcq, I., Pomié, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P.M. (2006). CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. Gastroenterology *131*, 1775–1785.

Menon, M., Blair, P.A., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2016). A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. Immunity *44*, 683–697.

Merkenschlager, M., Graf, D., Lovatt, M., Bommhardt, U., Zamoyska, R., and Fisher, A.G. (1997). How many thymocytes audition for selection? J. Exp. Med. *186*, 1149–1158.

Meyer, K., Raghu, G., Verleden, G., Corris, P., and Aurora, P. (2014). An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome.

Michel, F., Mangino, G., Attal-Bonnefoy, G., Tuosto, L., Alcover, A., Roumier, A., Olive, D., and Acuto, O. (2000). CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *165*, 3820–3829.

Miller, A., Lider, O., Roberts, A.B., Sporn, M.B., and Weiner, H.L. (1992). Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 421–425.

Mills, K.H.G. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat. Rev. Immunol. *4*, 841–855.

Milpied, P., Renand, A., Bruneau, J., A, M.-C., Daniella, Jacquelin, S., Asnafi, V., Rubio, M.-T.T., Elizabeth, M., Lepelletier, Y., and Hermine, O. (2009). Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. Eur J Immunol *39*, 1466–1471.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., and Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 4676–4680.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. Immunity *30*, 899–911.

Miyara, M., Chader, D., Sage, E., Sugiyama, D., Nishikawa, H., Bouvry, D., Claër, L., Hingorani, R., Balderas, R., Rohrer, J., et al. (2015). Sialyl Lewis x (CD15s) identifies highly differentiated and most suppressive FOXP3high regulatory T cells in humans. Proc Natl Acad Sci USA *112*, 7225–7230.

Miyara, M., Chader, D., Burlion, A., Goldstein, J., Sterlin, D., Norol, F., Trebeden-Nègre, H., Claër, L., Sakaguchi, S., Marodon, G., et al. (2017). Combination of IL-2, rapamycin, DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors for the expansion of human regulatory T cells. Oncotarget *8*, 104733–104744.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S., and Bhan, A.K. (2002). Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity *16*, 219–230.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. Cell *68*, 869–877.

Moncrieffe, H., Nistala, K., Kamhieh, Y., Evans, J., Eddaoudi, A., Eaton, S., and Wedderburn, L.R. (2010). High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. J Immunol *185*, 134–143.

Moore, K., de Waal Malefyt, R., Coffman, R., and A, O. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu Rev Immunol *19*, 683–765.

Moraes-Vieira, P.M.M., Takenaka, M.C.S., Silva, H.M., Monteiro, S.M., Agena, F., Lemos, F., Saitovitch, D., Kalil, J., and Coelho, V. (2012). GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. Clin. Immunol. Orlando Fla *142*, 117–126.

Morrell, M.R., Pilewski, J.M., Gries, C.J., Pipeling, M.R., Crespo, M.M., Ensor, C.R., Yousem, S.A., Jonathan, D., Shigemura, N., Bermudez, C.A., et al. (2014). De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. J Heart Lung Transpl. *33*, 1288–1294.

Morrissey, P.J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D., and Watson, J.D. (1993). CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. J. Exp. Med. *178*, 237–244.

Mottet, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *170*, 3939–3943.

Möttönen, M., Heikkinen, J., Mustonen, L., Isomäki, P., Luukkainen, R., and Lassila, O. (2005). CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Immunol. *140*, 360–367.

Mouraux, S., Bernasconi, E., Pattaroni, C., Koutsokera, A., Aubert, J.-D., Claustre, J., Pison, C., Royer, P.-J., Magnan, A., Kessler, R., et al. (2017). Airway microbiota signals anabolic and catabolic remodeling in the transplanted lung. J. Allergy Clin. Immunol.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R., et al. (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science *297*, 1867–1870.

Murai, M., Turovskaya, O., Kim, G., Madan, R., Karp, C.L., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2009). Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. Nat Immunol *10*, 1178–1184.

Naesens, M., and Sarwal, M.M. (2010). Harnessing the diversity of the human T-cell repertoire: a monitoring tool for transplantation tolerance? Eur. J. Immunol. *40*, 2986–2989.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. J. Exp. Med. *204*, 3037–3047.

Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., and Khoury, S.J. (2003). Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. J. Clin. Invest. *112*, 1037–1048.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. J Exp Med *194*, 629–644.

Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L.-S., O'Connell, P.J., Allen, R.D.M., and Chapman, J.R. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. N. Engl. J. Med. *349*, 2326–2333.

Nawrot, T.S., Vos, R., Jacobs, L., Verleden, S.E., Wauters, S., Mertens, V., Dooms, C., Hoet, P.H., Van Raemdonck, D.E., Faes, C., et al. (2011). The impact of traffic air pollution on bronchiolitis obliterans syndrome and mortality after lung transplantation. Thorax *66*, 748–754.

