



Action du CTLA4-Ig sur la réponse humorale en Transplantation

Claire Leibler-Romand

► To cite this version:

Claire Leibler-Romand. Action du CTLA4-Ig sur la réponse humorale en Transplantation. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0015 . tel-01743716

HAL Id: tel-01743716

<https://theses.hal.science/tel-01743716>

Submitted on 26 Mar 2018

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

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



Thèse de doctorat

Université Paris Est

Spécialité: Immunologie

Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

**Action du CTLA4-Ig sur la réponse humorale
en Transplantation**

Claire LEIBLER

Jury:

Dr. Flora ZAVALA	Rapporteur
Pr. Julien ZUBER	Rapporteur
Pr. Olivier THAUNAT	Examineur
Dr. Matthieu MAHEVAS	Examineur
Pr. José COHEN	Examineur
Pr. Philippe GRIMBERT	Directeur de thèse

20/07/2017

IMRB: Institut Mondor de Recherche Biomédicales,
INSERM U955 – Equipe 21
Centre d'investigation Clinique Biothérapie
Hôpital Henri Mondor

Remerciements

Je remercie infiniment le Professeur Philippe Lang pour le soutien qu'il m'a constamment apporté depuis mon passage en tant qu'interne dans son service jusqu'au poste de chef de clinique qu'il m'a offert. Merci pour tant de bienveillance à mon égard.

Je remercie Philippe Grimbart de m'avoir guidée à travers les différentes étapes de mon parcours en clinique et en recherche. Ta confiance et ton aide indéfectibles m'ont accompagnée jusqu'à la soutenance de cette thèse. Merci pour ta sérénité dans les moments ardues et ton enthousiasme pour tous les projets y compris celui qui me mène à Pittsburgh !

Je remercie José Cohen, l'âme du laboratoire, pour ses encouragements, ses conseils avisés et les discussions passionnantes. Merci pour cette porte toujours ouverte qui nous invite à venir travailler ou rigoler dans ton bureau et pour les « débriefs » lors des covoiturages vers Paris .

Je remercie infiniment le Dr Flora Zavala et le Pr Julien Zuber qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse, pour toutes leurs remarques et suggestions.

Je remercie infiniment le Pr Olivier Thaumat d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Les conseils qu'il m'a donnés y compris pour mon orientation post-doctorale m'ont été d'une aide très précieuse.

Je remercie le Dr Matthieu Mahévas d'avoir accepté de participer au jury lors de la soutenance finale.

Je remercie également infiniment le Dr Renaud Snanoudj d'avoir évalué mon travail à mi-parcours et pour tous ses conseils.

Merci infiniment à Allan Thiolat pour son implication tout au long de ce projet. Merci d'avoir partagé la joie des résultats « inédits » mais également d'avoir trouvé les paroles rassurantes lors des moments de doute. Nos discussions ont été très stimulantes et primordiales pour la construction du projet. Merci infiniment de m'avoir enseigné connaissances immunologiques et astuces techniques; merci pour ton écoute et ta patience ; merci d'avoir répondu présent même le dimanche à 20h et pour toute ton amitié.

Je remercie également infiniment Carole Hénique pour son aide précieuse pour ce travail et pour toutes nos discussions si riches au cours desquelles nous avons tant de fois perdu la notion d'heure. Merci pour ton coaching dynamique et compréhensif sur tous les fronts (Western blot, écriture de thèse, d'article ...) et les cappuccinos que nous avons partagés.

Je remercie également Caroline Pilon pour ses conseils éclairants souvent décisifs ; merci de gérer l'organisation du labo, grâce à toi tout roule « naturellement ».

Je remercie également le Pr France Pirenne et le Dr Benoit Vingert d'avoir accepté une collaboration pour les manips de co-culture et de m'avoir accueillie dans leur laboratoire devenu ma 2^{ème} maison. Je remercie Marie Tamagne pour toute son aide pour les manips de tri et ses gentilles attentions. Je remercie également Rahma, Marion, Justine, Imane, Alicia et Gwellaouen de l'équipe 2 pour leur accueil chaleureux.

Je souhaite également remercier mes petites sœurs du laboratoire, par ordre chronologique d'apparition : Cynthia, rayon de soleil réunionnais du laboratoire, merci pour ta joie de vivre et ton optimisme à toute épreuve; Audrey, thésarde brillante et dynamique, merci pour les solutions apportées à mes nombreux problèmes informatiques ; merci pour toutes nos séances de rigolades, pour ta sensibilité et pour avoir vécu avec et en face de moi le stress de la fin de thèse ; et enfin Chloé, notre tornade toujours de bonne humeur, merci de m'avoir aidée pour les manips quand le timing devenait vraiment serré et merci d'être toujours partante pour tout (surtout les japonais)! Je suis fière de te passer le flambeau.

Merci aux « garçons du laboratoire »: my dear Sina merci pour ton calme à toute épreuve, ton accueil à bras ouverts au labo et nos discussions sur l'Iran ; Mathieu, merci pour tes blagues mémorables ; merci de nous avoir entraînés pour des expériences culinaires inédites à Créteil « village ou soleil » ; Salim merci d'avoir passé ta petite tête tous les matins à travers la porte pour dire bonjour ; Ismail grâce à tes prélèvements de foie nous avons pu partager quelques fois le L2 le vendredi soir et Jérémy merci pour notre expérience commune au sein de la « team B ».

Merci à Asma pour sa participation lors des réunions, merci également pour toutes les petites douceurs sucrées ramenées de tes voyages.

Merci à Vincent Audard pour ses conseils et son dynamisme contagieux et à Dil Sahali pour ses encouragements. Merci également à Mélanie, Julie, Hamza, Anissa, Violaine et Shao-Yu pour leur soutien (et empathie) ainsi qu'à tous les autres membres de l'équipe 21 élargie.

Je remercie tous mes collègues, toute l'équipe du service de Néphrologie et Transplantation de l'Hôpital Henri Mondor pour leur aide et leurs encouragements et en particulier Marie Matignon qui a dirigé ma thèse de médecine.

Je remercie infiniment Agnès Didier, Marie-Thérèse Legaud et Sylviane Ravato pour leur efficacité à toute épreuve pour l'organisation des prélèvements de patients des Hôpitaux de Mondor, Bicêtre et Tenon.

Un grand merci à l'équipe du CEA de Saint Louis, Nathalie Rouas-Freiss, Catherine Menier, Laure Loumagne, Elodie, Florent, Chantal et Marina pour leur patience lors de mon master 2 et de m'avoir initiée à la recherche.

Merci enfin à ma famille et belle famille de m'avoir chouchoutée (ça me donnerait presque envie de refaire une 3^{ème} thèse...). Merci à cette thèse de m'avoir permis de comprendre et partager la passion de la recherche avec Papa Lu.

Merci enfin à Julien et Lucas, mes deux piliers, pour leur amour.

SOMMAIRE

Table des matières

Remerciements.....	2
SOMMAIRE.....	4
Liste des figures et des tableaux	7
Abréviations.....	8
Résumé.....	10
Introduction	11
I. Greffe : défi immunologique, forces en présence	11
1. Allo-antigènes	12
1.1. Groupe ABO Rhésus	12
1.2. Molécules HLA : principaux allo-antigènes.....	12
2. Réponse innée.....	13
3. Réponse adaptative.....	16
3.1. Allo-antigènes, activation des LT et rejet cellulaire	17
3.2. Anticorps anti-HLA et rejet humoral	20
3.2.1. Arguments en faveur d'une pathogénie du DSA : « la théorie humorale »	20
3.2.2. Rejet humoral.....	22
3.2.3. Mécanismes à l'origine de la pathogénie des DSA.....	24
3.2.4. Chronologie d'apparition des DSA : DSA <i>de novo</i> et DSA historique.....	27
II. Rôle central du lymphocyte B	30
1. LB, professionnel de la sécrétion d'anticorps.	30
1.1 Etapes de différenciation : du précurseur lymphoïde aux effecteurs	31
1.1.1. Reconnaissance de l'antigène	34
1.1.2. Etapes précoces d'activation du LB.....	35
1.1.3. Différenciation extrafolliculaire indépendante des centres germinatifs	37
1.1.4. Différenciation folliculaire dépendante des centres germinatifs	37
1.2 Lymphocytes B mémoires	40
1.3 Plasmablastes et Plasmocytes à longue durée de vie.....	43
2. Collaboration TFH-LB : mécanisme central pour l'établissement de la réponse humorale	46
2.1. Interventions successives des TFH lors de 3 étapes-clé de la différenciation B .	46
2.2. Nature moléculaire du dialogue TFH-LB : identification des partenaires impliqués.....	49

2.2.1.	Interaction CD40L (TFH)/CD40 (LB)	50
2.2.2.	Sécrétion de cytokines : IL-21 et IL-4	51
2.2.3.	Molécules d'adhésion	51
2.2.4.	Molécules de co-stimulation.....	51
2.3.	Induction des TFH.....	52
2.4.	Etude des TFH chez l'homme : identification de TFH circulants.....	54
2.5.	Particularités en TR : organes lymphoïdes tertiaires (OLT)	56
3.	Lymphocytes B régulateurs	58
3.1.	Fonctions	58
3.2.	Caractérisation phénotypique chez l'homme	59
3.3.	Implication des LB régulateurs en transplantation	60
III.	Contrôle des réponses immunitaires par les traitements immunosuppresseurs	62
1.	Généralités et enjeux	62
2.	Différentes classes des traitements immunosuppresseurs	63
2.1.	Les traitements d'induction.....	64
2.1.1.	Anti-thymocytes (Thymoglobuline).....	64
2.1.2.	Anti-CD25 (Basiliximab)	64
2.1.3.	Anti CD52 (Alemtuzumab)	65
2.1.4.	Bolus de corticoïdes	65
2.2.	Les traitements d'entretien	65
2.2.1.	Les anticalcineurines (CNI).....	65
2.2.2.	Mycophenolate Mofetil (MPA).....	65
2.2.3.	Les inhibiteurs de mTOR (Sirolimus et Everolimus)	66
2.2.4.	Les inhibiteurs des molécules de co-stimulation (Belatacept)	66
3.	Mode d'action sur le lymphocyte B	67
4.	Le CTLA4-Ig	69
	Problématique.....	72
	Résultats	74
	Discussion	109
I.	Modulation directe du CTLA4-Ig de la réponse humorale B	110
1.	Mise au point du modèle d'activation in vitro	110
2.	Action directe : nature et cible	110
3.	Mécanismes à l'origine de l'inhibition de la réponse humorale par le CTLA4-Ig.....	112
4.	Remodelage de l'expression des molécules de costimulation.....	116

II. Modulation par le CTLA4-Ig des capacités stimulatrices des LB dans la synapse TFH-LB	118
1. Rôle de la signalisation CD28/CD80-CD86 pour l'activation des TFH.....	118
2. Rôle de la collaboration TFH-LB dans l'établissement des réponses humorales.....	120
Conclusion.....	124
Référence.....	125
ANNEXES	148
I. ANNEXE 1 : Mécanismes des traitements immunosuppresseurs sur l'allo-immunisation après transplantation rénale (Revue)	149
II. ANNEXE 2 : Augmentation de fréquence des LB naïfs et transitionnels chez les patients transplantés rénaux après traitement par Belatacept (Article).....	161

Liste des figures et des tableaux

Figure 1: Induction et maintien de l'inflammation après transplantation d'organes.....	15
Figure 2: Trois voies de reconnaissance des allo-antigènes.	17
Figure 3: Mécanismes du rejet cellulaire.....	19
Figure 4: Histoire naturelle de la dysfonction chronique « humorale » du greffon.....	23
Figure 5: Développement du LB et marqueurs de différenciation.....	32
Figure 6: Mécanisme de reconnaissance de l'antigène.....	34
Figure 7. Collaboration TFH-LB, étape centrale pour la différenciation des LB activés en effecteurs.....	36
Figure 8: Rôle de la collaboration TFH-LB lors de différentes phases de la réponse humorale.	47
Figure 9: Mécanismes d'enchevêtrement/d'emboîtement entre TFH et LB dans les CG.	48
Figure 10: Interactions moléculaires fondamentales pour la collaboration TFH-LB des CG.....	50
.Figure 11: Cibles théoriques des différentes classes des traitements immunosuppresseurs pour inhiber l'activation du lymphocyte T.....	67
Figure 12 : Conséquences du Belatacept (CTLA4-Ig) sur les mécanismes de co-stimulation lors de la synapse immunologique.....	70
Figure 13: Mécanismes d'action potentiels du CTLA4-Ig.....	116
Figure 14: Remodelage des molécules de co-stimulation à la surface des LB et conséquences « théoriques » /« potentielles » pour le dialogue avec les TFH.	117
 Tableau 1 : Principales caractéristiques des plasmablastes et PC à longue durée de vie	43
Tableau 2: Principales caractéristiques des LB régulateurs isolés chez l'homme	59
Tableau 3: Association inverse entre fréquence des LB régulateurs et risque de rejet....	61
Tableau 4 : Mode d'action des différentes classes thérapeutiques sur les différentes fonctions des LB <i>in vitro</i>	68

