

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE présenté par

Sarah GAILHAC

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Les lymphocytes B régulateurs
dans la polyarthrite rhumatoïde**

Soutenu le 8 juillet 2013 devant le jury suivant :

Thierry Dupressoir – Président
Michael Hahne – Tuteur scientifique
Mireille Rossel – Tutrice pédagogique
Antoine Gross – Rapporteur
Claire Daien – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Michael Hahne (michael.hahne@igmm.cnrs.fr)
Laboratoire de stage
Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier
CNRS-UMR 5535
1919 Route de Mende
34293 Montpellier- Cedex 5 – France

Directeur : Marc Piechaczyk

Et de :

Mireille Rossel (mireille.rossel@univ-montp2.fr)
Laboratoire EPHE
BIOLOGIE CELLULAIRE QUANTITATIVE
Université Montpellier II - INSERM EMI 343
Case courrier 103 – Place Eugène Bataillon
34095 Montpellier Cedex 5

Directeur : Jean-Michel Verdier

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Les lymphocytes B régulateurs
dans la polyarthrite rhumatoïde

GAILHAC Sarah

Soutenu le 8 juillet 2013

RÉSUMÉ

Les lymphocytes B (LB) jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie des maladies auto-immunes et notamment de la polyarthrite rhumatoïde (PR) à cause de leur capacité à produire des anticorps et des cytokines pro-inflammatoires. Un traitement visant à éliminer les LB, le rituximab (anti-CD20) est très efficace pour lutter contre la PR.

Toutefois, un sous-type de lymphocytes B, les LB régulateurs, a été récemment mis en évidence chez la souris. Ce sous-type de lymphocytes B aurait plutôt un rôle protecteur. Les LB régulateurs appelés B10 semblent capables de réguler le système immunitaire via la sécrétion d'une cytokine anti-inflammatoire, l'interleukine 10 (IL10), et l'induction de lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ils peuvent ainsi inhiber les lymphocytes T effecteurs de type Th1 et Th2. Il a été montré, chez la souris, que le transfert de ces cellules permettait de prévenir le développement de l'arthrite. En janvier 2010, ces B10 ont été mis en évidence chez l'homme. Des anomalies qualitatives (diminution de la production d'IL10) ont été retrouvées chez les patients lupiques.

Dans un premier temps, nous avons mis au point la culture des cellules mononucléées du sang afin de générer des B10. Nous avons ensuite recherché le ou les précurseurs des B10 grâce à des tris cellulaires. Nous avons ensuite comparé les B10 d'un groupe de sujets sains avec des patients atteints de PR.

À l'issue de ce travail de recherche, nous avons mis en évidence une diminution des B10 dans la PR et notamment les PR de moins de 5 ans ainsi qu'une corrélation inverse des B10 avec l'activité de la maladie chez ces derniers. Chez les patients qui présentent des auto-anticorps de type facteur rhumatoïde ou anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA), nous avons démontré une corrélation inverse entre le taux sérique de ces auto-anticorps et les B10.

MOTS-CLÉS : Polyarthrite rhumatoïde, lymphocytes B régulateurs, interleukine 10, inflammations, auto-anticorps.

TABLE DES MATIÈRES

I. Introduction

I-A INTRODUCTION GENERALE A L'IMMUNOLOGIE	7
I-A-1 LES SIGNAUX « DANGERS »	7
I-A-2 LA REPOSE INNEE	8
I-A-2-A LES CELLULES PHAGOCYTAIRES	
I-A-2-B LES NATURAL KILLER	
I-A-3 LA REPOSE ADAPTATIVE	10
I-A-4 LES LYMPHOCYTES B	11
I-B LES LYMPHOCYTES B REGULATEURS	13
I-B-1 MÉCANISMES RÉGULATEURS	13
I-B-2 LYMPHOCYTES B1	14
I-B-3 LYMPHOCYTES B TRANSITIONNELS	15
I-B-4 LYMPHOCYTES B MÉMOIRES	16
I-B-5 INDUCTION DES BREGS IN VITRO	17
I-B-5-A DUREE DE CULTURE	
I-B-5-B ACTIVATION VIA LE BCR	
I-B-5-C ACTIVATION VIA LA LIAISON CD40-CD40L	
I-B-5-D ACTIVATION VIA LES TLR	
I-C DEREGLEMENTS DU SYSTEME IMMUNITAIRE : LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE	19
I-C-1 ÉPIDEMIOLOGIE	19
I-C-2 Étiologie	19
I-C-3 DESTRUCTION ARTICULAIRE ET SIGNES CLINIQUES	20
I-C-4 TRAITEMENTS	22
I-D OBJECTIFS	24

Liste des abréviations

ACR : American College of Rheumatology

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

APRIL : A Proliferating Inducing Ligand

B10 : Lymphocytes B IL10+

BAFF : B cell Activating Factor belonging to the TNF Family

BCMA : B Cell Maturation Antigen

BCR : B Cell Receptor

BFA : Bréfeldine A

Bregs : Lymphocytes B régulateurs

BT1/BT2 : Lymphocytes B Transitionnels de type 1 ou de type 2

CBA : Cytometric Beads Array

CD : Cluster of Differentiation

CHO : Chinese Hamster Ovary

CIA : Collagen Induced Arthritis

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPAg : Cellules Présentatrice de l'Antigène

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DAS28 : Disease Activity Score 28

DMARDs : Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DO : Densité Optique