Nazzal, D., Gradolatto, A., Truffault, F., Bismuth, J., and S, B.-A. (2014). Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. Cell Death Dis *5*, e1420.

Neale, J., and Smith, A.C. (2015). Cardiovascular risk factors following renal transplant. World J. Transplant. *5*, 183–195.

Newell, K.A., Asare, A., Kirk, A.D., Gisler, T.D., Bourcier, K., Suthanthiran, M., Burlingham, W.J., Marks, W.H., Sanz, I., Lechler, R.I., et al. (2010). Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest *120*, 1836–1847.

Niederkorn, J.Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. Nat. Immunol. *7*, 354–359.

Nishizuka, Y., and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesia of the gonad after neonatal thymectomy in mice. Science *166*, 753–755.

Nouël, A., Pochard, P., Simon, Q., Ségalen, I., Le Meur, Y., Pers, J.O., and Hillion, S. (2015). B-Cells induce regulatory T cells through TGF-β/IDO production in A CTLA-4 dependent manner. J. Autoimmun. *59*, 53–60.

Nunes-Cabaço, H., Ribot, J.C., Caramalho, I., Serra-Caetano, A., Silva-Santos, B., and Sousa, A.E. (2010). Foxp3 induction in human and murine thymus precedes the CD4+ CD8+ stage but requires early T-cell receptor expression. Immunol. Cell Biol. *88*, 523–528.

Nunes-Cabaço, H., Caramalho, I., Sepúlveda, N., and Sousa, A.E. (2011). Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. Eur. J. Immunol. *41*, 3604–3614.

Obst, R., Netuschil, N., Klopfer, K., Stevanović, S., and Rammensee, H.G. (2000). The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self-major histocompatibility complex molecules. J. Exp. Med. *191*, 805–812.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M., and Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. Immunology *118*, 240–249.

Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., et al. (2012). T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. Immunity *37*, 785–799.

Ohshimo, S., Bonella, F., Sommerwerck, U., Teschler, H., Kamler, M., Jakob, H.-G.G., Kohno, N., Guzman, J., and Costabel, U. (2011). Comparison of serum KL-6 versus bronchoalveolar lavage neutrophilia for the diagnosis of bronchiolitis obliterans in lung transplantation. J Heart Lung Transpl. *30*, 1374–1380.

Oka, A., Ishihara, S., Mishima, Y., Tada, Y., Kusunoki, R., Fukuba, N., Yuki, T., Kawashima,

K., Matsumoto, S., and Kinoshita, Y. (2014). Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. Inflamm. Bowel Dis. *20*, 315–328.

Oura, T., Cosimi, A.B., and Kawai, T. (2017). Chimerism-based tolerance in organ transplantation: preclinical and clinical studies. Clin. Exp. Immunol. *189*, 190–196.

Palin, A.C., and Love, P.E. (2015). CD5 helps aspiring regulatory T cells ward off unwelcome cytokine advances. Immunity *42*, 395–396.

Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Joanna, A.-C., Pettré, S., Lozano, J.J., et al. (2010). Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. Kidney Int *78*, 503–513.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat. Immunol. *8*, 1353–1362.

Pennati, A., Ng, S., Wu, Y., Murphy, J.R., Deng, J., Rangaraju, S., Asress, S., Blanchfield, J.L., Evavold, B., and Galipeau, J. (2016). Regulatory B Cells Induce Formation of IL-10-Expressing T Cells in Mice with Autoimmune Neuroinflammation. J Neurosci *36*, 12598–12610.

Perez, V.L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Abbas, A.K. (1997). Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. Immunity *6*, 411–417.

Piccirillo, C.A., Letterio, J.J., Thornton, A.M., S, M., Rebecca, Mamura, M., Mizuhara, H., and Shevach, E.M. (2002). CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. J Exp Med *196*, 237–246.

Pinschewer, D.D., Ochsenbein, A.F., Odermatt, B., Brinkmann, V., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *164*, 5761–5770.

Polansky, J.K., Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. (2008). DNA methylation controls Foxp3 gene expression. Eur J Immunol *38*, 1654–1663.

Powell, B.R., Buist, N.R., and Stenzel, P. (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. J. Pediatr. *100*, 731–737.

Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. J Exp Med *172*, 1701–1708.

Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. Int. Immunol. *5*, 1461–1471.

Preisser, L., Miot, C., Le Guillou-Guillemette, H., Beaumont, E., Foucher, E.D., Garo, E., Blanchard, S., Frémaux, I., Croué, A., Fouchard, I., et al. (2014). IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. Hepatol. Baltim. Md *60*, 1879–1890.

Presser, K., Schwinge, D., Wegmann, M., Huber, S., Schmitt, S., Quaas, A., Maxeiner, J.H., Finotto, S., Lohse, A.W., Blessing, M., et al. (2008). Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. J Immunol *181*, 7751–7758.