Abréviations

ABM	Agence de la Biomédecine
ADCC	<i>Antibody-Dependent-Cell mediated Cytotoxicity</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AID	<i>Activation-induced cytidine Deaminase</i>
APRIL	<i>A-Proliferation-inducing ligand</i>
BAFF	<i>B-cell activation factor</i>
Bcl6	<i>B-cell-Lymphoma 6</i>
BCMA	<i>B cell Maturation Antigen</i>
BCR	Récepteur des LB
Blimp-1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
CG	centre germinatif
CNI	Inhibiteurs de la calcineurine, anti-calcineurine
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
cTFH	T folliculaire helper circulants
CTL	Lymphocytes CD8 cytotoxiques
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
CXCR	<i>Chemokine receptor</i>
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DC	cellules dendritiques
DSA	Anticorps anti HLA dirigés contre le donneur
Fcy	Fragment gamma constant des IgG
FcγR	Récepteur du fragment constant des IgG
FDC	Cellules Dendritiques Folliculaires
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
ICAM1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
ICOS	Inducible T-cell co-stimulator
ICOSL	<i>Inducible T-cell co-stimulator ligand</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	interleukin
IRF4	<i>interferon regulatory factor-4</i>
LB	Lymphocyte B
LCT	Lymphocytotoxicité
LFA1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i>
LFA1	<i>Leukocyte-Function Associated Antigen-1</i>
LT	Lymphocyte T
MPA	Mycophenolate Mofetil
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MyD88	<i>Myeloid Differentiation factor 88</i>
NK	cellules <i>Natural Killer</i>
OLS	Organe Lymphoïdes Secondaires

OLT	Organe Lymphoïdes Tertiaires
Pax5	<i>Paired box protein 5</i>
PD1	Programmed cell death-1
PDL1	Programmed cell death Ligand-1
PDL2	Programmed cell death Ligand-2
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
SEB	Enterotoxine staphylococcique de type B
SLAM	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TFH	Lymphocyte T folliculaire Helper
TIM1	<i>T cell immunoglobulin mucin</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF α	Tumor Necrosis alpha
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VCAM1	<i>vascular cell-adhesion molecule 1</i>
XBP1	<i>X box binding protein 1</i>

Résumé

La réponse alloimmune de type humorale et en particulier l'apparition *de novo* d'anticorps anti HLA dirigés contre le donneur (*dnDSA*) après une transplantation rénale sont maintenant reconnues comme la principale cause de perte de greffon d'origine immunologique. Définir les meilleures stratégies immunosuppressives pour prévenir ou limiter l'apparition des *dnDSA* est donc devenu un objectif majeur en pratique clinique. Des études cliniques récentes utilisant le nouvel agent immunosuppresseur bloquant le signal de co-stimulation, le CTLA4-Ig (Belatacept), ont montré que les patients transplantés rénaux traités par Belatacept présentaient de meilleures survies et fonctions des greffons associées à une incidence réduite de *dnDSA* par rapport aux receveurs contrôles traités par anticalcineurines (CNI). Les mécanismes impliqués dans le contrôle des réponses humorales par le CTLA4-Ig n'ont pas encore été élucidés. Notre travail de thèse a pour objectif d'analyser l'effet du CTLA4-Ig sur différentes étapes de la réponse B *in vitro* et *in vivo* chez l'homme. Nous montrons d'abord que le CTLA4-Ig diminue la différenciation des plasmablastes et la production d'immunoglobulines (Ig), sans intervention des lymphocytes T *in vitro*. L'expression du principal facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la fonction des plasmablastes, Blimp-1, est également significativement diminuée en présence du CTLA4-Ig. De plus, la diminution d'expression de CD86 en présence de CTLA4-Ig suggère une signalisation directe intracellulaire dans les LB *via* ce récepteur. Dans un second temps, nous montrons que le CTLA4-Ig inhibe la collaboration entre les lymphocytes T folliculaires helper (TFH) et les lymphocytes B (LB). Le CTLA4-Ig bloque l'activation des TFH et la différenciation des LB en plasmablastes dans un modèle de co-culture autologue TFH-LB mémoires *in vitro*. Enfin, nous confirmons *in vivo* ces résultats en montrant que les patients transplantés rénaux traités par CTLA4-Ig présentent une plus faible proportion de LB effecteurs (mémoires et plasmablastes) circulants ainsi que de TFH activés (TFH PD1+ICOS+) par rapport aux patients traités par CNI. Au total, nos résultats suggèrent deux modes d'action originaux permettant au CTLA4-Ig de contrôler efficacement les réponses humorales allogéniques (i) par son action sur la capacité de sécrétion d'Ig des LB effecteurs exprimant le CD86, et donc en particulier des plasmablastes mais également (ii) par son action sur la synapse TFH-LB permettant de diminuer l'activation des TFH et d'inhiber la différenciation terminale des LB. Ces résultats ouvrent des perspectives thérapeutiques en transplantation mais également dans le domaine de l'autoimmunité.

Introduction

La transplantation rénale constitue aujourd'hui le traitement de référence de la maladie rénale chronique au stade terminal. Par comparaison avec les autres traitements (hémodialyse, dialyse péritonéale), elle offre aux patients une meilleure espérance de vie mais également une meilleure qualité de vie (Pinter et al., 2017; Tonelli et al., 2011; Wolfe et al., 1999). Malgré des progrès considérables réalisés au cours des 40 dernières années, la transplantation rénale constitue toujours de nos jours un défi immunologique, nécessitant le recours permanent à des thérapeutiques immunosuppressives lourdes, sources d'une importante morbi-mortalité.

I. Greffe : défi immunologique, forces en présence

L'implantation du greffon va déclencher l'activation du système immunitaire du patient receveur car il sera reconnu comme « étranger ». Les allo-antigènes sont les molécules portées par le greffon, caractéristiques du donneur, qui seront reconnues comme « non-soi » par le système immunitaire du receveur et induiront son activation. Celle-ci aura pour objectif de détruire le greffon en l'absence d'intervention thérapeutique. L'attaque du système immunitaire du receveur contre le greffon est appelée rejet. Elle se manifeste par des lésions histologiques responsables d'une altération de la fonction du greffon.

Ainsi le rejet du greffon, que nous cherchons à prévenir, est la conséquence (« la dernière étape ») d'un processus coordonné d'activation de l'ensemble des partenaires du système immunitaire inné et adaptatif, déclenché par les allo-antigènes du greffon.

1. Allo-antigènes

Les molécules HLA et le groupe ABO sont les principaux allo-antigènes dont « l'incompatibilité » entre donneur et receveur déclenche l'activation du système immunitaire du receveur et entraîne un rejet du greffon.

1.1. Groupe ABO Rhésus

Il existe 4 groupes ABO et 2 principaux groupes Rhésus. Les antigènes A et B sont des épitopes glucidiques (saccharidique) de glycoprotéines ou glycolipides présents à la surface de la plupart des tissus, et en particulier des érythrocytes et des cellules endothéliales. L'appariement du groupe entre donneur et receveur est en général la règle.

1.2. Molécules HLA : principaux allo-antigènes

Le système HLA (*human leukocyte antigen*) a été décrit par Jean Dausset en 1958 (Dausset, 1958). Il existe deux classes de molécules HLA : les molécules de classe I présentes à la surface de toutes les cellules nucléées et les molécules de classe II présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigène, et de façon inductible à la surface des lymphocytes T activés et des cellules endothéliales principalement. A l'échelle d'un individu, ces molécules hautement polymorphiques ont pour fonction de présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes T.

Le système HLA présente donc une grande diversité du fait de 2 propriétés majeures. Le système HLA est

- **Polygénique** : les molécules de classe I et II sont codées par trois gènes (A,B,C et DR,DQ,DP respectivement), correspondant à 3 types de molécules HLA différentes. Chaque individu exprimera à la surface de ces cellules un « assortiment » de molécules HLA, composé d'au moins 3 molécules de classe I différentes et 3 molécules de classe II.

- **Polymorphique** : il y a de plus plusieurs versions de chacun de ces gènes et l'expression de chaque allèle est co-dominante. La plupart des individus sont hétérozygotes pour chaque gène de Classe I et II, ce qui signifie que chaque individu co-exprime deux allèles (maternel et paternel) différents de chaque gène à la surface de ses cellules soit 12 molécules HLA différentes au total.

Cependant les 6 gènes codant pour les molécules HLA de classe I et II sont portés par le même chromosome. Chaque parent transmettra donc une copie (soit une combinaison originale de 6 allèles de molécules HLA) à son enfant. Ainsi chaque enfant partagera avec chacun de ses parents 50% de compatibilité. Au sein d'une famille, la probabilité d'une identité HLA entre frères ou sœurs est d'une chance sur 4.

Malgré cette transmission en bloc, il est extrêmement difficile de trouver un « jumeau HLA » (*i.e.* une compatibilité parfaite) pour les 12 allèles HLA de chaque patient. Ainsi, du fait de ce polymorphisme, l'appariement HLA entre donneur et receveur en greffe d'organe est souvent imparfait. L'évaluation du nombre d'incompatibilités HLA entre donneur et receveur a récemment été réalisée par Williams *et al.* sur une cohorte de 189141 patients greffés rénaux pour la première fois entre 1987 et 2013, à partir des fichiers nationaux américains UNOS *Standard Transplant Analysis and Research Database*. Leur analyse s'est concentrée sur l'étude de 3 gènes HLA : A, B et DR. La répartition des patients en fonction de leur nombre d'incompatibilité avec le donneur était comme suit : 8,4% ; 3,6% ; 7% ; 16,5% ; 25,8% ; 26,1% et 12,6% pour 0, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 incompatibilités respectivement (Williams et al., 2016). Autrement dit, 80% des patients ont au moins 30% d'incompatibilité HLA avec leur donneur.

Les incompatibilités de système HLA entre le couple donneur-receveur sont à l'origine de l'activation des différents partenaires du système immunitaire impliquant à différents degrés les réponses dites innées et adaptatives (Erlich et al., 2001).

2. Réponse innée

La réponse innée, première barrière de l'organisme contre les agents pathogènes, est une réponse « non spécifique », forte et immédiate.

Bien qu'elles initient les réponses alloimmunes, l'implication des réponses innées en transplantation est moins connue que celle des réponses adaptatives (Braza et al., 2016). Elles sont principalement déclenchées par le processus d'ischémie-reperfusion qui est une séquence inhérente et inéluctable du geste chirurgical de la greffe. Ce processus est la conséquence de l'exclusion de la circulation sanguine du greffon lors du prélèvement (phase ischémique) et de l'afflux brutal de sang dans le greffon lors de l'anastomose des vaisseaux au moment de la greffe (phase de reperfusion). Le délai entre ces deux phases est appelé ischémie froide.

L'ischémie-reperfusion est alors responsable d'une nécrose du greffon, qui en libérant des signaux de dangers, va déclencher une inflammation c'est à dire l'activation de la réponse innée (figure 1). A la surface des cellules de l'immunité innée sont en effet présents des récepteurs spécifiques, les *Pattern Recognition Receptors* (PRR), dont font partie les *Toll-like receptors* (TLR), qui reconnaissent des molécules aux motifs conservés produites par des dommages tissulaires, les *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Cette liaison déclenche différentes cascades de signalisation impliquant à divers degrés la molécule adaptatrice intracellulaire MyD88 (*Myeloid Differentiation factor 88*) (Janeway and Medzhitov, 2002).

Les TLR, récepteurs spécialisés des réponses innées et de l'inflammation, semblent ainsi jouer un rôle important (mais encore peu étudié) dans le déclenchement et l'orchestration des réponses immunitaires après transplantation (Braza et al., 2016). Les modèles murins de greffe rénale ont permis de montrer que les lésions d'ischémie-reperfusion induisaient une expression rénale du TLR4 au niveau des cellules épithéliales, endothéliales et des leucocytes infiltrant le greffon (Wu et al., 2007). L'inhibition des signaux intracellulaires des TLR diminue le risque de rejet cellulaire dans un modèle de greffe de peau murine (en incompatibilité mineure HLA) et entrave la migration et maturation des cellules dendritiques (DCs) vers le ganglion drainant (Shen et al., 2013). De plus, l'inhibition de la signalisation des TLR participerait à l'induction d'une tolérance des greffons, c'est à dire à leur acceptation permanente par le système immunitaire du receveur en l'absence d'intervention thérapeutique continue (Walker et al., 2006). En effet, l'inhibition de MYD88 associée à une stratégie de blocage de la co-stimulation (par un anti-CD154) induit la tolérance d'une greffe de peau (Chen et al., 2006). De façon concordante, l'étude des patients tolérants opérationnels, c'est à dire de

patients transplantés rénaux ayant une fonction rénale stable en l'absence de traitements immunosuppresseurs suggère une association entre l'expression de TLR4, MYD88 et la survie des greffons à long terme (Braudeau et al., 2008).

Ce signal de « danger », induit par les TLR, seul ne semble cependant pas suffisant pour induire une activation « complète » du système immunitaire et aboutir au rejet de greffe. La comparaison de 2 modèles de greffe syngénique et allogénique a permis de montrer récemment qu'une reconnaissance des allo-antigènes comme « non soi » par le système immunitaire inné du receveur, notamment par les monocytes, était nécessaire pour activer « pleinement » les réponses immunitaires et notamment des cellules dendritiques (Oberbarnscheidt et al., 2014).