EAE : Experimental Allergic Encephalomyelitis

EFS : Etablissement Français du Sang

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter

FasL : Fas Ligand

GC : Centres germinatifs

HAQ : Health Assessment Questionnaire

Ic : Contrôle isotypique

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LB : Lymphocytes B

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

NK : Natural Killer

NKT : Lymphocytes T Natural Killer

P/S : Pénicilline/Streptavidine

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffer Saline

PD-1/-2 : Programmed death receptor 1 ou 2

PMA : Phorbol-12-myristate-13-acétate

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SDAI : Simple Disease Activity Index

SLE : Systemic Lupus Erythematosus

SVF : Sérum de veau fœtal

TCR : T Cell Receptor

TGF β : Transforming Growth Factor beta

Th : Lymphocytes T helper

TLR : Toll-like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Tregs : Lymphocytes T régulateurs

VS : Vitesse de sédimentation

I-A-2 La réponse innée

La réponse innée ou non spécifique est une protection naturelle, spontanée et polyvalente présente avant tout contact avec un agent pathogène. Les acteurs majeurs de cette réponse sont les cellules phagocytaires et les Natural Killer (NK).

I-A-2-a Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires possèdent des récepteurs permettant de détecter les signaux « danger ». Il s'agit des polynucléaires neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques (DC). Ils participent à la réponse innée par la phagocytose non-spécifique de débris cellulaires ou de pathogènes, mais peuvent activer la réponse adaptative par la présentation d'antigène.

Les DC sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPAg) dites « professionnelles ». Les macrophages possèdent également la propriété de présenter l'antigène, mais seules les DC sont capables d'activer les lymphocytes T naïfs via la liaison du récepteur de co-activation CD28 présent sur les lymphocytes T (LT). Elles jouent un rôle important pour le déclenchement de la réponse adaptative. Elles sont réparties dans tous les tissus en contact avec le milieu extérieur (peau, bouche, ...) où elles jouent le rôle de sentinelle. Elles contrôlent le milieu extracellulaire afin de déterminer la présence de ces signaux. Dans le sang, elles sont peu représentées (0,3% des leucocytes). Elles sont appelées sur un site inflammatoire par l'intermédiaire de chimiokines relâchées soit par l'épithélium soit par des cellules de l'immunité innée, ou par la présence des signaux de danger.

Des études ont montré que les DC interagiraient avec les NK dans le cas d'infection virale ou tumorale. Cette interaction permettrait aux NK de proliférer -lors de la réponse immunitaire anti- et améliorerait leurs fonctions (Cooper M. *et al.* (2004),

I-A-2-b Les Natural Killer

Les cellules NK tirent leur nom de leur capacité de cytotoxicité naturelle. Elles ont été mises en évidence chez la souris où elles exerçaient une activité cytotoxique in vitro contre des cellules Kiessling) tumorales (leucémie) sans stimulation préalable *et al.* (1975),

Ces cellules reconnaissent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou les molécules mimant le CMH I grâce aux nombreux récepteurs présents à leur surface. Les NK exercent leur pouvoir cytotoxique sur des cellules dont l'expression de ces molécules est absente ou déficiente (cellules soumises à un stress, transformées ou infectées) selon la théorie du « missing self » (Kärre K., 1986) mais également sur les pathogènes recouverts d'anticorps (intervention du CD16) produits lors de la réponse adaptative.

Chez l'homme, les NK sont caractérisées par l'absence de TCR et du co-récepteur CD3 et la présence du CD56. Ce dernier marqueur permet de séparer deux sous-populations de NK en présence du CD56. Ce dernier marqueur permet de séparer deux sous-populations de NK en présence du CD56. Ces deux populations expriment faiblement le marqueur CD16 impliqué dans la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Les NK CD56^{bright} fonction de son expression dans la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC). Ces cellules ont une grande capacité à produire des cytokines comme l'interféron γ (γ IFN) mais une faible cytotoxicité. En revanche, les NK CD56^{dim} produisent des cytokines comme l'interféron γ (γ IFN) et expriment fortement le CD16 et ont une capacité cytotoxique élevée via la perforine. Les NK CD56^{dim} expriment le granzyme B mais une faible capacité à sécréter de l'IFN

.environ 90% des NK circulant dans le sang périphérique (Cooper M. *Aet al.* .Poli A ; 2004 ,*et al.*, .(2009

I-A-3 La réponse adaptative

La réponse adaptative, aussi appelée réponse spécifique ou acquise, tire son nom de l'adaptation de l'organisme face à un agent infectieux particulier. Contrairement à la réponse innée, elle demande un temps de latence pour la reconnaissance préalable de l'agent pathogène. Elle se distingue également par la faculté de mémoire de l'organisme, la réponse s'améliorant à chaque nouvelle présentation de l'antigène. Cette réponse est plus intense car plus spécifique.

L'antigène est un petit peptide présenté par les CPAg aux cellules de l'immunité acquise, certains lymphocytes B (LB) et lymphocytes T, qui sont capables de le reconnaître. Les LB activés vont se différencier en plasmocytes et produire des anticorps spécifiques de l'antigène.

Les anticorps sont des protéines de la famille des γ globulines produites par les cellules B différenciées en plasmocytes et plus couramment appelées immunoglobulines (Ig). Elles ont la fonction de reconnaître un déterminant antigénique et de s'y fixer.