Probst-Kepper, M., Geffers, R., Kröger, A., Viegas, N., Erck, C., Hecht, H.-J., Lünsdorf, H.,

Roubin, R., Moharregh-Khiabani, D., Wagner, K., et al. (2009). GARP: a key receptor controlling FOXP3 in human regulatory T cells. J. Cell. Mol. Med. *13*, 3343–3357.

Ramsdell, F., and Fowlkes, B.J. (1992). Maintenance of in vivo tolerance by persistence of antigen. Science *257*, 1130–1134.

Ramsdell, F., Lantz, T., and Fowlkes, B.J. (1989). A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. Science *246*, 1038–1041.

Raulet, D.H., Garman, R.D., Saito, H., and Tonegawa, S. (1985). Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. Nature *314*, 103–107.

Read, S., Malmström, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J. Exp. Med. *192*, 295–302.

Reynaud-Gaubert, M., Marin, V., Thirion, X., Farnarier, C., Thomas, P., Badier, M., Bongrand, P., Giudicelli, R., and Fuentes, P. (2002). Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *21*, 721–730.

Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. N. Engl. J. Med. *353*, 1711–1723.

Richman, L., Chiller, J., Brown, W., Hanson, D., and Vaz, N. (1978). Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphoyctes by intragastric administration of soluble proteins. J Immunol *121*, 2429–2434.

Rietkötter, E., Bleckmann, A., Bayerlová, M., Menck, K., Chuang, H.-N., Wenske, B., Schwartz, H., Erez, N., Binder, C., Hanisch, U.-K., et al. (2015). Anti-CSF-1 treatment is effective to prevent carcinoma invasion induced by monocyte-derived cells but scarcely by microglia. Oncotarget *6*, 15482–15493.

Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. (2004). Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. J. Exp. Med. *200*, 1123–1134.

Rincón, M., and Flavell, R.A. (1994). AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. EMBO J. *13*, 4370–4381.

Ring, S., Enk, A.H., and Mahnke, K. (2011). Regulatory T cells from IL-10-deficient mice fail to suppress contact hypersensitivity reactions due to lack of adenosine production. J Invest Dermatol *131*, 1494–1502.

Rissiek, A., Baumann, I., Cuapio, A., Mautner, A., Kolster, M., Arck, P.C., Ali, D.-K., Mittrücker, H.-W.W., Friedrich, K.-N., Haag, F., et al. (2015). The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. J Autoimmun *58*, 12–20.

Roberts, V., Stagg, J., and Dwyer, K.M. (2014). The Role of Ectonucleotidases CD39 and CD73 and Adenosine Signaling in Solid Organ Transplantation. Front. Immunol. *5*, 64.

Rodríguez-Perea, A.L., Arcia, E.D., Rueda, C.M., and Velilla, P.A. (2016). Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. Clin. Exp. Immunol. *185*, 281–291.

Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P. (2002). Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. J Immunol *168*, 1644–1648.

Roncarolo, M.-G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. Nat. Rev. Immunol. *7*, 585–598.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. Immunol Rev *212*, 28–50.

Rosser, E.C., Blair, P.A., and Mauri, C. (2014). Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. Mol. Immunol. *62*, 296–304.

Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J.-F., Legendre, C., Noël, C., Pillebout, E., Brouard, S., and Soulillou, J.-P. (2006). Clinical operational tolerance after kidney transplantation. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *6*, 736–746.

Royer, P.-J.J., Gustavo, O.-B., Koutsokera, A., Aubert, J.-D.D., Bernasconi, E., Tissot, A., Pison, C., Nicod, L., Boissel, J.-P.P., and Magnan, A. and (2016). Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. Transplantation *100*, 1803–1814.

Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., Chi, E.Y., Fontenot, J., Castelli, L., Ye, X., Treuting, P., Siewe, L., Roers, A., Henderson, W.R., et al. (2008). Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. Immunity *28*, 546–558.

Ruprecht, C.R., Gattorno, M., Ferlito, F., Gregorio, A., Martini, A., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. J. Exp. Med. *201*, 1793–1803.

Safavi, S., Robinson, D.R., Soresi, S., Carby, M., and Smith, J.D. (2014). De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. J Heart Lung Transpl. *33*, 1273–1281.

Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D.A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., et al. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest *120*, 1848–1861.

Saini, D., Weber, J., Ramachandran, S., Phelan, D., Tiriveedhi, V., Liu, M., Steward, N., Aloush, A., Hachem, R., Trulock, E., et al. (2011). Alloimmunity-induced autoimmunity as a potential mechanism in the pathogenesis of chronic rejection of human lung allografts. J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant. *30*, 624–631.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol *22*, 531–562.

Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat. Immunol. *6*, 345–352.

Sakaguchi, S., Takahashi, T., and Nishizuka, Y. (1982). Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer. J Exp Med *156*, 1565–1576.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., and Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med *161*, 72–87.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol *155*, 1151–1164.

Sakaguchi, S., Wing, K., and Miyara, M. (2007). Regulatory T cells - a brief history and perspective. Eur J Immunol *37 Suppl 1*, S116-23.