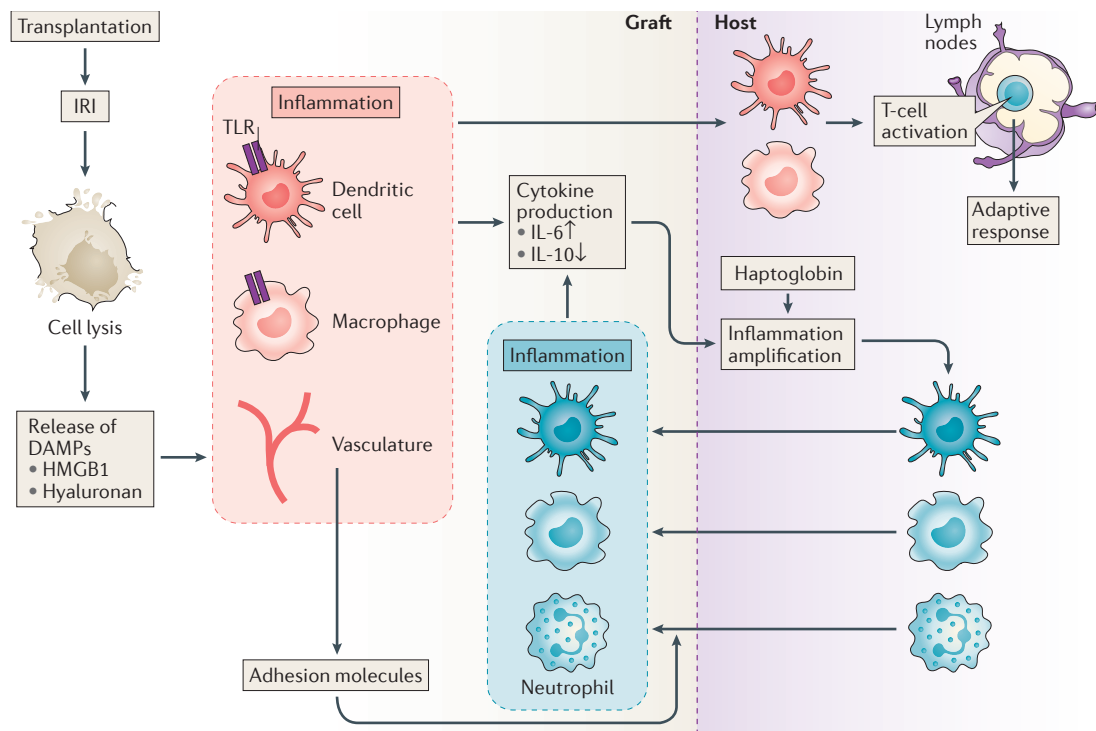


Figure 1: Induction et maintien de l'inflammation après transplantation d'organes.

Les lésions d'ischémie-reperfusion (IRI) vont aboutir à une nécrose des cellules du greffon libérant des signaux de dangers DAMPs. Ces signaux reconnus par les TLR présents à la surface des cellules de l'immunité innée du donneur vont déclencher une inflammation locale qui va (i) attirer les cellules immunitaires du receveur qui amplifieront la réaction inflammatoire locale (ii) induire la migration des DC du donneur (et du receveur) vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur, déclenchant les réponses adaptatives (tiré de Braza F et al. Nat Rev Nephrol 2016).

La compréhension des mécanismes contrôlant l'activation des réponses innées (implication des TLRs ; mécanismes de reconnaissance du « non soi » par les monocytes) reste un enjeu majeur qui pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

3. Réponse adaptative

Deux propriétés fonctionnelles caractérisent les réponses adaptatives: elles sont en effet spécifiques d'un antigène et responsables des réponses mémoires et incluent deux partenaires, les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). La rencontre de ces partenaires avec leur antigène spécifique est une étape primordiale pour initier leur activation. Ces réponses immunitaires adaptatives spécifiques des allo-antigènes sont essentiellement déclenchées par des réponses innées qui ont la double capacité de présenter les allo-antigènes et de fournir les signaux d'activation nécessaires aux LT et LB. La rencontre entre les réponses innées et adaptatives s'effectue principalement dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) et implique donc une migration des partenaires de l'immunité innée. En particulier, l'activation et la migration des cellules dendritiques (du donneur et du receveur) vont permettre d'initier l'activation des LT (Zhuang and Lakkis, 2015).

Traditionnellement, les LT ont été considérés comme les principaux acteurs des réponses adaptatives car ils sont à l'origine du rejet cellulaire du greffon. Le rejet cellulaire est défini de façon histologique par une infiltration cellulaire au niveau de l'interstitium, des tubules (nommée tubulite) et parfois de l'intima des vaisseaux (nommée artérite) (Loupy et al., 2017). Cette réponse immune, appelée réponse cellulaire, a longtemps été considérée comme largement dominante dans les phénomènes de rejet d'allogreffe et son contrôle a été le principal objectif des premières stratégies immunosuppressives. Les travaux cliniques et expérimentaux réalisés au cours des dernières années ont néanmoins soulignés l'importance majeur de la réponse humorale induite par les LB notamment de part leur capacité à sécréter des anticorps anti HLA dirigés contre le greffon (DSA). Ces phénomènes de rejet appelés humoraux et longtemps sous-estimés, sont maintenant reconnus comme la principale cause de perte des greffons. Aujourd'hui les interactions/collaborations entre ces deux partenaires du

système adaptatifs (LT et LB) apparaissent comme primordiales pour notre compréhension la plus complète de la physiopathologie du rejet du greffon.

3.1. Allo-antigènes, activation des LT et rejet cellulaire

La reconnaissance des allo-antigènes HLA par les LT conditionne leur activation précoce et représente donc une des étapes clés menant au rejet cellulaire. Les allo-antigènes sont en fait présentés aux LT sous trois formes. Ces trois modes de présentation vont ainsi cibler/activer un large spectre de clones T. On parle des voies de présentation directe, indirecte et semi-indirecte (Figure 2) (Ali et al., 2013).

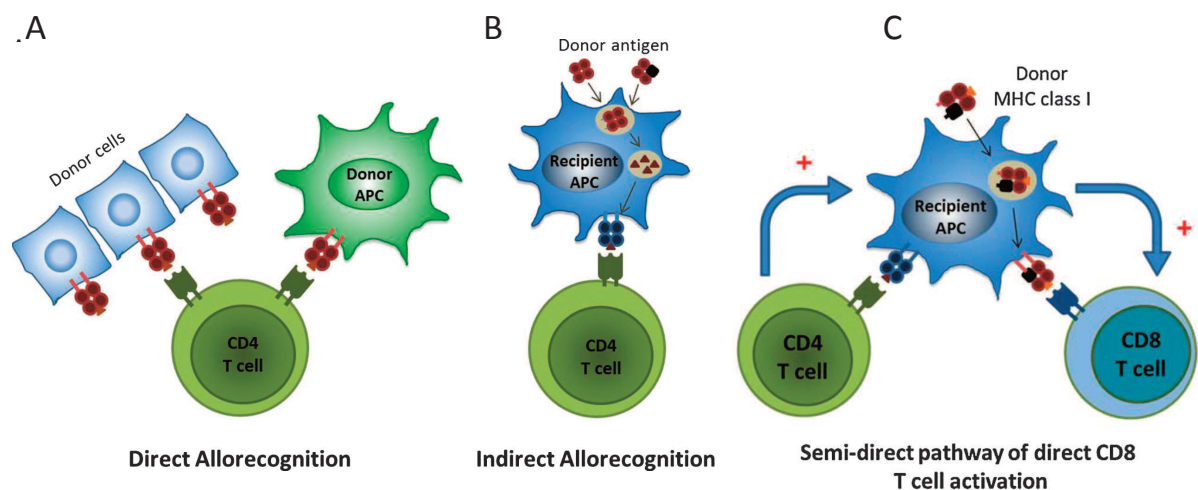


Figure 2: Trois voies de reconnaissance des allo-antigènes.

2A : Mécanisme de reconnaissance directe, le récepteur T (TCR) des CD4⁺ du receveur va reconnaître le complexe « molécule HLA + peptide » allogénique du donneur, présent à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) ou des cellules endothéliales. **2B :** Mécanisme de reconnaissance indirecte, les APC du receveur vont internaliser les molécules HLA du donneur, les « digérer » et présenter les épitopes antigéniques des molécules HLA du donneur par l'intermédiaire des molécules HLA du receveur. **2C,** reconnaissance semi-directe, les CPA du receveur internalisent les molécules HLA du donneur et les présentent dans leur intégralité à leur surface (sans « digestion » et donc sans restriction aux molécules HLA du receveur). (Tirée de Ali J. Transplantation 2013).

Lors de l'allo-reconnaissance directe, les LTs allo-réactifs du receveur vont reconnaître dans son entièreté la molécule HLA du donneur présente à la surface des DCs du donneur qui auront migré dans les ganglions drainants du receveur, et ce malgré la restriction théorique au système HLA (Larsen et al., 1990). Il est important de noter que la fréquence de ces clones allo-réactifs est en fait très élevée (1 à 10%) comparativement aux fréquences de LT spécifiques d'un antigène (un LT spécifique pour 10^5 ou 10^6 LT totaux) (Nankivell and Alexander, 2010).

Dans la voie indirecte, les DCs du receveur viennent dégrader les épitopes antigéniques HLA du donneur dans le greffon, puis migrent secondairement dans les ganglions drainants pour activer de façon classique les LTs du receveur (contexte de restriction CMH) (Mandelbrot et al., 1999).

Une 3^{ème} voie de reconnaissance a été décrite : il s'agit de la voie de reconnaissance semi-directe lors de laquelle les DC du receveur expriment à leur surface la molécule HLA du donneur dans son entièreté (Herrera et al., 2004; Sivaganesh et al., 2013).

Les LT CD4⁺ allo-réactifs activés par ces différentes voies vont ensuite participer à :

- (i) l'activation et la migration dans le greffon de LT CD8 cytotoxiques (CTL) allo-réactifs, responsables des lésions histologiques de rejet cellulaire généralement aigu. En effet, ces CTL sont capables d'induire une destruction des cellules parenchymateuses du greffon *via* 2 mécanismes illustrés Figure 3: la libération de perforine induisant des pores membranaires et l'induction d'une mort cellulaire par le système Fas/FasL (Barry and Bleackley, 2002; Nankivell and Alexander, 2010). L'activation des CTL s'effectuerait principalement par collaboration avec les LT CD4⁺ allo-réactifs activés par voie directe ou semi-indirecte (Ali et al., 2013).

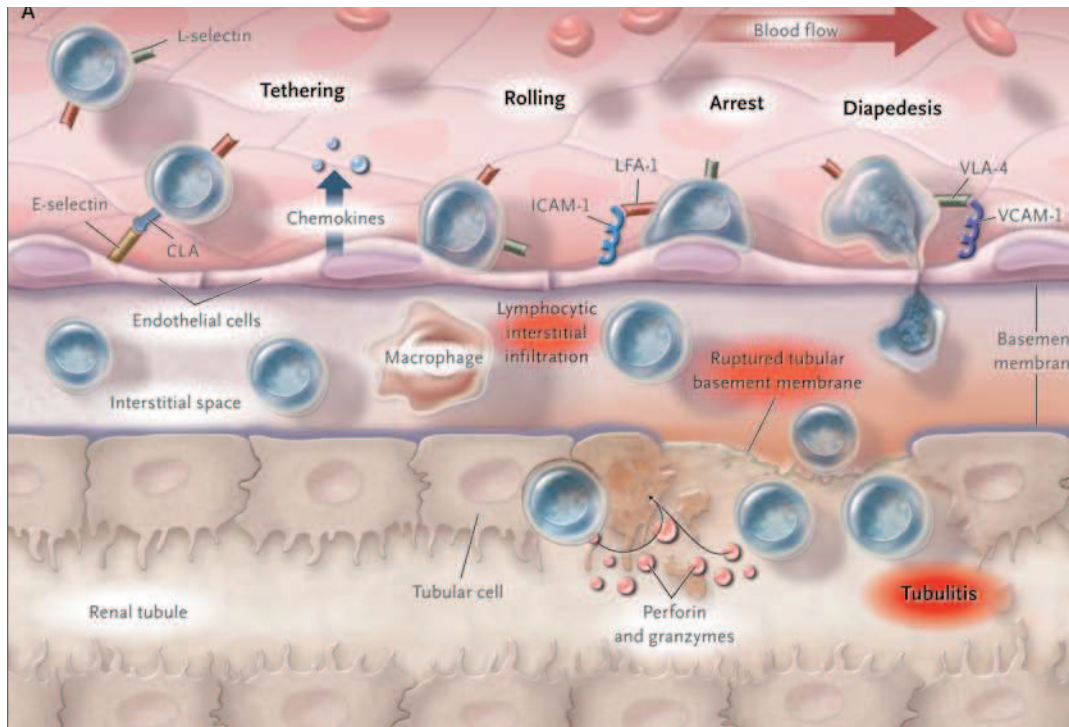


Figure 3: Mécanismes du rejet cellulaire.