Il existe cinq classes d'Ig : IgA, IgD, IgE, IgG et IgM que l'on différencie par leurs chaînes lourdes et leurs fonctions effectrices. L'IgG est l'anticorps le plus présent dans le sérum. L'IgM est un pentamère avec un fort potentiel agglutinant, produit essentiellement pendant la réponse primaire antibactérienne. L'IgA est surtout retrouvée dans les mucus assurant la protection des muqueuses. L'IgE intervient lors d'infections parasitaires et dans les allergies. L'IgD est principalement membranaire chez les LB, elle permet la captation d'antigène par les LB dits « naïfs ».

La liaison antigène/anticorps est donc extrêmement spécifique mais fragile, elle dépend de la complémentarité. Cette liaison peut avoir un effet direct, en inactivant un pathogène ou une toxine. Le plus souvent, la fixation des anticorps sur un agent pathogène fait intervenir le système du complément et les cellules phagocytaires.

I-A-4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes sont produits dans la moelle osseuse où les cellules souches hématopoïétiques sous l'action de divers facteurs de croissance vont se différencier soit en un progéniteur myéloïde (précurseurs des érythrocytes, des polynucléaires, etc.) soit en un progéniteur lymphoïde (précurseurs des LB, des LT et des NK).

Le premier précurseur B est le pré-pro-B et ne possède pas le récepteur antigénique spécifique des LB, le B Cell Receptor (BCR). Il se différencie en pro-B qui lui possède une forme primaire de BCR et exprime le CD19, antigène propre aux cellules B. Arrive ensuite le pré-B avec les gènes des Ig réarrangés et un pré-BCR plus complet. Ces cellules sont exposées aux antigènes du soi afin d'éliminer les cellules auto-réactives par apoptose et restent dans la moelle osseuse jusqu'à leur maturation. Les LB matures passent ensuite dans la circulation sanguine. Ils n'ont jamais rencontré d'antigène pathogène et sont dits naïfs.

L'activation des LB peut se faire de plusieurs manières et dépend de la nature de l'antigène. Le

LB capte un antigène dans le sang et retourne dans les organes lymphoïdes où s'offre à lui deux options.

GENERALEMENT LORSQUE L'AG EST DE TYPE PROTEIQUE, LE LB NECESSITE UNE CO-STIMULATION VIA LE RECEPTEUR CD40 POUR AMPLIFIER LA REPONSE. IL S'ETABLIT ALORS UN CONTACT AVEC LES LT HELPER VIA LE CD40L.

Lorsque l'Ag est plutôt de type polymérique (LPS, glycolipides, acides nucléiques), les LB activés forment des centres germinatifs (GC) et se différencient sans intervention des LT. C'est une activation indépendante des cellules T.

Les GC sont le lieu de l'expansion clonale et du réarrangement des gènes des Ig des LB. Les cellules présentant un BCR de très haute affinité pour l'antigène sortent alors du GC et rejoignent les lymphocytes circulants dans les organes lymphoïdes secondaires. Certaines vont se loger dans la zone marginale et cesser de circuler dans le sang. Ce sont des précurseurs des LB mémoires qui vont rester latents jusqu'à une représentation ultérieure de ce même Ag. Ainsi, à l'apparition secondaire de l'Ag, ces cellules seront mobilisées permettant une réponse spécifique et beaucoup plus rapide que la précédente.

Chez l'homme, le marqueur utilisé pour caractériser ces cellules est le CD27. Il s'agit d'un récepteur de la famille du Tumor Necrosis Factor (TNF) qui interagit avec le CD70 présent sur les LT helper, il est utilisé lors de la différenciation en plasmocytes. Les LB CD27+ représentent 30% des LB du sang parmi lesquels se trouvent 15% de CD27+IgD- dits isotype switched, 15% CD27+IgD+IgM+ dits isotype unswitched et 1% de CD27+IgM+ (Reynaud C. A. et al, 2012). L'origine et les fonctions de ces différents LB mémoires sont assez mal définies.

Différencie jusqu'au stade terminal de plasmocyte, cellule Dans le GC, un autre type de cellule se sécrète d'Ac. Lors de la réponse secondaire, la différenciation en plasmocyte est beaucoup plus rapide et les Ac produits beaucoup plus spécifiques car l'Ag est déjà connu (Ahmed R. & Gray D., Williams L. J-McHeyzer ; 1996 *et al* ; Jacobson K. L. & Tarlinton D. M., 2012-Good ; 2006 , Shlomchik M. J. & Weisel F., 2012

Les lymphocytes B ont plusieurs rôles dans la réponse immunitaire : la production d'anticorps, la présentation de l'antigène, la mémoire de l'antigène et ils participent à l'activation des LT via les récepteurs CD80/CD86 et le ligand OX40 (OX40L).

I-B Les lymphocytes B régulateurs

Les LB participent à la génération et au maintien de la réponse inflammatoire via notamment la présentation d'Ag et la production d'anticorps. Néanmoins, depuis quelques années, des études chez la souris décrivent des LB capables de réguler négativement l'inflammation notamment via la production d'interleukine 10 (IL10).

Ces LB appelés B régulateurs (Bregs) sont issus des lymphocytes B1a (LB CD5+) ainsi que des précurseurs de la zone marginale (MZ) et des B transitionnels de type 2 de la zone marginale (Martin *et al.*, 2001 ; Evans *et al.*, 2007). Il a été montré chez la souris que le transfert de ces cellules permettait de prévenir le développement et même d'améliorer les symptômes de l'arthrite (Evans *et al.*, 2007).

Ces cellules sont de mieux en mieux caractérisées chez la souris et de récentes études cherchent à faire le parallèle chez l'homme. Caractériser le phénotype et les fonctions des Bregs chez l'homme permettrait de comprendre leurs mécanismes de régulation de l'inflammation et peut-être, à terme, de les utiliser en thérapie cellulaire.