Salama, M., Jaksch, P., Andrukhova, O., Taghavi, S., Klepetko, W., and Aharinejad, S. (2010). Endothelin-1 is a useful biomarker for early detection of bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients. J Thorac Cardiovasc Surg *140*, 1422–1427.

Salcido-Ochoa, F., Tsang, J., Tam, P., Falk, K., and Rotzschke, O. (2010). Regulatory T cells in transplantation: does extracellular adenosine triphosphate metabolism through CD39 play a crucial role? Transplant. Rev. Orlando Fla *24*, 52–66.

Salman, J., Ius, F., Knoefel, A.-K.K., Sommer, W., Siemeni, T., Kuehn, C., Tudorache, I., Avsar, M., Nakagiri, T., Preissler, G., et al. (2017). Association of Higher CD4+ CD25high CD127low , FoxP3+ , and IL-2+ T Cell Frequencies Early After Lung Transplantation With Less Chronic Lung Allograft Dysfunction at Two Years. Am J Transpl. *17*, 1637–1648.

Salomon, B., and Bluestone, J.A. (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. Annu. Rev. Immunol. *19*, 225–252.

Salvadori, M., Rosso, G., and Bertoni, E. (2015). Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. World J. Transplant. *5*, 52–67.

Samstein, R.M., Josefowicz, S.Z., Arvey, A., Treuting, P.M., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. Cell *150*, 29–38.

Sánchez-Fueyo, A., and Strom, T.B. (2011). Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. Gastroenterology *140*, 51–64.

Sasada, T., Kimura, M., Yoshida, Y., Kanai, M., and Takabayashi, A. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. Cancer *98*, 1089–1099.

Sasaki, Y., Sakai, M., Miyazaki, S., Higuma, S., Shiozaki, A., and Saito, S. (2004). Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. Mol. Hum. Reprod. *10*, 347–353.

Sattler, S., Ling, G.-S., Xu, D., Hussaarts, L., Romaine, A., Zhao, H., Fossati-Jimack, L., Malik, T., Cook, H.T., Botto, M., et al. (2014). IL-10-producing regulatory B cells induced by IL-33 (Breg(IL-33)) effectively attenuate mucosal inflammatory responses in the gut. J. Autoimmun. *50*, 107–122.

Saze, Z., Schuler, P.J., Hong, C.-S.S., Cheng, D., Jackson, E.K., and Whiteside, T.L. (2013). Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. Blood *122*, 9–18.

Scalea, J.R., Tomita, Y., Lindholm, C.R., and Burlingham, W. (2016). Transplantation Tolerance Induction: Cell Therapies and Their Mechanisms. Front Immunol *7*, 87.

Scandling, J.D., Busque, S., Dejbakhsh-Jones, S., Benike, C., Millan, M.T., Shizuru, J.A., Hoppe, R.T., Lowsky, R., Engleman, E.G., and Strober, S. (2008). Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation. N. Engl. J. Med. *358*, 362–368.

Schenk, U., Frascoli, M., Proietti, M., Geffers, R., Traggiai, E., Buer, J., Ricordi, C., Westendorf, A.M., and Grassi, F. (2011). ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. Sci Signal *4*, ra12.

Schmidt, A., Oberle, N., and Krammer, P.H. (2012). Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. Front Immunol *3*, 51.

Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. Front Immunol *4*, 152.

Schmitt, E.G., Haribhai, D., Williams, J.B., Aggarwal, P., Jia, S., Charbonnier, L.-M.M., Yan, K., Lorier, R., Turner, A., Ziegelbauer, J., et al. (2012). IL-10 produced by induced regulatory T cells (iTregs) controls colitis and pathogenic ex-iTregs during immunotherapy. J Immunol *189*, 5638–5648.

Schuler, P., Saze, Z., Hong, C.-S.S., Muller, L., Gillespie, D., Cheng, D., Harasymczuk, M., Mandapathil, M., Lang, S., Jackson, E., et al. (2014). Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. Clin Exp Immunol *177*, 531–543.

Seddiki, N., Brigitte, S.-N., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., et al. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. J Exp Med *203*, 1693–1700.

Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C., and Yu, X.-Z.Z. (2011). Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. Blood *117*, 3096–3103.

Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. Immunol Rev *259*, 88–102.

Shi, Z., Okuno, Y., Rifa'i, M., Endharti, A.T., Akane, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2009). Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. Eur. J. Immunol. *39*, 2106–2119.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat. Immunol. *3*, 135–142.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell *68*, 855–867.

Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Reinherz, E.L., and Alt, F.W. (1993). Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. Science *259*, 822–825.

Shino, M., Weigt, S., Li, N., Derhovanessian, A., Sayah, D., Saggar, R., Huynh, R., Gregson, A., Ardehali, A., Ross, D., et al. (2018). The Prognostic Importance of Bronchoalveolar Lavage Fluid CXCL9 During Minimal Acute Rejection on the Risk of Chronic Lung Allograft Dysfunction. Am J Transpl. *18*, 136–144.