Les LT CD8+ cytotoxiques (CTL) arrivent grâce au capillaire périrubulaire dans le greffon. Grâce à jeu subtil de modification d'expression des molécules d'adhésion (importance de LFA1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1), notamment) induit par les chimiokines, les CTL vont subir chronologiquement un ralentissement, un phénomène de « rolling », puis un arrêt complet précédant leur entrée dans le greffon par diapédèse entre les cellules endothéliales. Ils vont alors infiltrer l'espace interstitiel puis tubulaire, après rupture de la membrane basale, induisant alors la destruction des cellules tubulaires. L'inflammation de l'interstitium et la tubulite sont ainsi les deux signes cardinaux du rejet cellulaire (Tiré de Nankivell, NEJM 2010 : mécanismes du rejet cellulaire).

- (ii) l'induction par voie de reconnaissance indirecte de LT « professionnels », les lymphocytes T folliculaire helper (TFH), capables de collaborer avec les LB pour induire une réponse anticorps anti-HLA (Conlon et al., 2012). Cette voie de reconnaissance indirecte participe donc plus spécifiquement au rejet humoral.

3.2. Anticorps anti-HLA et rejet humoral

3.2.1. Arguments en faveur d'une pathogénie du DSA : « la théorie humorale »

En dehors de l'attaque du greffon par les LT dans le cadre du rejet cellulaire, un autre mécanisme immunologique peut être responsable de sa destruction. Très précocement, les transplantateurs ont en effet été confrontés au rejet hyperaigu qui se manifeste par une nécrose brutale du greffon dans les minutes qui suivent le déclampage des vaisseaux du greffon chez le receveur (Starzl et al., 1968). Les anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur (DSA) pré formés avant la greffe ont été identifiés comme responsables de ce rejet hyperaigu (Stetson and Demopoulos, 1958; Terasaki et al., 1962). En effet, la fixation des DSA sur les cellules endothéliales du greffon aboutit à l'activation du complément et induisent des thromboses vasculaires extensives du greffon (Williams et al., 1968). La réalisation systématique du cross-match par lymphocytotoxicité (LCT) avant toute transplantation rénale depuis 1969 a permis de prévenir la survenue de ces rejets humoraux hyperaigus (Patel and Terasaki, 1969). La technique du cross-match en LCT consiste à mettre en présence les lymphocytes du donneur à partir de prélèvements de rate ou de ganglions avec les sérums (prélevés au cours du suivi pré-transplantation) du potentiel receveur, en présence de complément. La positivité du cross-match, définie par la lyse des cellules du donneur, signe la présence de DSA « fonctionnellement cytolytiques » dans le sérum du receveur et constitue une contre-indication à la greffe.

Cependant, il a été plus difficile et plus long de reconnaître qu'en dehors de la forme « explosive » du rejet hyperaigu, les DSAs pouvaient également être à l'origine d'un rejet à bas bruit responsable d'une dysfonction chronique des greffons après transplantation. La démonstration du rôle central pathogène des DSAs pour le greffon a été rendue possible grâce aux résultats combinés de données issues des modèles expérimentaux, des résultats d'études cliniques, grâce à l'amélioration de la description des lésions histologiques (Einecke et al., 2009) mais également des techniques de dépistage des anticorps anti-HLA.

Jusqu'à cette prise de conscience récente, la dysfonction chronique des greffons était attribuée principalement à une toxicité des anti-calcineurines (pilier du traitement immunosuppresseur) ou à un processus de vieillissement du greffon nommée « glomérulopathie chronique d'allogreffe » marquée par une athérosclérose accélérée du greffon et des lésions de fibrose (El-Zoghby et al., 2009). Cependant, plusieurs arguments cliniques et expérimentaux ont permis de montrer que l'athérosclérose accélérée des greffons était en fait attribuable à la pathogénie des DSA, constituant ainsi la « théorie humorale » (Terasaki, 2012; Terasaki and Cai, 2008).

Les modèles expérimentaux murins ont tout d'abord montré que l'injection de sérum provenant de souris immunisées à une souris naïve greffée cardiaque induisait des lésions vasculaires du greffon (Russell et al., 1994). De façon intéressante, des résultats similaires sont obtenus pour des souris immunodéficientes (RAG-/-) montrant que l'injection de DSA est suffisante pour induire une athérosclérose accélérée du greffon, même en l'absence de LT ou de cellules Natural Killer (NK) (Uehara et al., 2007). Par ailleurs, une étude menée chez des singes a montré que l'enchaînement chronologique entre apparition des DSA et rejet chronique était cohérent pour évoquer un lien de causalité. En premier lieu apparaissent les DSA, puis suivent les lésions histologiques évocatrices d'un processus physiopathologique humoral (détection du C4d au niveau du greffon). Enfin apparaît l'athérosclérose accélérée du greffon et les signes de glomérulopathies chroniques d'allogreffe (Smith et al., 2006, 2008).

Chez l'Homme, la mise en évidence du rôle pathologique des DSA a été rendue possible grâce à l'amélioration des performances et de la sensibilité des techniques de détection des anticorps anti HLA.

En effet, la technique du « *Luminex single antigen* » a été développée afin de détecter des anticorps anti HLA, au préalable non mis en évidence par la technique de LCT (Pei et al., 2003). Cette technique consiste en la fixation de molécules HLA purifiées sur des billes incubées avec le sérum à tester. La fixation d'un anticorps anti-HLA à la surface des billes est révélée par un anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome. En parallèle la bille, et donc l'antigène HLA sur laquelle s'est fixé l'anticorps, est également reconnue permettant de réaliser une cartographie précise des anticorps anti-HLA présents dans le sérum des patients.

Grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes de détection des anticorps anti-HLA, les études cliniques chez l'Homme ont montré:

- (i) Que la survie à 4 ans et 10 ans des greffons de patients transplantés rénaux développant des DSA *de novo* était significativement plus faible par rapport à celle de patients greffés ne développant pas de DSA (Terasaki et al., 2007; Wiebe et al., 2012, 2015a). De plus, la survie à 8 ans des greffons de patients présentant des DSA historiques (c'est à dire identifiés avant la greffe) est également significativement plus faible que celle des patients non immunisés ou présentant des anticorps anti HLA non dirigés contre le donneur (non DSA) (Lefaucheur et al., 2010).
- (ii) Une association entre diagnostic de glomérulopathie chronique d'allogreffe, signes histologiques d'atteinte humorale et détection des DSA (Einecke et al., 2009; Sis et al., 2007). La détection de DSA (en particulier en classe II) est associée à un risque augmenté de développer une glomérulopathie chronique d'allogreffe (Gloor et al., 2007; Hill et al., 2011). Des anticorps anti-HLA sont retrouvés dans les éluats de greffons non fonctionnels dans les suites de rejets aigus ou chroniques (Lucchiari et al., 2000; Martin et al., 2003).
- (iii) un lien chronologique confirmant les données expérimentales : la détection des DSA précède l'apparition des lésions histologiques de rejet humoral et d'athérosclérose accélérée du greffon (Lee et al., 2002; Worthington et al., 2003).

3.2.2. Rejet humoral

Les DSA sont donc directement responsables de la dysfonction chronique des greffons. Autrement dit, le vieillissement histologique accéléré du greffon responsable de leur déclin fonctionnel est en fait la manifestation « terminale » du rejet induit par les DSA et est maintenant appelé rejet chronique humoral.

Avant d'induire cette dysfonction irréversible, la toxicité des DSA dans le greffon peut se manifester par deux évolutions cliniques (Figure 4):

- une évolution symptomatique marquée par l'apparition d'un rejet humoral aigu. Cette forme de rejet se manifeste par une insuffisance rénale aigue.

Les lésions histologiques regroupent principalement une inflammation de la microcirculation (capillaires glomérulaires ou péri-tubulaires) et/ou des thromboses et/ou une atteinte vasculaire (artérite) (d'après la dernière mise à jour de la classification de Banff (Loupy et al., 2017). Ces lésions peuvent être associées ou non à la positivité d'un marquage C4d signant une activation du complément.

-une évolution asymptomatique/insidieuse en lien avec des lésions histologiques infra-cliniques responsable d'une « destruction » du greffon à bas bruit et donc responsable d'une perte progressive de fonction.

Ainsi il est maintenant démontré que les DSA sont en fait responsables d'un continuum dynamique de manifestations cliniques et histologiques initié par les lésions histologiques infra-cliniques jusqu'à la dysfonction chronique de l'organe (Figure 4) (Loupy et al., 2012).

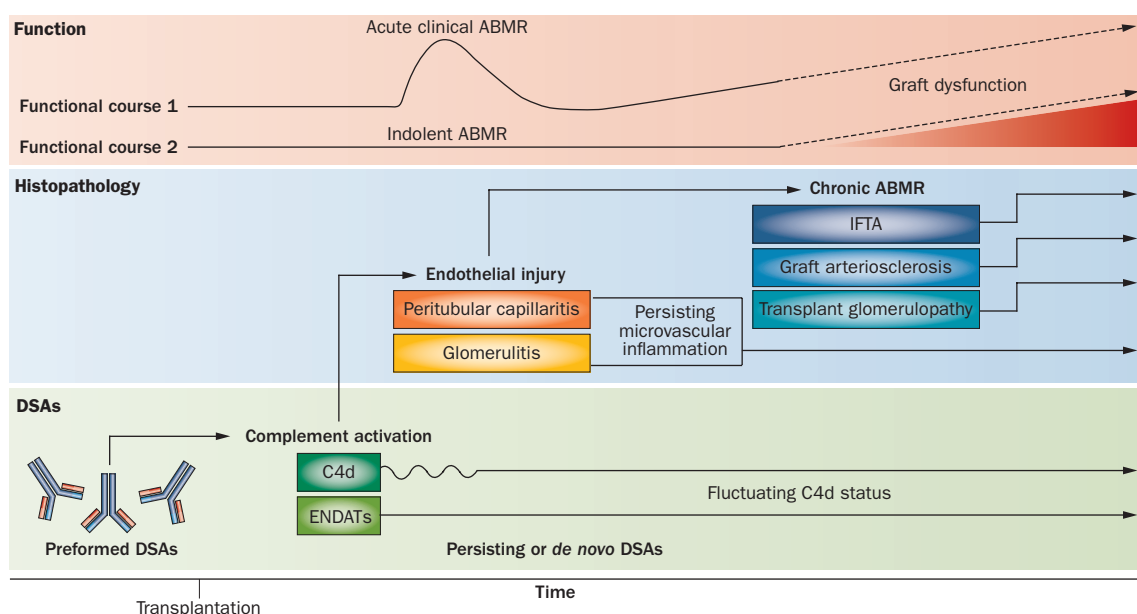


Figure 4: Histoire naturelle de la dysfonction chronique « humorale » du greffon

La présence de DSA après transplantation induit une toxicité endothéliale, par l'activation de la voie classique du complément mais également par des mécanismes indépendants de l'activation du complément. Cette toxicité peut se manifester dans certains cas par un épisode de rejet humoral aigu ou par une progression infraclinique des lésions histologiques. Au terme de cette évolution, des lésions chroniques histologiques irréversibles s'installent (fibrose interstitielle, atteinte des membranes basales et athérosclérose accélérée) que l'on regroupe sous le terme de rejet chronique humoral et sont responsables de la dysfonction chronique des greffons (tiré de Loupy Nat Rev Nephrol 2012).

Les différentes manifestations cliniques de rejet humoral pourraient être le reflet de mécanismes différents de pathogénie/toxicité des DSA dans le greffon.

3.2.3. Mécanismes à l'origine de la pathogénie des DSA

La « toxicité » des DSA dans le greffon peut s'expliquer par 2 mécanismes dépendant ou indépendant du complément:

3.2.3.1. Activation du complément

Le principal effet pathogène du DSA est lié à sa capacité d'activer la voie classique du complément. L'activation du complément par les DSA serait le mécanisme principalement impliqué dans les rejets aigus humoraux (Sicard et al., 2015).

L'interaction des anticorps avec leur antigène conduit à la formation d'interactions non covalentes des fragments Fc des IgG induisant ainsi le recrutement du complexe C1, première étape d'activation de la voie classique du complément (Diebold et al., 2014). L'activation de ce complexe va permettre de cliver le C2 et C4 pour aboutir à la formation du complexe C2a-C4b correspondant à la C3 convertase.

La C3 convertase va ensuite entraîner la formation de la C5 convertase et du complexe d'attaque membranaire qui va induire des pores dans les cellules cibles, leur lyse et être responsable des lésions de rejet humoral (Nakashima et al., 2002).

L'activation du complément va ainsi favoriser :

- (i) Une inflammation grâce au recrutement des neutrophiles et macrophages par l'intermédiaire des peptides C3a et C5a.
- (ii) L'activation des cellules endothéliales en elles-mêmes. D'une part les peptides C3a et C5a, par l'intermédiaire de leur récepteur, vont induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (interleukin (IL)-1a, IL-6 et RANTES) et de molécules d'adhésion (comme la E-selectine, VCAM1 (*vascular cell-adhesion molecule 1*) et ICAM1 (*intracellular adhesion molecule 1*) (Colvin and Smith, 2005; Saadi et al., 2000) par les cellules endothéliales.