I-B-1 Mécanismes régulateurs

Les Bregs sont capables de réguler l'inflammation à travers différents mécanismes.

Actuellement, le Breg le plus décrit est le LB capable de sécréter de l'IL10 (B10). L'IL10 est un inhibant leur sécrétion de cytokines inflammatoire qui agit sur les CPAg en inhibant la stimulation ainsi que sur les LT naïfs en inhibant l'expression des molécules de co-stimulation et inhibant la différenciation en Th1 (acteur de l'inflammation) et la réponse Th2 (Bouaziz J. *et al.* (H., 2011). Noh G. & Lee J ; 2008 ,.

Transforming Growth Factor beta 1). Cette cytokine) 1β Un autre type de Breg sécrète du TGF β joue un rôle crucial dans l'homéostasie des LB et LT en régulant le cycle cellulaire, en favorisant la prolifération de cellules. In vitro, ces Bregs expriment l'activation de certains LT et induisant l'apoptose également Fas ligand (FasL), un membre de la famille du TNF, impliqué également dans l'apoptose (Bouaziz J. *et al.* M-Berthelot J. ; 2008 , *et al.* Ces LB FasL positifs sont (2013 ,. e des LT CD4+, et sont augmentés dans les infections à schistosome capables d'induire l'apoptose (Klinker M. W. & Lundy S. K., 2012)

D'autres Bregs « tueurs » ont été décrits et exercent une activité cytotoxique via la sécrétion de granzyme B, l'expression de TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand) ou l'expression des récepteurs programmed death-1 (PD-1) et PD-2 (Klinker M. W. & Lundy S. K., 2012).

Nous avons ciblé notre étude sur les Bregs exerçant une régulation via la sécrétion d'IL10 (B10). Chez l'homme, les B10 ont été majoritairement décrits parmi les LB transitionnels (BT), les LB mémoires CD24^{hi} et les LB CD5⁺.

I-B-2 Lymphocytes B1

Chez la souris, les LB sont distingués en deux populations selon l'expression de l'antigène CD5, leur fonction. Les lymphocytes B1 sont CD5⁺ tandis que les B2 sont CD5⁻ leur localisation et présentant des marqueurs -population CD5⁻. Cependant, parmi les B1, on distingue une sous-population CD5^{low} CD43⁺ CD23^{high} IgM⁺ et des fonctions en commun avec les B1 CD5⁺ (low CD43+ CD23^{high} IgM)

Ces cellules B1 apparaissent tôt dans le développement, elles sont présentes dans le foie fœtal avant de migrer vers la cavité péritonéale. Elles ont une vie longue et sont capables de production d'anticorps renouvellement. Une des caractéristiques majeures des B1 est la production d'auto-anticorps de type IgM présentant une faible affinité pour un anticorps donné et donc une « naturels dits » polyréactivité (Burastero S. *et al.* Fujimoto M., 2010). Ces anticorps sont utiles dans les réponses ; 1988 ,. aux bactéries ou virus, mais sont aussi impliqués dans les réponses précoces de l'organisme face à l'immunité-phénomène d'auto

Ils sont appelés B10 et sont ^{high}. Parmi ces B1, certains présentent le phénotype CD5+ CD1d^{high}. Ces cellules semblent capables d'influencer la réponse inflammatoire via la sécrétion d'IL10. Ces cellules produisent également l'IL4, l'IL12 (Evans J. G., 2007), capables de produire d'autres cytokines comme l'IFN-γ. Les B10 sont présents dans la cavité péritonéale et dans la rate, 7-10% chez les souris WT, seulement 1-2% dans les ganglions lymphatiques (Yanaba K., 2008). Le transfert de ces B10 chez des modèles d'EAE (Experimental Allergic Encephalomyelitis) a permis d'interférer dans la progression de la maladie (Begum *et al.*, 2010).

Chez l'homme, le marqueur CD5 au sein des LB est mis en évidence en 1986 chez des patients atteints de leucémie lymphoproliférative chronique (Gadol *et al.*, 1986). Il est très présent et est plutôt associé au phénotype des cellules B des enfants de moins de 5 ans (B transitionnelles). Ce marqueur décroît avec l'âge et est corrélé avec l'augmentation des B mémoires (Luning Prak E., 2011). Le CD5 est associé au BCR, il diminue la signalisation intracellulaire (Gouy H., 2002). C'est un marqueur qui peut être à la fois constitutif chez certains LB et inducible chez d'autres.

Les B1 anticorps de type IgM à l'instar des cellules-LB CD5+ humains produisent des auto-anticorps (polyarthrite murine). Ces cellules sont augmentées dans certaines pathologies auto-immunes (Sj-rhumatoïde (PR), lupus érythémateux systémique (SLE) et syndrome de Gougerot (Pottier L., 1988). Différentes études ont montré que la stimulation de ces cellules via le BCR ou avec du PMA ou du LPS induisait la production d'IL10 (Gouy H., 2002; Noh G.; Fujimoto M., 2010; 2002, *et al.*, 2011).

Une récente étude a mis en évidence le phénotype des cellules humaines qui correspondent le plus aux cellules B1 murines. Cette étude s'est basée sur les fonctions principales des B1 murins, à savoir la production d'anticorps naturels (IgM) sans stimulation préalable, la stimulation des cellules à proliférer ainsi qu'une signalisation intracellulaire particulièrement importante (LT) et la capacité à produire des anticorps. Les cellules du sang périphérique présentant toutes ces caractéristiques sont décrites comme possédant les marqueurs CD20, CD27 (lymphocytes B mémoires), CD43 et sont caractérisées par l'absence de marqueurs d'activation CD69 et CD70 (Griffin D., 2011). Ces cellules sont à 75% CD5 positives, mais ne représentent que 34% des LB CD5.