Siewe, B., Stapleton, J.T., Martinson, J., Keshavarzian, A., Kazmi, N., Demarais, P.M., French, A.L., and Landay, A. (2013). Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV $CD8^+$ T cell function in vitro. J. Leukoc. Biol. *93*, 811–818.

Smith, G., Mickler, E., Payne, K., Lee, J., Duncan, M., Reynolds, J., Foresman, B., and Wilkes, D. (2007). Lung transplant metalloproteinase levels are elevated prior to bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transpl. *7*, 1856–1861.

Snyder, L.D., CA, F.-C., Turbyfill, W., Howell, D., Willner, D.A., and Palmer, S.M. (2010). Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med *181*, 1391–1396.

Solstad, T., Bains, S.J., Landskron, J., Aandahl, E.M., Thiede, B., Taskén, K., and Torgersen, K.M. (2011). CD147 (Basigin/Emmprin) identifies FoxP3+CD45RO+CTLA4+-activated human regulatory T cells. Blood *118*, 5141–5151.

Somerset, D.A., Zheng, Y., Kilby, M.D., Sansom, D.M., and Drayson, M.T. (2004). Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. Immunology *112*, 38–43.

Spencer, S., Di Marco, F., Hooley, J., S, P.-M., Bauer, M., Ryan, A., Sordat, B., Gibbs, V., and Aguet, M. (1998). The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. J Exp Med *187*, 571–578.

Steele, D.J., Laufer, T.M., Smiley, S.T., Ando, Y., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., and Auchincloss, H. (1996). Two levels of help for B cell alloantibody production. J. Exp. Med. *183*, 699–703.

Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A.H. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood *99*, 2468–2476.

Stephens, L.A., Mottet, C., Mason, D., and Powrie, F. (2001). Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. Eur. J. Immunol. *31*, 1247–1254.

Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M., and Kambayashi, T. (1994). Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. J. Exp. Med. *180*, 2365–2370.

Sun, L., Jin, H., and Li, H. (2016). GARP: a surface molecule of regulatory T cells that is involved in the regulatory function and TGF-β releasing. Oncotarget *7*, 42826–42836.

Sun, X., Wu, Y., Gao, W., Enjyoji, K., Csizmadia, E., Müller, C.E., Murakami, T., and Robson, S.C. (2010). CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. Gastroenterology *139*, 1030–1040.

Süss, G., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. J. Exp. Med. *183*, 1789–1796.

Suwara, M.I., Vanaudenaerde, B.M., Verleden, S.E., Vos, R., Green, N.J., Ward, C., Borthwick, L.A., Vandermeulen, E., Lordan, J., Van Raemdonck, D.E., et al. (2014). Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. Transpl Int *27*, 857–867.

Suzuki, H., Kündig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., and Griesser, H. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. Science *268*, 1472–1476.

Sykes, M. (2017). Immune Monitoring of Transplant Patients in Transient Mixed Chimerism Tolerance Trials. Hum. Immunol.

Taams, L.S., Smith, J., Rustin, M.H., Salmon, M., Poulter, L.W., and Akbar, A.N. (2001). Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. Eur. J. Immunol. *31*, 1122–1131.

Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. J. Exp. Med. *203*, 505–511.

Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R.M., Krummel, M.F., and Bluestone, J.A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. Nat. Immunol. *7*, 83–92.

Thervet, É., Zuber, J., Sberro, R., Canaud, G., Anglicheau, D., Snanoudj, R., Mamzer-Bruneel, M.-F., Martinez, F., and Legendre, C. (2011). Traitements immunosuppresseurs : mécanismes d'action et utilisation clinique. Néphrologie Thérapeutique *7*, 566–581.

Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. J Immunol *184*, 3433–3441.

Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., and Tone, M. (2008). Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. Nat Immunol *9*, 194–202.

Trabanelli, S., Ocadlíková, D., Gulinelli, S., Curti, A., Salvestrini, V., Vieira, R. de P., Idzko, M., Di Virgilio, F., Ferrari, D., and Lemoli, R.M. (2012). Extracellular ATP exerts opposite effects on activated and regulatory CD4+ T cells via purinergic P2 receptor activation. J Immunol *189*, 1303–1310.

Tran, D.Q., Glass, D.D., Uzel, G., Darnell, D.A., Spalding, C., Holland, S.M., and Shevach, E.M. (2009). Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 2929–2938.

Tulunay, A., Yavuz, S., and Direskeneli, H. (2008). CD8+ CD28−, suppressive T cells in systemic lupus erythematosus. Lupus.

Tuovinen, H., Kekäläinen, E., Rossi, L.H., Puntila, J., and Arstila, T.P. (2008a). Cutting edge: human CD4-CD8- thymocytes express FOXP3 in the absence of a TCR. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 3651–3654.