D'autre part, le complexe d'attaque membranaire soluble va également contribuer à l'activation de ces cellules en induisant la sécrétion de facteur de croissance (FGF, *Fibroblast Growth Factor*) (Benzaquen et al., 1994).

- (iii) L'activation d'autres partenaires immunitaires adaptatifs. La liaison du C3 avec l'antigène permet notamment de diminuer le seuil d'activation des LB *via* le récepteur au C3, le CD21 (Dempsey et al., 1996).

De nombreux mécanismes « naturels » de régulation viennent contrôler la cascade d'activation du complément pour limiter temporo-spatialement le champ d'action du complexe d'attaque membranaire. Parmi eux, la fixation covalente du C4d au C4b grâce au facteur I permet de stopper l'activité de la C3 convertase. De façon très intéressante, la nature covalente de la liaison du C4d aux tissus rend possible sa détection histologique (en immunofluorescence ou immunohistochimie) sur les biopsies de greffon. La détection du C4d est alors un marqueur durable *in situ* de l'activation du complément par voie classique (Collins et al., 1999). Comme signalé précédemment, la positivité du marquage C4d endothélial fait maintenant partie de l'arsenal diagnostique à notre disposition pour poser le diagnostic de rejet humoral (Loupy et al., 2017). Cependant, la négativité du C4d n'exclut pas le diagnostic de rejet humoral (Sis et al., 2009; Uehara et al., 2007). En effet une étude transcriptomique réalisée par l'équipe de P. Halloran en 2009 révèle qu'une expression élevée de transcrits endothéliaux (ENDAT Endothelial associated transcripts) dans les biopsies de greffon réalisées pour une insuffisance rénale aigue signe une atteinte humorale active alors même que le marquage C4d est négatif (Sis et al., 2009). Le marquage C4d n'est donc plus considéré comme un critère indispensable au diagnostic de rejet humoral (Loupy et al., 2011).

Deux raisons peuvent expliquer la négativité du marquage C4d lors d'un authentique rejet humoral induit par les DSA :

- (i) D'une part le C4d peut être dégradé au bout de 8 jours (Collins et al., 1999).
- (ii) D'autre part les DSA peuvent être pathogènes sans entraîner d'activation du complément.

3.2.3.2. Toxicité endothéliale indépendante du complément

D'autres mécanismes n'impliquant pas l'activation du complément par les DSA peuvent en effet être à l'origine d'une toxicité endothéliale. Ceux-ci semblent le plus souvent aboutir à une expression clinique indolente et être surtout responsables de l'athérosclérose accélérée du greffon.

En effet, il a été montré que l'injection de DSA de classe I aboutit à l'athérosclérose accélérée du greffon cardiaque chez des souris immunodéficientes et KO pour le C3, suggérant que les lésions chroniques humorales peuvent être induites *in vivo* sans implication du complément (Hirohashi et al., 2010).

En l'absence d'activation du complément, la liaison en elle-même des DSA aux molécules HLA pourrait entraîner l'activation des cellules endothéliales (Jin et al., 2005; Smith et al., 2000). Les anticorps anti HLA de classe I induisent en effet la prolifération de cellules endothéliales *in vitro*.

Enfin, les DSA pourraient être pathogènes par l'intermédiaire d'un mécanisme d'ADCC (*Antibody-Dependent-Cell mediated Cytotoxicity*) comme le suggère la corrélation entre les polymorphismes du CD32 (FcγRIIb) des receveurs et le risque de rejet aigu (Yuan et al., 2004). L'effet ADCC des DSA pourrait être responsable de l'activation des NK, neutrophiles et macrophages. Ce mécanisme a surtout été étudié sur les NK grâce à des modèles expérimentaux. (Smith and Colvin, 2012).

Les conséquences fonctionnelles de la toxicité des DSA sur le greffon sont majeures puisque le rejet humoral « sous toutes ses formes » est à présent reconnu comme la principale cause de perte de greffons (Einecke et al., 2009; Sellarés et al., 2012).

Eviter la présence de DSA en situation de greffe est donc un objectif majeur. On distingue deux situations cliniques différentes selon la chronologie d'apparition du DSA : apparition de DSA après la transplantation qualifiée de *de novo* versus l'immunisation historique c'est à dire l'identification de DSA dans les sérums prélevés avant la greffe.

3.2.4. Chronologie d'apparition des DSA : DSA *de novo* et DSA historique

3.2.4.1. Immunisation *de novo*

Les études cliniques montrent que 15 à 30% des patients transplantés rénaux développent des DSA à 5 ans (Everly et al., 2013; Rebellato et al., 2011; Wiebe et al., 2012).

Les principaux facteurs de risques d'apparition de DSA *de novo* favorisent le conflit immunitaire et peuvent être le fait du greffon ou du receveur.

Les facteurs reconnus sont :

- le nombre et la nature des incompatibilités HLA (Hourmant, 2005; Ntokou et al., 2011). Le nombre d'incompatibilités peut être comptabilisé en terme de différences alléliques des 6 gènes HLA (*cf.* chapitre 1.2) ou en terme de différences épitopiques (Duquesnoy, 2014; Wiebe et al., 2013). En effet, il a récemment été montré que la stratégie s'intéressant à caractériser les épitopes immunogènes des différentes molécules HLA pour apparier les patients en terme de « compatibilité d'épitopes » plus que par compatibilité allélique totale *stricto sensu* était performante (Kosmoliaptsis et al., 2009, 2011). Des logiciels comme « HLA match-maker » sont créés afin de favoriser ces appariements. De plus, cette méthode permet également d'introduire un « degré » d'incompatibilité pour chaque épitope.
- le retard de reprise de fonction du greffon (Wiebe et al., 2015a). Ce paramètre peut avoir plusieurs origines : greffon à critères élargis, long délai d'ischémie froide responsable des lésions d'ischémie-reperfusion (*cf.* chapitre 2). Toutes sont responsables d'une augmentation de l'immunogénicité du greffon (Fuquay et al., 2013).
- Des épisodes de rejets cellulaires aigus (Chemouny et al., 2015; Hourmant, 2005; Wiebe et al., 2015a)
- L'immunosuppression (c'est à dire la nature des stratégies immunosuppressives est détaillée plus précisément dans la partie III ; page 62, ainsi que leur dosage), et tout particulièrement la non observance du traitement (Wiebe et al., 2015a,

2015b) bien que ce dernier point soit un facteur difficile à mettre en évidence et à quantifier (Butler et al., 2004; Nevins et al., 2001).

3.2.4.2. Immunisation historique

L'immunisation anti-HLA d'un patient avant la greffe peut être la résultante de 3 situations cliniques principales : la grossesse, les transfusions (plaquettaires ou de concentrés globulaires) et une greffe antérieure.

Lorsqu'un patient est inscrit sur liste d'attente de greffe, des sérums sont prélevés systématiquement à intervalles réguliers et après chaque événement immunisant. Ces sérums seront analysés par Luminex afin de réaliser une cartographie des anticorps anti-HLA et seront également conservés pour réaliser le cross-match en LCT (comme détaillé plus haut) lors d'une proposition de greffon.

La détection d'anticorps anti-HLA intervient dans les critères d'attribution du greffon, puisque l'idéal est de greffer un patient sans historique de DSA contre son donneur. Ainsi, la détection d'un anticorps anti-HLA contre-indique en théorie tous les donneurs portant la molécule en question (« antigène HLA interdit »). Le degré d'immunisation anti-HLA avant la greffe de chaque patient est donc évaluée par le taux de greffon incompatible (équivalent français du cPRA américain). Cet indicateur évalue la difficulté d'accès à la greffe de chaque patient en calculant le taux de donneurs interdits, du fait de la détection de DSA, parmi les donneurs prélevés d'au moins un organe dans les cinq dernières années sur le territoire national en iso-groupe sanguin. Or, la majorité des patients en attente de greffe sont en fait immunisés. En France d'après le dernier rapport de l'agence de Biomédecine (ABM) de 2015, 60,9% des patients en attente de greffe rénale sont immunisés (définis par un taux de greffon incompatible > 1%) ! Même si sont exclus les patients « faiblement immunisés », (c'est à dire si l'on considère uniquement les patients ayant un taux de greffon incompatible > 25%), 50% des patients inscrits sur liste sont toujours concernés. Parmi eux, la moitié sont en fait hyperimmunisés : leur taux de greffons incompatibles est supérieur à 85% ! Ces patients représentent 25% de la population générale de patients en attente de greffe.

Ces chiffres sont en constante augmentation (les patients hyperimmunisés représentaient 7% des patients en attente de greffe en 2009) et sont à mettre en rapport avec l'augmentation du nombre de patients inscrits pour des re-transplantations rénales.

Les évaluations épidémiologiques aux Etats-Unis sont comparables (Organ Procurement and Transplantation Network).

Cette observation a deux conséquences à l'échelle individuelle :

- (i) l'accès à la greffe pour ces patients est entravé même si des mesures pour y remédier sont mises en place. En effet, la médiane d'attente pour un patient immunisé en France est de 32,2 mois contre 15,7 mois pour un patient non immunisé (selon le rapport 2010 de l'activité de prélèvement et de greffe de l'ABM). Les mesures pour favoriser l'accès à la greffe de ces patients associent: des protocoles de priorisation nationale pour les patients hyperimmunisés (en France protocole antigène permis (Antoine and Legendre, 2017), des protocoles de désensibilisation (Marfo et al., 2011) ainsi que des programmes de dons croisés (Li et al., 2014; Schinstock et al., 2013; Wall et al., 2017).
- (ii) nous sommes amenés à réaliser des transplantations rénales pour des patients immunisés, c'est à dire porteurs de DSA avant la greffe, malgré le risque que ces DSA historiques représentent pour la survie des greffons (Lefaucheur et al., 2010).

Les défis majeurs actuels en transplantation rénale se concentrent sur le contrôle de la réponse humorale en intégrant plusieurs axes :

- 1) Optimiser le monitoring et la prise en charge thérapeutique post-greffe des patients immunisés afin de mieux prévenir les lésions histologiques
- 2) Prévenir l'émergence des DSA *de novo*

En résumé, la toxicité des DSA sur le greffon induit des lésions endothéliales, par des mécanismes dépendant ou indépendant du complément, pouvant être symptomatiques (dans le cadre du rejet humoral aigu) ou insidieuses (dans le cadre du rejet infraclinique). Dans les deux cas, ces lésions vont progresser vers une atteinte irréversible, le rejet humoral chronique, responsable d'une dysfonction progressive mais inéluctable du greffon. Le rejet humoral chronique est aujourd'hui la principale cause de perte des greffons car aucune stratégie thérapeutique ne permet de le traiter efficacement.

Les DSA sont des anticorps affins de type IgG et sont dirigés contre des antigènes protéiques. Ils sont produits par les LB effecteurs, plasmocytes et LB mémoires, au terme d'un processus de différenciation contrôlé temporellement et spatialement, au cours duquel la collaboration avec les LT est indispensable.

II. Rôle central du lymphocyte B

Pour envisager de moduler la réponse humorale, il faut avoir mis en évidence les mécanismes sous-tendant : (i) la différenciation des LB en LB effecteurs (ii) la sécrétion d'anticorps par ces effecteurs différenciés et (iii) leur maintien/leur survie à l'origine de la mémoire immunologique de l'organisme.

Enfin la manipulation de la réponse B s'avère complexe. En effet, en dehors de leur capacité à sécréter des anticorps, les LB exercent d'autres fonctions : ils jouent notamment un rôle « bénéfique » anti-inflammatoire et ils sont également impliqués dans l'induction de tolérance.

1. LB, professionnel de la sécrétion d'anticorps.

Au terme de différentes étapes de différenciation, le LB deviendra un effecteur spécialisé dans la sécrétion d'anticorps sous deux formes possibles : LB mémoire ou plasmocyte.

1.1 Etapes de différenciation : du précurseur lymphoïde aux effecteurs

Chaque clone de LB peut reconnaître un antigène spécifique grâce à son récepteur inédit, le récepteur des cellules B (BCR), composé d'une immunoglobuline (Ig) de surface ayant une spécificité unique. Un événement majeur, la rencontre avec l'antigène, permet de distinguer deux grandes étapes dans l'établissement des réponses B. En effet avant cette rencontre clé, les différentes étapes de maturation permettent le développement de LB avec un BCR fonctionnel (LB matures naïf). Puis, la rencontre avec l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS) initie l'activation des LB matures et permet leur différenciation en LB effecteurs, plasmocyte et LB mémoire.

- Etapes de développement indépendantes de l'antigène

Ces étapes ont pour but de générer des LB au répertoire diversifié, c'est à dire de produire de nombreux clones différents aux BCR uniques et permettre de reconnaître un large spectre d'antigènes du « non soi », tout en éliminant les clones autoréactifs qui reconnaitraient avec une trop grande affinité les molécules du « soi » (LeBien and Tedder, 2008).