I-B-3 Lymphocytes B transitionnels

LES LYMPHOCYTES B IMMATURES SE DEVELOPPENT DANS LA MOELLE OSSEUSE EN LB TRANSITIONNELS DE TYPE 1 (BT1) PUIS EN LB TRANSITIONNELS DE TYPE 2 (BT2). ILS REJOignent, AU STADE TRANSITIONNEL, LES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES POUR ACHEVER LEUR DIFFERENCIATION DANS LES ZONES MARGINALE ET FOLLICULAIRE DE LA RATE ET DES GANGLIONS.

Les précurseurs transitionnels de type 2 de la zone marginale (T2) produisent de l'IL10. Le transfert de ces cellules chez les souris DBA/1 (modèle d'arthrite induite) a pour effet de prévenir l'apparition de l'arthrite via l'IL10. Seulement 40% des souris traitées développent une arthrite et les lésions observées sont moins sévères que celles observées chez les souris non traitées (Evans J. G., 2007).

peu nombreux (>4% des LB) et leur nombre Les BT circulant dans le sang périphérique sont .décroit avec l'âge (Carsetti *Ret al.* (2004 ,

Chez l'homme, ils sont majoritairement décrits comme CD19+ CD10+ et seraient les producteurs d'IL10 les plus $^{high}IgD^{high}IgM^{-}CD27^{high}CD38^{high}CD24$ Blair P.) high LB. Parmi cette population, 71% des cellules sont CD5+ CD1d compétents parmi les .*Aet al.* Cependant, toutes les cellules présentant le phénotype BT2 ne sont pas des .(2010 , .producteurs d'IL10 (Klinker M. *Wet al.* (2012 ,

immunes. Dans la -de nombreuses maladies auto Ces cellules semblent jouer un rôle dans sclérose en plaque, les patients en rémission présentent une baisse des LB mémoires associée à .CD38 high) (Knippenberg S-une augmentation des BT2 (décrits comme CD27*et al*Chez les .(2011 , ont une capacité immunosuppressive ($^{high}^{high}$ s BT2 (décrits comme CD24patients lupiques, le .défaillante suite à l'activation par le CD40 (Blair P. *Aet al.* (2010 ,

I-B-4 Lymphocytes B mémoires

Les LB mémoires sont caractérisés par la présence du marqueur CD27. Certaines études ont démontré qu'une partie des LB mémoires était capable de sécréter de l'IL10.

.Bouaziz J. D) -Les CD19+CD27+ contiendraient deux à quatre fois plus de B10 que les CD19+CD27 *et aldans* le Cette même équipe démontre que les B10 sont autant enrichis .(2010 , .+compartiment des LB mémoires que dans celui des CD19+CD38

possédant le marqueur CD24 produisent de lohi Une autre étude a démontré que les LB CD27+IgD par les α IL10 en 48h. Et via cette cytokine, ces cellules diminuent la production de TNF .cytes (Iwata Ymono*et al.* (2011 ,

I-B-5 Induction des B10 in vitro

Les LB sécrétant de l'IL10 sont quasiment indétectables dans le sang circulant, les rendant ainsi difficiles à caractériser*in vivo*circulant, sont Ces cellules régulatrices, si elles existent à l'état . probablement appelées à migrer rapidement sur un site inflammatoire ou, plus vraisemblablement, il s'agit de cellules B qui ne sont activées qu'une fois mises en présence d'un microenvironnement ser par un modèleinflammatoire. Il est alors nécessaire de pas*in vitro*et de cultiver les .lymphocytes afin qu'ils produisent de l'IL10

I-B-5-a Durée de culture

Dans les principaux articles traitant des B10 humains, les temps de mise en culture varient, de même que les cellules mises en culture. Certaines équipes caractérisent les B10 en ne mettant que des LB isolés en culture. Ceci implique que ces cellules n'aient besoin d'aucun contact cellulaire afin de produire de l'IL10. D'autres mettent en culture les cellules mononucléées totales, ceci peut également créer un biais si les B10 sont négativement modulés par des cytokines ou directement au contact d'autres types cellulaires.

Ainsi les cellules sont cultivées 12h, 24h, 48h (Iwata Y. *et al.*, 2011 ; Bouaziz J. D. *et al.*, 2010) ou 72h (Blair P. A. *et al.*, 2010 ; Knippenberg S. *et al.*, 2011). Une équipe a observé, comme chez la souris, des B10 après 5h de culture ($0,8 \pm 0,1\%$ des LB) (Iwata Y. *et al.*, 2011).

I-B-5-b Activation via le BCR

L'activation des LB passe par la reconnaissance d'un Ag par le BCR. Cette liaison entraîne une cascade de signalisation intracellulaire menant à l'internalisation de l'antigène, à son traitement et à sa présentation aux cellules T.

Le BCR joue également un rôle dans la maintenance et la survie des LB bien avant la rencontre avec l'Ag. Par exemple, les LB immatures sont générés de manière à exprimer un BCR reconnaissant une grande diversité d'Ag, mais cela crée également des clones potentiellement dangereux pour l'organisme. Ces lymphocytes auto-réactifs peuvent soit être rendus inactifs, soit ré-entrer dans un cycle de réédition du BCR, ou bien être supprimés via le BCR (Niuro H. & Clark E. A., 2002).