Tuovinen, H., Pekkarinen, P.T., Rossi, L.H., Mattila, I., and Arstila, T. (2008b). The FOXP3+ subset of human CD4+CD8+ thymocytes is immature and subject to intrathymic selection. Immunol Cell Biol *86*, 523–529.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Takahama, Y. (2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. J. Exp. Med. *200*, 493–505.

Uhlig, H.H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fanger, A., Tannapfel, A., Fontenot, J.D., Ramsdell, F., and Powrie, F. (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. J Immunol *177*, 5852–5860.

Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A.W., and ten Berge, I.J.M. (2006). CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 2775–2783.

Van Parijs, L., Biuckians, A., Ibragimov, A., Alt, F.W., Willerford, D.M., and Abbas, A.K. (1997). Functional responses and apoptosis of CD25 (IL-2R alpha)-deficient T cells expressing a transgenic antigen receptor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *158*, 3738–3745.

van de Veen, W., Stanic, B., Yaman, G., Wawrzyniak, M., Söllner, S., Akdis, D.G., Rückert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. (2013). IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. J. Allergy Clin. Immunol. *131*, 1204–1212.

Venkataraman, K., Lee, Y.-M., Michaud, J., Thangada, S., Ai, Y., Bonkovsky, H.L., Parikh, N.S., Habrukowich, C., and Hla, T. (2008). Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. Circ. Res. *102*, 669–676.

Ventura-Aguiar, P., Campistol, J.M., and Diekmann, F. (2016). Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. Expert Opin. Drug Saf. *15*, 303–319.

Vercoulen, Y., Wehrens, E.J., van Teijlingen, N.H., de Jager, W., Beekman, J.M., and Prakken, B.J. (2009). Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells. PloS One *4*, e7183.

Verleden, G.M., Lievens, Y., Dupont, L.J., Van Raemdonck, D.E., De Vleeschauwer, S.I., Vos, R., and Vanaudenaerde, B.M. (2009). Efficacy of total lymphoid irradiation in azithromycin nonresponsive chronic allograft rejection after lung transplantation. Transplant. Proc. *41*, 1816–1820.

Verleden, G.M., Raghu, G., Meyer, K.C., Glanville, A.R., and Corris, P. (2014). A new classification system for chronic lung allograft dysfunction.

Verleden, S.E., Ruttens, D., Vos, R., Vandermeulen, E., Moelants, E., Mortier, A., Van Raemdonck, D.E., Proost, P., Schols, D., Verleden, G.M., et al. (2015a). Differential cytokine, chemokine and growth factor expression in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction. Transplantation *99*, 86–93.

Verleden, S.E., Vasilescu, D.M.M., E, M., John, Ruttens, D., Vos, R., Vandermeulen, E., Bellon, H., Geenens, R., Verbeken, E.K., Verschakelen, J., et al. (2015b). Linking clinical phenotypes of chronic lung allograft dysfunction to changes in lung structure. Eur Respir J *46*, 1430–1439.

Verleden, S.E., Sacreas, A., Vos, R., Vanaudenaerde, B.M., and Verleden, G.M. (2016). Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. Chest *150*, 219–225.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. J. Exp. Med. *199*, 971–979.

Vincenti, F., de Andrés, A., Becker, T., Choukroun, G., Cole, E., González-Posada, J.M., Kumar, M.A., Moore, R., Nadalin, S., Nashan, B., et al. (2006). Interleukin-2 receptor antagonist induction in modern immunosuppression regimens for renal transplant recipients. Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant. *19*, 446–457.

Vlad, G., Cortesini, R., and Suciu-Foca, N. (2008). CD8+ T suppressor cells and the ILT3 master switch. Hum. Immunol. *69*, 681–686.

van der Vlugt, L., Mlejnek, E., A, O.-F., Janssen Bonas, M., Dijksman, T., Labuda, L., Schot, R., Guigas, B., Möller, G., Hiemstra, P., et al. (2014). CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. Clin Exp Allergy *44*, 517–528.

Waldmann, H. (1999). Transplantation tolerance-where do we stand? Nat. Med. *5*, 1245–1248.

Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. Nat. Rev. Immunol. *2*, 11–19.

Walker, M.R., Kasprowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J.H., and Ziegler, S.F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. J. Clin. Invest. *112*, 1437–1443.

Wallis, V.J., Leuchars, E., Chwalinski, S., and Davies, A.J. (1975). On the sparse seeding of bone marrow and thymus in radiation chimaeras. Transplantation *19*, 2–11.

Walter, J.N., Fan, L.L., Bag, R., Zhang, H., Doan, M., Mallory, G.B., and Elidemir, O. (2006). Serum KL-6 as a marker for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. Transplantation *82*, 709–711.

Walunas, T.L., Bakker, C.Y., and Bluestone, J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. J. Exp. Med. *183*, 2541–2550.

Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I.H., Huizinga, T.W.J., and Toes, R.E.M. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. *37*, 129–138.

Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., and Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. Nat. Immunol. *13*, 753–760.

Watanabe, N., Wang, Y.-H.H., Lee, H.K., Ito, T., Wang, Y.-H.H., Cao, W., and Liu, Y.-J.J. (2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. Nature *436*, 1181–1185.

Watanabe, R., Ishiura, N., Nakashima, H., Kuwano, Y., Okochi, H., Tamaki, K., Sato, S.,

Tedder, T.F., and Fujimoto, M. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 4801–4809.

Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science *270*, 985–988.

Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. (2005). Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. Cancer Res. *65*, 5020–5026.

Weigt, S., Ariss, D., Wallace, W., Lynch, J.P., and Belperio, J.A. (2013). Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. Semin Respir Crit Care Med *34*, 336–351.

Weiner, H. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev *182*, 207–214.

Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. J Exp Med *209*, 1723–1742, S1.

White, S.R., Floreth, T., Liao, C., and Bhorade, S.M. (2014). Association of soluble HLA-G with acute rejection episodes and early development of bronchiolitis obliterans in lung transplantation. PLoS ONE *9*, e103643.

Whitehouse, G., Gray, E., Mastoridis, S., Merritt, E., Kodela, E., Yang, J.H.M.H., Danger, R., Mairal, M., Christakoudi, S., Lozano, J.J., et al. (2017a). IL-2 therapy restores regulatory T-cell dysfunction induced by calcineurin inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA *114*, 7083–7088.

Whitehouse, G.P., Hope, A., and Alberto, S.-F. (2017b). Regulatory T-cell therapy in liver transplantation. Transpl Int *30*, 776–784.

Wieczorek, G., Asemissen, A., Model, F., Turbachova, I., Floess, S., Liebenberg, V., Baron, U., Stauch, D., Kotsch, K., Pratschke, J., et al. (2009). Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. Cancer Res *69*, 599–608.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., et al. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. Nat. Genet. *27*, 18–20.

Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S., and Filipovich, A.H. (2002). Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. J. Med. Genet. *39*, 537–545.

Williams, G., Hume, D., Hudson, R., Morris, P., Kano, K., and Milgrom, F. (1968). "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. N Engl J Med *279*, 611–618.

Williamson, R.A., Yea, C.M., Robson, P.A., Curnock, A.P., Gadher, S., Hambleton, A.B., Woodward, K., Bruneau, J.M., Hambleton, P., Moss, D., et al. (1995). Dihydroorotate dehydrogenase is a high affinity binding protein for A77 1726 and mediator of a range of biological effects of the immunomodulatory compound. J. Biol. Chem. *270*, 22467–22472.

Witt, C.A., Gaut, J.P., Yusen, R.D., Byers, D.E., Iuppa, J.A., Bennett Bain, K., Alexander Patterson, G., Mohanakumar, T., Trulock, E.P., and Hachem, R.R. (2013). Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation. J Heart Lung Transpl. *32*, 1034–1040.

Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser,

L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. Cancer Res. *61*, 4766–4772.

Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B., and Kuchroo, V.K. (2008). Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. J Immunol *181*, 2277–2284.

Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. Blood *104*, 3294–3301.

Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Marc, M.-L., Samantha, B.-B., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. J Exp Med. *209*, 1713–1722.

Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2007). Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. Immunity *27*, 145–159.

Yang, M., Deng, J., Liu, Y., Ko, K.-H., Wang, X., Jiao, Z., Wang, S., Hua, Z., Sun, L., Srivastava, G., et al. (2012). IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. Am. J. Pathol. *180*, 2375–2385.

Ye, L., Goodall, J.C., Zhang, L., Putintseva, E.V., Lam, B., Jiang, L., Liu, W., Yin, J., Lin, L., Li, T., et al. (2016). TCR usage, gene expression and function of two distinct FOXP3(+)Treg subsets within CD4(+)CD25(hi) T cells identified by expression of CD39 and CD45RO. Immunol Cell Biol *94*, 293–305.

Ye, Z.-J.J., Zhou, Q., Zhang, J.-C.C., Li, X., Wu, C., Qin, S.-M.M., Xin, J.-B.B., and Shi, H.-Z.Z. (2011). CD39+ regulatory T cells suppress generation and differentiation of Th17 cells in human malignant pleural effusion via a LAP-dependent mechanism. Respir Res *12*, 77.

Yellon, D.M., and Hausenloy, D.J. (2007). Myocardial reperfusion injury. N. Engl. J. Med. *357*, 1121–1135.

Yu, G., Bing, Y., Zhu, S., Li, W., Xia, L., Li, Y., and Liu, Z. (2015). Activation of the interleukin-34 inflammatory pathway in response to influenza A virus infection. Am. J. Med. Sci. *349*, 145–150.

Yudoh, K., Matsuno, H., Nakazawa, F., Yonezawa, T., and Kimura, T. (2000). Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. *43*, 617–627.