Le LB est issu d'un précurseur hématopoïétique. A l'issue des étapes de maturation dans la moelle osseuse, la différenciation du LB immature va se poursuivre dans la rate. Les LB vont successivement acquérir un phénotype dit transitionnel (caractérisé par l'expression forte de CD24, CD38 et IgM) puis un phénotype mature caractérisé par l'expression d'un niveau intermédiaire de CD24 et CD38 (Figure 5, (Carsetti et al., 2004)).

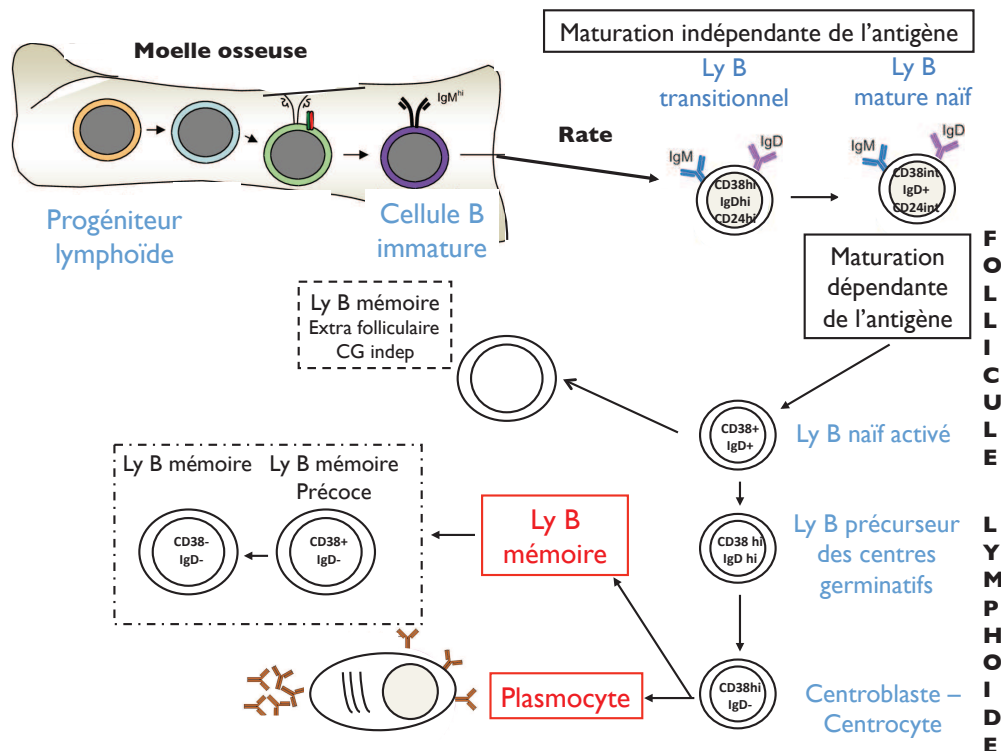


Figure 5: Développement du LB et marqueurs de différenciation

La combinaison des marqueurs IgD et CD38 permet de différencier les LB selon leur étape de maturation. Elle est notamment utilisée pour étudier les LB du sang circulant (Carsetti et al., 2004)

Chez l'Homme, deux types de LB matures aux fonctions différentes sont en fait identifiés selon leur localisation dans la rate.

- Les LB situés dans une zone géographique spécifique de la rate, nommée zone marginale, constituent un sous-groupe particulier de LB matures caractérisés par les marqueurs CD27+IgD+IgM+ dont l'origine et les fonctions sont débattues (Weill et al., 2009). Ces LB pourraient se différencier selon un programme particulier à partir des LB transitionnels (Descatoire et al., 2014) et seraient impliqués dans la réponse rapide aux antigènes T indépendants. Il s'agit d'antigènes capables d'induire l'activation des LB sans aide des LT comme les composants bactériens par exemple.
- Les LB matures folliculaires, caractérisés par un phénotype CD27-IgD+IgM+ sont spécialisés dans la réponse aux antigènes protéiques, auxquels les

antigènes HLA appartiennent. Nous allons donc nous intéresser spécifiquement à cette catégorie de LB mature.

Les LB matures naïfs circulent entre les différents organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) (von Andrian and Mempel, 2003). Lorsque le récepteur de surface du LB va reconnaître « son » antigène dans les follicules lymphoïdes du ganglion ou de la rate, le LB va subir plusieurs étapes de maturation, dépendantes donc de sa rencontre avec l'antigène.

- Etapes de développement dépendantes de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires

L'architecture des OLS permet un contrôle spatial et temporel indispensable au déroulé de ces étapes (Figure 6).

L'architecture des ganglions est divisée en 2 compartiments : le cortex et la medulla.

- Le cortex est lui-même divisé en zones B correspondant aux follicules et en zones T adjacentes, le paracortex. Le paracortex est au contact des capillaires HEV (*High Endothelial Venules*) par lesquels les lymphocytes circulants accèdent aux ganglions.
- La medulla est une zone riche en cellules phagocytaires (DC et macrophages notamment).

Le ganglion est également « irrigué » par une circulation lymphatique. La lymphe arrivant des vaisseaux afférents est diffusée dans le ganglion par l'intermédiaire d'un réseau de sinus, dont le sinus sous capsulaire, et est collectée après « filtration » au niveau de la médulla.

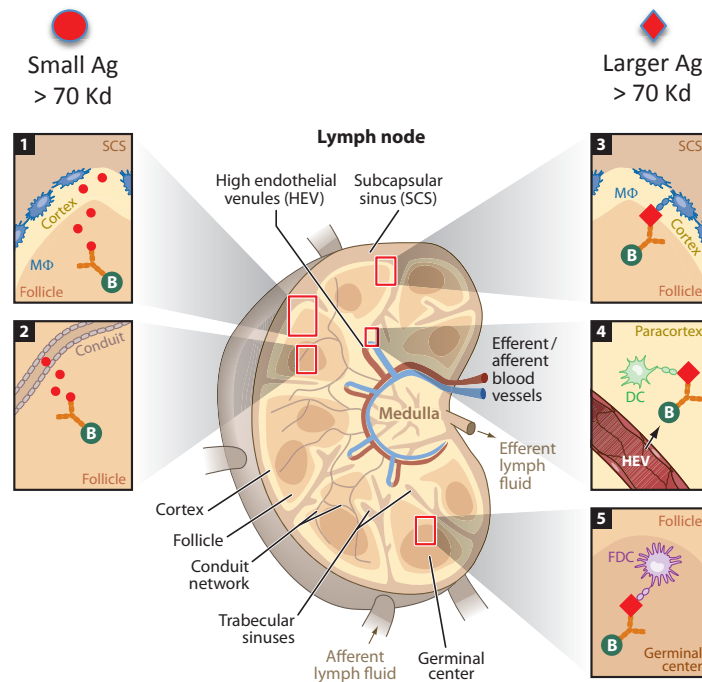


Figure 6: Mécanisme de reconnaissance de l'antigène.

Les LB matures naïfs peuvent reconnaître leur antigène spécifique sous forme libre ou « présentée » selon la taille des antigènes. Cette reconnaissance peut également s'effectuer dans différentes zones du cortex. (Tirée de Harwood 2010)

1.1.1. Reconnaissance de l'antigène

La reconnaissance de l'antigène par un LB mature naïf initie son activation et s'effectue dans la zone B des OLS. La taille de l'antigène va dicter son mode de reconnaissance par le LB. En effet, si le poids moléculaire de l'antigène est inférieur à 70 kD, alors l'antigène sera reconnu par le BCR sous forme « libre » après diffusion à partir des sinus sous-capsulaires ou *via* un réseau de canaux lymphatiques folliculaires « secondaires » composé de collagène et de cellules fibro-réticulaires (Pape et al., 2007; Roozendaal et al., 2009) (Figure 6 parties 1 et 2).

En revanche, si le poids moléculaire de l'antigène est supérieur à 70 kD (c'est le cas de la plupart des antigènes et notamment des complexes immuns ou particules virales), l'antigène sera « présenté » sous forme intacte par plusieurs partenaires:

- par les macrophages des sinus sous-capsulaires (Figure 6, partie 3), par l'intermédiaire de récepteurs de surface Mac1 (*Macrophage adhesion molecule-1*) pour les antigènes opsonisés par le complément, le FcγRIIB pour les complexes immuns ou DC-Sign pour les antigènes glucidiques (Carrasco and Batista, 2007; Junt et al., 2007; Phan et al., 2007).
- Par les DC du para-cortex (Figure 6, partie 4) (Qi et al., 2006). Cette voie permettrait d'activer les LB provenant des HEV.
- Par les DC folliculaires (FDC) (Figure 6, partie 5). L'antigène serait alors transporté des macrophages du sinus sous-capsulaire aux FDC par des LB non-spécifiques (à leur surface). La présentation de l'antigène par les FDC permettrait de prolonger « durablement » la présentation de l'antigène aux LB (Carrasco and Batista, 2007; Phan et al., 2007). Ce mécanisme est en fait indispensable pour l'étape de maturation d'affinité dans le centre germinatif (détaillé ci-dessous) mais semblerait également intervenir pour l'activation de LB naïfs (Suzuki et al., 2009).

1.1.2. Etapes précoces d'activation du LB

La liaison BCR-antigène constitue le premier signal d'activation du LB et s'effectue selon une véritable dynamique spatio-temporelle faisant intervenir une réorganisation du cytosquelette et la formation de « microcluster » de BCR (Harwood and Batista, 2010). Le recrutement du co-récepteur CD19, joue un rôle facilitateur essentiel lors de cette synapse immunologique en favorisant l'amplification du signal du BCR indispensable pour induire l'activation B (Depoil et al., 2008).

Ce premier signal d'activation va avoir pour conséquences

- (i) l'internalisation de l'antigène, qui sera ensuite dégradé en peptides antigéniques et présenté à la surface du LB activé par l'intermédiaire des molécules HLA de classe II (Lanzavecchia, 1985; Rock et al., 1984).

- (ii) la migration des LB activés vers la zone T-B. Dans cette zone, la rencontre T-B naïfs activés va induire la prolifération des deux partenaires (Figure 7a).

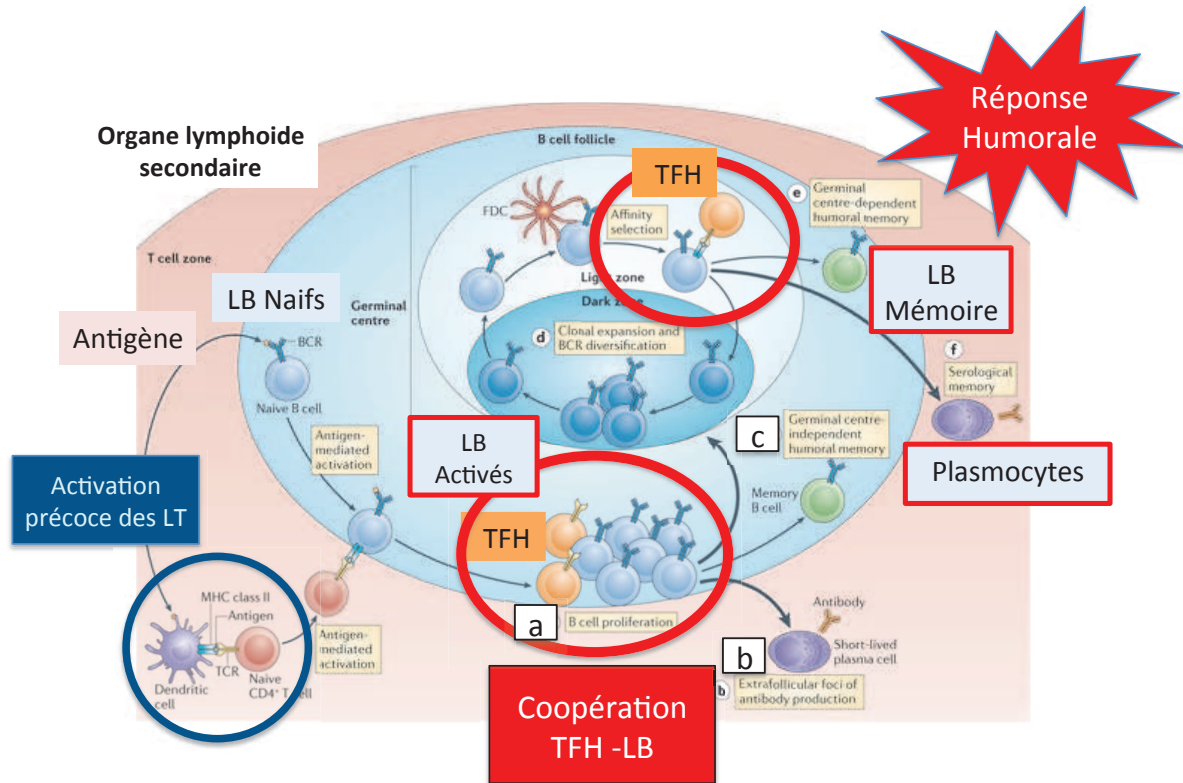


Figure 7. Collaboration TFH-LB, étape centrale pour la différenciation des LB activés en effecteurs

Les LB et les LT activés par leur rencontre avec l'antigène vont migrer à la périphérie des follicules, au contact de la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Le niveau d'aide entre les LT, « spécialistes » de la collaboration T-B et nommés T folliculaires va déterminer le devenir du LB : réponse extrafolliculaire ou réponse dépendante des CG (adaptée de Kurosaki Nat. Rev. Immunol 2015).