Le BCR est composé d'Ig membranaires de type M quand il y en a 5 ou D quand il y en a 4, responsables de la reconnaissance de l'antigène. Il comprend également des domaines cytoplasmiques composés de deux sous-unités formant le motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif). Lors de la liaison de l'Ag au BCR, les tyrosines de chacun des ITAM sont phosphorylées par les kinases associées au BCR. Une autre kinase Syk, se fixe alors sur les résidus phosphorylés afin de déclencher la signalisation aboutissant à l'expansion clonale du LB activé. Il semble que, comme pour les LT, une co-stimulation soit nécessaire (Treanor B., 2012).

La stimulation du BCR a été testée par différentes équipes pour l'obtention des B10 et a montré des résultats contradictoires. Chez la souris, l'activation via le BCR est fortement impliquée dans IgM seul ou couplé avec -ration des B10. Cependant, l'activation via le BCR par de l'antila généré du CD40L tend à diminuer la production d'IL10 (Kalampokis *Iet al.* Iwata I ; 2013 ,*et al.*(2011) , stimulation du BCR avec des Certaines équipes ont réussi à générer des B10 chez l'homme après s .Ig (Bouaziz J. D-antiet *al.*(2010) ,

I-B-5-C ACTIVATION VIA LA LIAISON CD40-CD40L

Une autre manière de stimuler les LB passe via la liaison de leur récepteur CD40 au CD40L. Il s'agit d'une activation T-dépendante. Lors de la présentation de l'Ag par les LB, les lymphocytes T helper reconnaissent le peptide antigénique présenté et il y a une co-stimulation afin d'activer les LT via la liaison du CD28 avec les CD80/CD86. Les LT exprime en réponse à cette stimulation le CD40L qui va activer les LB via le CD40. Ces co-activations vont créer un environnement cytokinique favorable à la prolifération et à l'expansion clonale des LB activés.

pendants. L'équipe de indé-Cette stimulation est plus efficace que la stimulation par les Ag T Claudia Mauri a d'ailleurs montré que cette stimulation permettait de stimuler les B10 en culture .Blair P. A)*et al.* .Borja F-Flores ; 2010 ,*et al.* (2013) ,

I-B-5-d Activation via les TLR

La famille des TLR joue un rôle majeur dans la reconnaissance des PAMP et dans la régulation des réponses innée et adaptative. Les ligands des TLR4 et TLR9, en particulier, sont des modulateurs de la prolifération, de la différenciation et de la fonction effectrice des LB.

Le TLR4 reconnaît le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Ce récepteur est essentiellement décrit à la surface des LB murins qui, après stimulation par son ligand, vont proliférer et se différencier. Chez l'homme, le LPS active la voie NFκB induisant la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Il semble que les LB humains expriment peu ce récepteur à leur surface. Des études ont démontré que les LB humains expriment essentiellement les TLR1, TLR8, TLR9 et TLR10 (Peng SL., 2005).

Le TLR9 est exprimé dans le réticulum endoplasmique des cellules. Il reconnaît le motif CpG non méthylé fréquemment présent dans le génome des cellules procaryotes. Le CpG ODNs utilisé dans nos expériences est un oligodéoxynucléotide (ODN) synthétique contenant un motif CpG. Il produit une réponse immune similaire au motif retrouvé dans l'ADN bactérien. Dans les macrophages et les cellules dendritiques, le CpG est internalisé puis présenté au TLR9 qui va migrer dans un compartiment lysosomal ou endosomal. Une cascade d'activation s'en suit, il en résulte l'activation de la voie NFκB et la transcription de gène codant des protéines pro-inflammatoires. Très peu d'études décrivent le mécanisme d'activation des LB via le TLR9 (Klinman DM., 2004 ; Peng SL., 2005).

Des études ont démontré que des mutations spécifiques dans les gènes codant pour les TLR ou les molécules associées à la signalisation étaient corrélées à certaines maladies chez l'homme. Par exemple, une mutation du TLR4 augmente le risque d'infection aux bactéries à Gram négatif. Cette même mutation est associée à une diminution du risque d'athérosclérose (Cook DN. *et al.*, 2004). Le CpG est utilisé comme adjuvant dans les vaccins, il augmente la rapidité et la puissance de la réponse immunitaire. Il est possible que la stimulation des LB via les TLR permette la survie de LB auto-réactifs et soit impliquée dans les phénomènes d'auto-immunité (Klinman DM., 2004).

cinq fois plus d'IL10 après 48h de -pG) donne vingtIg et du TLR9 ligand (C-L'association d'anti) culture des LB par rapport à des LB dans du milieu seul pour une équipeBouaziz J. D. *et al.*, 2010). L'association du CpG avec le CD40L montre également de bons résultats (Iwata Y. *et al.*, 2011).

I-C Dérèglement du système immunitaire : la polyarthrite rhumatoïde

Le système immunitaire protège l'organisme des dangers via l'inflammation, mais nécessite d'être régulé. Dans certains cas, cette régulation n'est pas suffisante ou absente et l'inflammation persiste. Il peut se produire une rupture de la tolérance et le système immunitaire prend pour cible des Ag qu'il ne reconnaissait pas comme un danger jusque-là.