Zeiser, R., Nguyen, V.H., Beilhack, A., Buess, M., Schulz, S., Baker, J., Contag, C.H., and Negrin, R.S. (2006). Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. Blood *108*, 390–399.

Zhao, D.-M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J., and Shevach, E.M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. Blood *107*, 3925–3932.

Zheng, S.G., Wang, J.H., Stohl, W., Kim, K.S., Gray, J., and Horwitz, D.A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. J Immunol *176*, 3321–3329.

Zheng, Y., Josefowicz, S., Chaudhry, A., Peng, X.P., Forbush, K., and Rudensky, A.Y. (2010). Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. Nature *463*, 808–812.

Zhou, R., Horai, R., Silver, P.B., Mattapallil, M.J., R, Z.-B., Carlos, Chong, W.P., Chen, J., Rigden, R.C., Villasmil, R., and Caspi, R.R. (2012). The living eye "disarms" uncommitted autoreactive T cells by converting them to Foxp3(+) regulatory cells following local antigen recognition. J Immunol *188*, 1742–1750.

Zhu, H.-Q., Xu, R.-C., Chen, Y.-Y., Yuan, H.-J., Cao, H., Zhao, X.-Q., Zheng, J., Wang, Y., and Pan, M. (2015). Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus. Br. J. Dermatol. *172*, 101–110.

Ziegler, S.F. (2007). FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. Eur. J. Immunol. *37*, 21–23.

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

UNIVERSITÉ DE NANTES

Thèse de Doctorat

Maxim DURAND

Étude de la régulation lymphocytaire T dans deux modèles de transplantation rénale et pulmonaire

Study of lymphocyte regulation in lung and kidney transplantation

Résumé

La transplantation s'accompagne aujourd'hui systématiquement de traitements immunosuppresseurs qui inhibent la réponse allo-immune dirigée contre le greffon afin d'éviter son rejet. Cependant, ces traitements lourds ont de nombreux effets délétères et ne permettent pas de contrôler efficacement la survenue du rejet chronique à long terme. L'objectif de ce travail de thèse, basé sur deux situations cliniques distinctes, s'inscrit dans deux axes prioritaires de la recherche en transplantation : (1) identifier des marqueurs prédictifs de la perte de fonction des greffons pulmonaires et (2) décrypter les mécanismes de l'acceptation des greffons rénaux dans une situation de tolérance opérationnelle. Tout d'abord, nous avons étudié les mécanismes de l'acceptation du greffon, chez des patients transplantés rénaux présentant un greffon fonctionnel en l'absence de traitement immunosuppresseur. Nous avons identifié chez ces patients une proportion plus importante de lymphocytes T régulateurs mémoires circulants, ayant la capacité de dégrader l'ATP extracellulaire et favoriser un état protolérogènique. Ce mécanisme, défaillant chez les patients stables sous traitement, pourrait participer au maintien d'un greffon rénal fonctionnel chez les patients tolérants non traités. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés, chez des patients transplantés pulmonaire, à la prédiction de la survenue du rejet chronique. Nous avons mis en évidence un profil lymphocytaire T régulateur modifié chez les patients qui développeront un rejet chronique à long-terme. Le suivi de ce biomarqueur pourrait permettre une meilleure identification des patients à risque de rejet.

Mots clés

Lymphocytes T régulateurs
Tolérance opérationnelle
Transplantation pulmonaire
Dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire
Transplantation rénale
Fonction ATPasique
Biomarqueur prédictif

Abstract

Transplantation is nowadays systematically associated with the administration of immunosuppressive treatments inhibiting the allo-immune response toward the graft to prevent the rejection by the recipient's immune system. However, these heavy treatments have several deleterious effects and are not able to control long-term chronic rejection development. Thus, the objective of this PhD work, based on two distinct clinical situations, is part of two priority axes of transplant research: (1) identify early predictive markers of long-term lung allograft dysfunction and (2) decipher the mechanisms involved in the acceptance of kidney allograft in operational tolerance. We first investigated the mechanisms of graft acceptance in kidney transplanted patients with a functional graft in the absence of immunosuppressive therapy. We identified in these patients a greater proportion of circulating memory regulatory T lymphocytes, with an increased ability to degrade extracellular ATP, a pro-inflammatory mediator, and favour a pro-tolerogenic environment. Thus, this mechanism, not efficient in stable patients under treatments, could participate in the inhibition of the allo-immune response leading to maintaining a functional kidney graft in the absence of immunosuppression. In a second time, we interested in the prediction of chronic rejection occurrence in lung transplanted patients. We report that the early post-transplant regulatory T lymphocyte profile is modified in patients who will develop chronic rejection in the 3 years. Thus, monitoring this predictive biomarker could allow a better identification of patients at risk of rejection.

Key Words

Regulatory T cells
Operational tolerance
Lung transplantation
Chronic lung allograft dysfunction
Kidney transplantation
ATP degradation
Predictive biomarker