A cette étape, le dialogue entre LT et LB permet de former des structures spécialisées au sein de la zone folliculaire que l'on nomme centre germinatif (CG). Elles sont donc le reflet d'une prolifération oligoclonale des LB spécifiques d'un antigène. L'architecture de ces structures permettra aux LB spécifiques de se différencier en LB effecteurs « performants » sécrétant des Ig de très haute affinité.

Cependant, les LB peuvent également se différencier plus rapidement en effecteurs sans passer par les CG grâce à une deuxième voie de différenciation, nommée extrafolliculaire ou indépendante des CG.

1.1.3. Différenciation extrafolliculaire indépendante des centres germinatifs

Après 2 cycles cellulaires, une partie des LB « blastiques/proliférants » vont migrer de la périphérie des follicules (de la frontière T-B) et se différencier en

- LB mémoires indépendants des CG (figure 7c)
- Plasmablastes extrafolliculaires (figure 7b)

Cette différenciation s'effectuera alors en l'absence de collaboration (ultérieure) avec les LT et sans formation en CG (MacLennan et al., 2003) mais nécessite probablement une interaction avec les DC. Une commutation de classe, processus permettant de changer le fragment constant d'une Ig, peut débuter dès ce stade. Les LB mémoires indépendants des CG peuvent en effet être soit de type IgM⁺ soit commuté, « switché » en IgG (Taylor et al., 2012).

Cette activation permet une première réponse anticorps, rapide mais de faible spécificité car les phénomènes d'hypermutation somatique, qui permettent l'introduction de mutations ponctuelles au niveau des domaines variables des Ig (gène IgV) par l'enzyme AID (*Activation-induced cytidine Deaminase*) et donc d'augmenter potentiellement leur affinité pour l'antigène, ne s'effectuent pas en dehors des CG.

La « force » de la collaboration TFH-LB initiale semble être déterminante pour le choix de la « destinée » d'un LB. Le processus de sélection serait lié à la quantité de peptides présentés par le LB : ceux qui en expriment le plus ont des contacts prolongés avec les TFH et reçoivent un niveau d'aide suffisant pour fonder les CG. La destinée du LB serait donc dépendante du niveau « d'intensité » de la collaboration TFH-LB (Schwickert et al., 2011).

1.1.4. Différenciation folliculaire dépendante des centres germinatifs

La poursuite de la différenciation des LB dans les zones folliculaires conduit à la formation de CG permettant la synthèse d'anticorps de haute affinité (grâce au processus d'hypermutation somatique).

Engagement des LB et Initiation des CG

La formation des CG nécessite au préalable une collaboration forte et durable entre TFH et LB à la périphérie des follicules (Kurosaki et al., 2015; Schwickert et al., 2011).

Qi H *et al.* ont montré par imagerie intravitale bi-photonique dans un modèle murin déficient en protéine SAP (*Signaling lymphocyte activation molecule-associated protein*) que l'absence d'interaction stable entre TFH-LB (secondaire dans ce modèle à l'absence de SAP) est directement responsable de la diminution du nombre de CG et de l'expansion clonale B observée dans ce modèle. Les auteurs démontrent que ces interactions existent, avec la même fréquence, mais qu'elles sont « juste » plus courtes. De plus, les interactions des LT SAP^{-/-} avec les DC sont préservées et permettent aux TFH de se développer sans autre défaut fonctionnel (induction, prolifération, migration vers la zone folliculaire des ganglions et marqueurs d'activation) (Qi et al., 2008).

Cette collaboration forte et durable permettrait aux LB activés de recevoir des TFH la combinaison des 2 signaux indispensables pour orienter la réponse vers les CG : l'activation du CD40 et la signalisation de l'IL21. L'IL21 permet en effet d'augmenter l'expression de Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*), facteur de transcription majeur pour l'induction des LB des CG (Linterman et al., 2010). *A contrario*, si les LB reçoivent seulement le signal d'activation du CD40 de façon isolée (dans un contexte d'interaction courte), ils seront alors orientés vers une réponse indépendante des CG (Kurosaki et al., 2015; Taylor et al., 2012). Grâce à l'acquisition de Bcl6, les LB sont engagés dans la voie de différenciation dépendante des CG et deviennent des LB précurseurs des CG (Kitano et al., 2011). Ils migrent alors au centre de la zone folliculaire, prolifèrent massivement et colonisent le réseau de FDC formant les CG précoces (De Silva and Klein, 2015).

Différenciation des LB dans les CG : un processus dynamique

Le CG complètement formé est polarisé en 2 zones fonctionnellement différentes : la zone sombre et la zone claire.

Dans la zone sombre, une diversification du BCR des LB est obtenue grâce aux phénomènes d'hypermutation somatique. Parallèlement à ce processus, il existe une

expansion clonale intense des LB. Grâce à la combinaison de ces 2 processus, un large panel de clones mutants avec différentes affinités pour l'antigène est créé.

Dans la zone claire, une sélection d'affinité des BCR « nouvellement mutés » sera réalisée grâce à la collaboration TFH-LB (*cf.* paragraphe 1.3) et à la participation des cellules FDC. Ce processus nécessite en effet que l'antigène soit capté par les BCR « nouvellement mutés » (rôle crucial des FDC) et internalisés pour être présentés aux TFH (Allen et al., 2007a; Victora and Nussenzweig, 2012). Les LB les plus affins sont ceux qui présentent le plus de complexes peptide-CMHII à leur surface permettant de surpasser leurs voisins.

L'accessibilité des antigènes constitue un deuxième point limite pour s'assurer de la sélection des LB les plus affins. Les FDC modulent l'accessibilité des antigènes grâce à la fixation d'anticorps sur l'antigène présenté. Ce mécanisme constitue une boucle d'autorégulation, grâce à laquelle les anticorps des plasmocytes déjà différenciés, viennent moduler la sélection des nouveaux clones (Zhang et al., 2013).

La visualisation du comportement des LB dans les CG *in vivo* peut maintenant être étudiée grâce aux progrès des techniques d'imagerie (Victora et al., 2010). Elle a permis de montrer que les CG sont des structures extrêmement dynamiques dans lesquelles les LB vont alternativement re-circuler entre les zones sombres et claires des CG (Allen et al., 2007b; Victora et al., 2010). Ces échanges sont rapides, si bien que l'alternance entre centroblastes (LB situés dans la zone sombre) et centrocytes (LB de la zone claire) est maintenant considérée comme une alternance entre 2 états transitoires au sein d'une même étape développementale plutôt que comme 2 étapes de différenciation individualisées. Cependant, les différences entre centroblastes et centrocytes existent et portent sur le niveau d'expression de marqueurs d'activation, leur sensibilité aux chimiokines, leur capacité de réparation de l'ADN (Acide désoxyribonucléique) et leur capacité proliférative (Victora et al., 2012). Ils peuvent être distingués en fonction du niveau d'expression des marqueurs CXCR4, CD83 et CD86, les centroblastes étant CXCR4^{hi}CD83^{lo}CD86^{lo} alors que les centrocytes sont CXCR4^{lo}CD83^{hi}CD86^{hi}) (Allen et al., 2004; Victora et al., 2010).

La polarisation spatiale en 2 zones géographiquement séparées nécessite l'expression des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR5 à la surface des LB. Les LB sont attirés vers la zone claire grâce à un gradient de concentration de CXCL13, ligand de CXCR5, exprimé par les FDC (Allen et al., 2004) alors que l'attraction vers la zone sombre serait gouvernée par un gradient de CXCL12, ligand de CXCR4, exprimé par les cellules stromales réticulaires de cette zone (Bannard et al., 2013). La séparation spatiale de ces 2 pôles est de plus cruciale pour le développement de réponses de type CG efficaces. En effet, les LB déficients en CXCR4, donc séquestrés dans la zone claire, n'acquièrent que peu de mutations somatiques et sont dépassés par les LB CXCR4+ et donc éliminés (Bannard et al., 2013).

Ces mécanismes vont aboutir à la genèse de deux effecteurs spécialisés dans la sécrétion d'anticorps : les LB mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie. Ces effecteurs peuvent apparaître dans la semaine qui suit la rencontre avec l'antigène (Blink et al., 2005). La compréhension du rôle des facteurs conduisant à interrompre les cycles des LB dans le CG et à déterminer leur « destinée » entre les 2 états de différenciation terminale possibles, LB mémoires et plasmocytes, n'est pas aboutie.

1.2 Lymphocytes B mémoires

La définition de LB mémoires implique que (i) ces cellules aient rencontré et aient été activées par un antigène (ii) qu'elles persistent à l'état quiescent dans l'organisme (iii) tout en étant capables de se réactiver lors d'une nouvelle rencontre avec cet antigène (Weisel and Shlomchik, 2017).

Les LB mémoires ont la capacité de re-circuler: ils peuvent être identifiés dans le sang circulant et les OLS.

Chez l'Homme, les LB mémoires pourraient en principe être identifiées par le marqueur CD27+. Le phénotype des LB CD27+ correspond bien à celui attendu des LB mémoires car ces LB ont des caractéristiques phénotypiques de LB « post CG ». Ils ont en effet réalisé une commutation de classe et leur domaine variable a été le siège de mutations (Klein et al., 1997; Tangye et al., 1998). Cependant, la situation pourrait être un peu plus complexe.

Le groupe des LB CD27+ seraient hétérogènes, regroupant des LB nouvellement activés dans les CG ainsi que de « vrais » LB mémoires à longue durée de vie (Weisel and Shlomchik, 2017). Enfin, il existe également des LB mémoires CD27- « atypiques » également caractérisés par la négativité du marqueur CD21 (Ehrhardt et al., 2008; Fecteau et al., 2006; Wei et al., 2007) et qui ont des caractéristiques de LB anergiques (Isnardi et al., 2010).

Les principales caractéristiques fonctionnelles des LB mémoires sont :

- La longévité

Cette notion est parfaitement illustrée par des données épidémiologiques recueillies chez l'Homme. Des clones de LB mémoires IgG1+ spécifiques de la souche du virus *Influenza* responsable de la pandémie de 1918 ont été détectés dans le sang circulant 90 ans après la première exposition au virus (Yu et al., 2008). Ces clones sont de plus capables de sécréter des anticorps à fort pouvoir neutralisant.

Les facteurs responsables de la survie des LB mémoires ne sont pas élucidés. Les cytokines de la famille du TNF (BAFF, *B-cell activation factor*) ne sont pas indispensables à la survie des LB mémoires (Scholz et al., 2008). Le maintien du pool de LB mémoires IgG+ nécessiterait la « signalisation tonique du BCR » (*i.e.* non dépendante de la reconnaissance de l'antigène), plus que la persistance de l'antigène en lui-même (Hikida et al., 2009; Kurosaki et al., 2015).

- Leur capacité inédite à répondre aux stimuli antigéniques

Les LB mémoires ont la capacité de se différencier en plasmablastes produisant des anticorps déjà « switchés » plus rapidement et avec une plus grande amplitude que les réponses naïves (Ahmed and Gray, 1996).

De plus, des collaborations cellulaires joueraient un rôle dans le bon déroulement des réponses mémoires :

- La collaboration T-B est indispensable pour la réactivation de LB mémoires spécifiques d'antigènes protéiques (Aiba et al., 2010) et tout particulièrement le rôle des TFH mémoires (Choi et al., 2013; Ise et al., 2014).
- La présence des FDC est également indispensable. En l'absence de FDC dans un modèle murin, la réponse primaire n'est pas affectée alors que la réponse anticorps secondaire était significativement diminuée. De façon concordante, le nombre de LB mémoires spécifiques de l'antigène était également diminué (Barrington et al., 2002).
- Leur capacité de se « re-diversifier »

Certains LB mémoires peuvent ré-initier la formation de CG. Les LB mémoires IgM⁺ s'orienteraient de façon privilégiée vers cette voie (Dogan et al., 2009; Pape et al., 2011; Seifert et al., 2015). Ils adoptent en effet préférentiellement un phénotype de LB précurseurs des CG en augmentant l'expression du facteur de transcription Bcl6. Les auteurs opposent ainsi les LB mémoires IgM⁺ aux LB mémoires IgG⁺ qui eux se différencieraient de façon privilégiée en plasmablastes. Les travaux de M. Shlomchik ont montré que l'expression des molécules CD80 et PDL2 à la surface des LB mémoires murins permettait de mieux distinguer ces deux catégories fonctionnellement différentes de LB mémoires (Zuccarino-Catania et al., 2014). Les LB mémoires CD80⁺PDL2⁺, qu'ils soient IgM ou IgG, induisent principalement des plasmablastes lors de leur réactivation, alors que les LB mémoires CD80⁻PDL2⁻ majoritairement IgM⁺ ré-initient les CG. Les mécanismes sous-tendant ces capacités fonctionnelles différentes sont en cours d'exploration.