I-C-1 Épidémiologie

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune qui touche entre 0,4 et 0,8% de la population française (source : fondation arthritis). C'est le rhumatisme inflammatoire chronique le plus fréquent en France. Les sujets atteints sont majoritairement des femmes (quatre femmes pour un homme) et sont diagnostiqués le plus souvent entre 40 et 60 ans. Au-delà de 60 ans, la fréquence est similaire pour les hommes et les femmes. Elle cause un handicap important et peut mettre en jeu le pronostic vital dans les formes les plus sévères.

I-C-2 Étiologie

Les origines de cette pathologie ne sont pas clairement identifiées. Ils semblent que plusieurs facteurs soient impliqués dans l'apparition de la maladie.

Le rôle de facteurs génétiques est fortement envisagé suite à la mise en évidence de deux gènes DR1 et DR4 retrouvés chez près de 80% des patients atteints de PR. Ces gènes sont HLA .notamment impliqués dans l'activation des lymphocytes et la présentation de l'Ag (Feldmann M *et als* présentant des La fréquence de l'allèle HLA DRB1 est augmentée chez les patient .(1996 , .protéines citrullinées (ACPA) et ce de manière dose dépendante-Ac anti

Les ACPA sont présents dans 50 à 70% des cas de PR mais rares chez les sujets atteints d'autres e les protéines modifiées maladies inflammatoires et les sujets sains. Ces Ac sont dirigés contr après la transcription par une conversion enzymatique de l'Arginine en une Citrulline et sont souvent développés avant les symptômes de la PR. Il a été démontré chez le rat que la présence fort effet arthritogénique. Les ACPA sont, à ce jour, un fibrinogène citrulliné avait un-d'Ac anti .des marqueurs immuns les plus pertinents de la PR (Sebbag *Met al* .Klareskog L ; 2004 ,.et al.,. Le facteur rhumatoïde (FR) a longtemps été le seul marqueur, bien qu'il ne soit pas .(2006 hez toutes les PR et présent dans d'autres maladies. Il n'est pas la cause de la PR mais présent c intervient dans son activité. Cet anticorps dirigé contre le fragment Fc des IgG forme des tokines complexes immuns et entraîne l'activation du complément et la synthèse de cy .Feldmann M)*et al.*(1996 ,

Des facteurs hormonaux pourraient expliquer que la maladie touche majoritairement des femmes et particulièrement en période péri-ménopausique. De même, une amélioration de la PR est observée lors de la grossesse ainsi qu'une rechute parfois après l'accouchement.

Les facteurs environnementaux sont également impliqués dans l'apparition de la maladie, le plus connu étant le tabac. Le fait de fumer est un risque surtout chez les personnes possédant des ACPA. Il a été démontré que fumer peut provoquer une citrullinisation de protéines présentes dans les poumons et déclencher l'activation des CPAg.

Des infections par certains agents infectieux ont été fréquemment retrouvées chez les sujets agit notamment d'infection au virus d'Epstein Barr ou de parodontite à'atteints de PR. Il s *Porphyromonas gingivalis* .Mangat P) *et al.*, .M-Quirke A. ; *et al*Cette bactérie possède .(2013 ,.duction des une enzyme capable de citrulliner les protéines qui pourrait être à l'origine de la pro .ACPA par les LB

I-C-3 Destruction articulaire et évaluation de la maladie

Les déformations articulaires observées dans la PR peuvent être impressionnantes. Elles sont caractérisées par une prolifération excessive des cellules synoviales provoquant une hypertrophie de la membrane synoviale appelée pannus.

Cette invasion de l'espace intra articulaire par la membrane synoviale survient suite à une inflammation. Une infiltration massive des cellules immunitaires, particulièrement des LT CD4+, des DC et des macrophages, crée un environnement pro-inflammatoire. L'inflammation chronique de la membrane synoviale provoque à terme une destruction du cartilage puis de l'os. En effet, au sein de la synoviale de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées en excès ainsi que

I-D Objectifs

Les Bregs semblent jouer un rôle important dans la diminution de l'inflammation et notamment dans les maladies auto-immunes. Chez la souris, le transfert de ces cellules permet d'enrayer le processus de développement de différentes pathologies auto-immunes dont l'arthrite.

Afin d'évaluer le rôle des lymphocytes B sécréteurs d'IL10 (B10) dans la polyarthrite rhumatoïde, nous avons tenté de répondre à trois objectifs.

- Nous avons, tout d'abord, mis au point la technique permettant de visualiser *in vitro* des B10 dans les meilleures conditions de culture.
 - UNE FOIS LA CULTURE DES B10 MISE AU POINT, NOUS AVONS CHERCHE A CARACTERISER LES PRECURSEURS DE CES CELLULES.
- NOUS AVONS ETUDIE LES PRECURSEURS DECRITS DES B10 ET LES B10 EN CULTURE DANS LA PR ET CHEZ DES SUJETS SAINS. POUR LES PATIENTS PR, NOUS AVONS ETUDIE L'INFLUENCE DE L'ACTIVITE, DE LA SEVERITE SUR CES PRECURSEURS.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: Understanding their relation. *Science*, 1996 ; 272 ; 54-60.
- Bancos S, Phipps RP. Memory B cells from older people express normal levels of cyclooxygenase-2 and produce higher levels of IL-6 and IL-10 upon *in vitro* activation. *Cell Immunol.*, 2010 ; 266 ; 90-97.
- Begum-Haque S, Christy M, Ocho-Reparaz J, Nowak EC, Mielcarz D, Haque A, Khasper LH. Augmentation of regulatory B cell activity in experimental allergic encephalomyelitis by glatiramer acetate. *J. Neuroimmunol.*, 2011 ; 232 (1-2) ; 136-144.
- Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 2013 ; 80 (1) ; 18-22.
- Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C. 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 (1) ; 129-140.
- Bouaziz JD, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2008 ; 224 ; 201-214.
- Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vailant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, Musette P. IL10 produced by activated human B cells regulates CD4⁺ T-cell activation *in vitro*. *Eur. J. Immunol.*, 2010 ; 40(10) ; 2686-2691.
- Burastero SE, Casali P, Wilder RL, Notkins AL. Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5⁺ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.*, 1988 ; 168(6) ; 1979-1992.
- Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.*, 2004 ; 197 ; 179-191.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat. Rev.*, 2004 ; vol. 5 ; 10 ; 975-979.
- Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.*, 2004 ; vol. 25 ; n°1 ; 47-51.
- Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel Suppressive Function of Transitional 2 B Cells in Experimental Arthritis. *J. Immunol.*, 2007 ; 178 ; 7868-7878.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid Arthritis. *Cell*, 1996 ; 85 ; 307-310.
- Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys : B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008 ; 8(5) ; 391-397.

Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting Th1 and Th17 differentiation. *Sci. Transl. Med.*, 2013 ; vol. 5 ; 173.

Fujimoto M. Regulatory B cells in skin and connective tissue diseases. *J. Dermatol. Sci.*, 2010 ; 60 ; 1-7.

Gadol N, Ault KA. Phenotypic and functional characterization of human Leu1 (CD5) B cells. *Immunol. Rev.*, 1986 ; 93 ; 23-34.

Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood*, 2002 ; vol. 100 ; 13 ; 4537-4543.

Good-Jacobson KL, Tarlinton DM. Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.*, 2012 ; 24 ; n°7 ; 403-408.

Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. *J. Exp. Med.*, 2011 ; vol. 208 ; 1 ; 67-80.

Iwata Y, Matsushita T, Mayuka H, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, Hall RP, St Clair EW, Tedder TF. Characterization of a rare IL-10 competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011 ; 117 ; 530-541.

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

Karre K. Natural Killer Cells recognition of missing self. *Nat. Immunol.*, 2008 ; vol. 9 ; n°8 ; 477-480.

Kiessling R, Klein E, Wigzell H. Natural killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 1975 ; 5 ; 112-117.

KLARESKOG L, PADYUKOV L, RÖNNELID J, ALFREDSSON L. GENES, ENVIRONMENT AND IMMUNITY IN THE DEVELOPMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *CURR. OPIN. IMMUNOL.*, 2006 ; 18 ; 650-655.

Klinker MW, Lundy SK. Multiple mechanisms of immune suppression by B lymphocytes. *Mol. Med.*, 2012 ; 18 ; 123-137.

Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004 ; 4 ; 249-258.

Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J. Reduction in Il-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ration during a relapse but not in remission. *J. Neuroimmunol.*,

2011 ; 239 ; 80-86.

Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008 ; vol. 8 ; p. 279-289.

Le Pottier L, Devauchelle V, Pers J-O, Jamin C, Youinou P. The mosaic of B-cell subsets (with special emphasis on primary Sjögren syndrome). *Autoimmun. Rev.*, 2006 ; 2006 ; vol. 6; 149-154.

Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases : How do they work ? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2009 ; 1173 ; 260-267.

Li X, Braun J, Wei B. Regulatory B cells in autoimmune diseases and mucosal immune homeostasis. *Autoimmunity* 2011; 44 ; 58–68

Luning Prak ET, Ross J, Sutter J, Sullivan KE. Age-Related Trends in Pediatric B-Cell Subsets. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2011 ; 14 ; 45-52.

McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP, McHeyzer-Williams M. Checkpoints in memory B cell evolution. *Immunol. Rev.*, 2006 ; 211 ; 255-268.

Mangat P, Wegner N, Venables PJ, Potempa J. Bacterial and human peptidylarginine deiminases: targets for inhibiting the autoimmune response in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res. Ther.*, 2010 ; 12 ; 209.

Martin F, Kearney JF. B1 cells : similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 2001 ; 13 ; 195-201.

Matzinger P. Tolerance, Danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994 ; 12 ; 991-1045.

Matzinger P. The Danger Model : A Renewed Sense of Self. *Science*, 2002 ; vol. 296 ; 301-305.

Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012 ; 30 ; 221-241.

Niirio H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002 ; 2 ; 945-956.

Noh G, Lee JH. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011 ; 3 ; 168-177.

Peng SL. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005 ; 17 ; 230-236.

Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009 ; 126 ; 458-465.

Quirke AM, Lugli EB, Wegner N, Hamilton BC, Charles P, Chowdhury M, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Potempa J, Culshaw S, Gio Y, Fisher BA, Thiele G, Mikuls TR, Venables PJW. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine

deiminase: a potential mechanism for breaching tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, Published Online First 2013 march 28 ; 0 ; 1-7.

Reynaud CA, Descatoire M, Dogan I, Huetz F, Weller S, Weill JC. IgM memory B cells : a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012 ; 69 ; 1625-1634.

Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, Vincent C, Cornélis F, Roudier J, Serre G. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 2004 ; 71 (6) ; 493-502.

Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.*, 2012 ; 247 ; 52-63.

Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003 ; 2 ; 473-488.

Treanor B. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, 2012 ; 136 ; 21-27.

Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1d^{hi}CD5⁺ Phenotype Controls T-Cell Dependent Inflammatory Responses. *Immunity*, 2008 ; 28 ; 639-650.

Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.*, 2009 ; 182 ; 7459-7472.

Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 2012 ; 491(7423) ; 264-268.