Chez l'Homme, il est probable que les réponses mémoires soient également hétérogènes d'un point de vue fonctionnel. Cependant ces différences fonctionnelles ne sont pas élucidées. De façon intéressante, certains LB mémoires peuvent exprimer le CD80 (Bar-Or et al., 2001), mais pas PDL2 (Weisel and Shlomchik, 2017).

Les LB mémoires humains CD27+CD80+ ont la capacité in vitro de produire rapidement de grandes quantités d'Ig et de servir de cellules présentatrices d'antigènes et « stimulantes » aux LT comparativement au CD27+CD80- (Bar-Or et al., 2001).

1.3 Plasmablastes et Plasmocytes à longue durée de vie

Plasmablastes *versus* PC à longue durée de vie

Le plasmocyte (PC) est l'entité cellulaire spécialisée dans la sécrétion d'anticorps. On distingue en fait deux catégories de PC (i) les PC à courte durée de vie, les plasmablastes et (ii) les PC à longue durée de vie. Le tableau 1 résume les différentes caractéristiques des deux populations de PC.

Types de PC	Durée de vie	Localisation	Prolifération	Origine	Marqueurs	Blimp-1
Plasmablaste	Courte	OLS sang	+++	Extrafolliculaire ou CG	CD24-CD38 ⁺⁺ CD27 ⁺⁺ CD138-	+
PC à longue durée de vie	Longue	Moelle osseuse	-	CG	CD20-CD38 ⁺⁺ CD138+	+++

Tableau 1 : Principales caractéristiques des plasmablastes et PC à longue durée de vie

Plasmocytes : une identité transcriptionnelle

Pour acquérir le phénotype de plasmocytes, les LB du CG doivent perdre leur identité transcriptionnelle B (en inhibant l'expression de facteurs clés de transcription) et acquérir celle de cellule professionnelle dans la sécrétion d'anticorps. Ces deux jeux de facteurs de transcriptions sont mutuellement exclusifs.

Les principaux facteurs de transcription à l'origine de « l'identité B » sont :

- **Pax 5** (*Paired box protein 5*). C'est un facteur de transcription majeur pour l'identité B (Cobaleda et al., 2007) depuis l'engagement des précurseurs vers la lignée B (Nutt et al., 1999). La délétion conditionnelle de Pax 5 dans les LB matures chez la souris induit la dédifférenciation des LB matures des organes lymphoïdes en des progéniteurs non différenciés migrant dans la moelle osseuse et pouvant même se transformer en LT dans des souris déficientes en T

(Cobaleda et al., 2007). Pax 5 régule l'expression du BCR, des co-récepteurs CD19, CD21, et l'expression d'autres facteurs de transcription.

- **Bcl6** (*B-cell lymphoma 6*). Ce facteur de transcription joue un rôle majeur pour les LB du CG et lors de la différenciation *in vitro* des plasmablastes. Il réprime Blimp-1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*), favorise la prolifération des LB et améliore leur seuil de tolérance au processus de mutation hypersomatique (Nutt et al., 2015). En effet, Bcl6 doit être co-exprimé avec AID pour inhiber le programme normalement enclenché lorsque surviennent des lésions de l'ADN qui aboutirait à la destruction de la cellule (Crotty et al., 2010).

Les facteurs de transcription de « l'identité B » seront donc inhibés au profit de l'expression des facteurs de transcription impliqués dans l'acquisition d'une identité plasmocytaire. Ceux-ci permettent aux LB d'acquérir deux propriétés originales : la capacité de sécréter de grandes quantités d'Ig (chaque plasmocyte produit 2 ng d'Ig par jour (Brinkmann and Heusser, 1993)) et de migrer vers les niches de la moelle osseuse.

Les trois principaux facteurs de transcription impliqués dans l'identité plasmocytaire sont :

- **IRF4** (*interferon regulatory factor-4*). Il joue un rôle important à la fois pour le maintien des phénotypes B et la survie des plasmocytes (Tellier et al., 2016). Son action est différentielle selon son niveau d'expression (Ochiai et al., 2013; Sciammas et al., 2006).
- **Blimp-1** (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*). Blimp-1 joue un rôle important dans l'induction, le développement de plasmocytes. Il est exclusivement exprimé dans les plasmocytes mais à un niveau variable selon la nature des plasmocytes. En effet, les plasmablastes présentent un niveau d'expression moindre par rapport aux plasmocytes de longue durée de vie (Kallies, 2004). Dans les plasmocytes matures, Tellier *et al.* ont récemment montré que l'inactivation de Blimp-1 conduisait à une diminution de sécrétion des immunoglobulines, en interagissant avec les voies de l'UPR (*Unfolded Protein Response*) et mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), sans modification de la survie à long terme des plasmocytes (Tellier et al., 2016).

- **XBP1** (*X box binding protein 1*) est un facteur de transcription induit par le stress du réticulum endoplasmique, auquel les plasmocytes sont particulièrement sensibles vu qu'ils synthétisent et sécrètent de grandes quantités de protéines (Ig). L'induction des PC semble indépendante de XBP1 (Taubenheim et al., 2012; Todd et al., 2009). XBP1 aurait un rôle prédominant pour promouvoir la transcription des gènes des Ig et leur sécrétion (Todd et al., 2009).

Les facteurs responsables de l'induction des plasmocytes à longue durée de vie ne sont pas élucidés (Kräutler et al., 2017). Un premier scénario consisterait à dire que tous les plasmocytes à longue durée de vie dérivent de plasmablastes. L'identification de plasmablastes dans le sang circulant présentant un niveau intermédiaire de Blimp-1 irait dans ce sens, car ces plasmablastes pourraient représenter une étape intermédiaire de différenciation (Blink et al., 2005). L'autre scénario alternatif consisterait à considérer que les plasmocytes à longue durée de vie sont « pré-destinés » / « pré-engagés » dans cette voie à la sortie des CG.

Survie des plasmocytes à longue durée de vie

La survie des PC dépend de niches dans la moelle osseuse qui sont présentes en nombre limité. Les facteurs favorisant l'attraction des PC vers la moelle osseuses sont peu connus : un gradient de concentration de CXCL12 interviendrait et donc l'expression de CXCR4 à la surface des PC serait importante (Wehrli et al., 2001).

La sécrétion des facteurs de survie BAFF (*B-cell activation factor*) et APRIL (*A-Proliferation-inducing ligand*) et leur récepteur BCMA (*B cell Maturation Antigen*) jouerait également un rôle prédominant dans la survie des PC à longue durée de vie dans les niches (Belnoue et al., 2008; Benson et al., 2008).

Enfin, la survie des PC dans les niches dépendrait d'interactions avec les cellules stromales médullaires par l'intermédiaire de l'expression de molécules d'adhésion (VLA4 exprimé à la surface des PC et VCAM1 à la surface des cellules stromales (Roldán et al., 1992) mais également de la réexpression de CD28 (Rozanski et al., 2011, 2015). Dans les LB matures, l'expression de CD28 est réprimée sous le contrôle de Pax5. CD28 est donc ré-exprimé lors de la différenciation plasmocytaire qui nécessite, comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, l'inhibition de ce facteur de transcription (Delogu et

al., 2006). La signalisation induite par CD28 dans les PC permettrait de maintenir un titre constant d'anticorps en favorisant la survie des PC à longue durée de vie dans les niches médullaires, grâce à l'implication de la voie de signalisation Vav et à une régulation transcriptionnelle de Blimp-1, sans avoir d'impact sur les plasmablastes dans un modèle murin (Rozanski et al., 2011, 2015).

2. Collaboration TFH-LB : mécanisme central pour l'établissement de la réponse humorale

Tout au long du processus menant à l'induction de LB effecteurs, les TFH apparaissent comme les partenaires clés pour le développement de la réponse humorale. En effet, ils interviennent de façon itérative lors de plusieurs étapes de différenciation des LB. De plus, leur intervention, définie en terme « d'intensité d'aide » qu'ils apportent aux LB, constitue des facteurs limitants au développement des LB. Ils déterminent en effet la poursuite ou non du processus de maturation des LB.

2.1. Interventions successives des TFH lors de 3 étapes-clé de la différenciation B

Le rôle prépondérant des TFH dans le contrôle de la réponse anticorps survient au cours de 3 étapes successives de la différenciation B en effecteurs :

- Précocement pour initier la formation des CG (Schwickert et al., 2011).
- Lors du développement de la réponse primaire : rôle majeur dans la sélection des clones B dans les CG (Gitlin et al., 2014; Victora et al., 2010).
- Dans l'induction et le développement des réponses mémoires lors d'une nouvelle rencontre antigénique entre TFH mémoire et LB mémoire (Ise et al., 2014; Zabel et al., 2017).

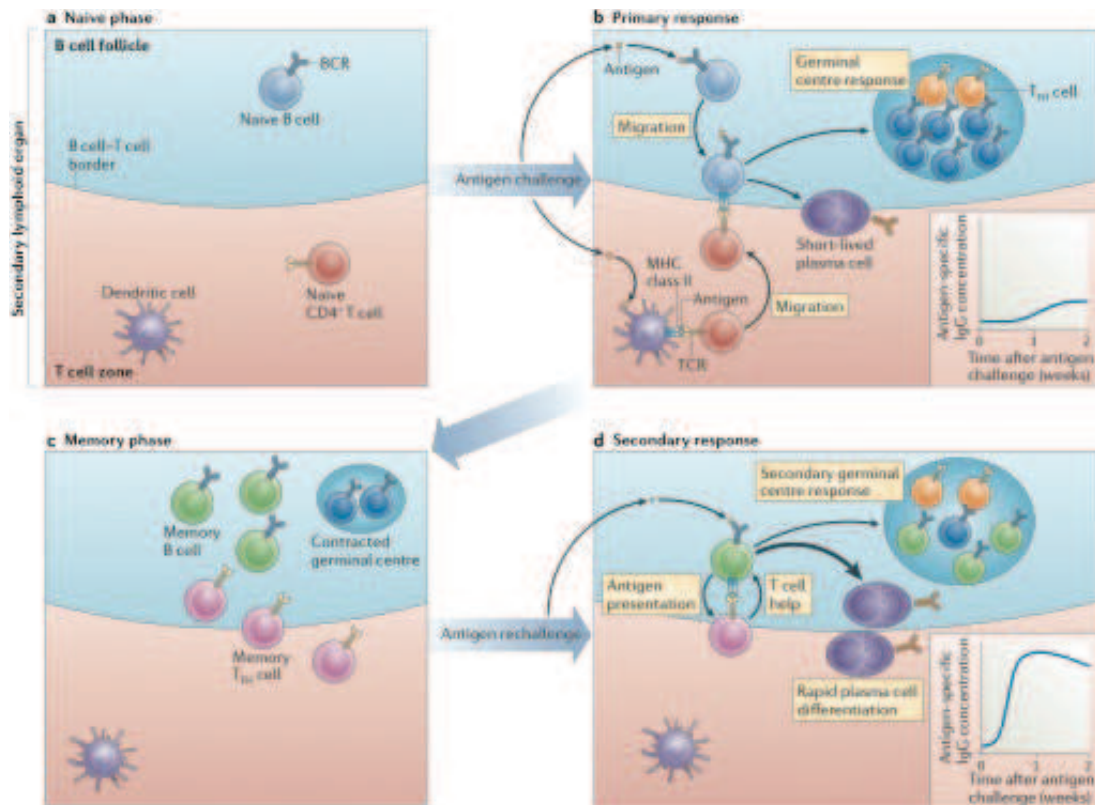


Figure 8: Rôle de la collaboration TFH-LB lors de différentes phases de la réponse humorale.

A noter, cette collaboration nécessite une coordination spatiale. Lors de la réponse primaire (b), l'intensité de la collaboration entre les TFH et les LB détermine (i) le développement ou non des CG et (ii) participe à la sélection des clones les plus affins dans les CG permettant l'induction de LB mémoires et plasmocytes. Lors de la réponse secondaire (c), la collaboration TFH mémoire - LB mémoire en périphérie des follicules est également au cœur de l'orchestration des réponses humérales. Elle permet la différenciation rapide des LB mémoires en plasmablastes (permettant une sécrétion plus rapide et plus intense d'IgG spécifique de l'antigène, cf encadré) et la reconstitution de CG secondaires. (tiré de Kurosaki Nat Rev Immunol 2015.)

Une notion commune se dégage de ces études. Il s'agit du « niveau d'aide » des TFH contrôlant la sélection des LB.

- (i) Le « niveau » de la collaboration TFH-LB détermine précocement le devenir des réponses B. Comme nous l'avons vu plus haut, les interactions doivent être durables (et fortes) pour orienter les LB vers la formation de CG (Schwickert et al., 2011).

- (ii) Ce niveau d'aide est également reconnu comme étant le principal facteur limitant pour sélectionner les clones les plus affins dans la zone claire des CG (Gitlin et al., 2014; Victora et al., 2010). Cependant à cette étape, les caractéristiques de la collaboration entre TFH et LB changent par rapport à l'étape précédente. Les interactions sont plus rapides mais la surface de contact entre les deux protagonistes est plus étendue. Ces caractéristiques ont été regroupées sous le terme d'« enchevêtrement »/d'emboîtement (Liu et al., 2015a; Qi, 2016) (Figure 9).

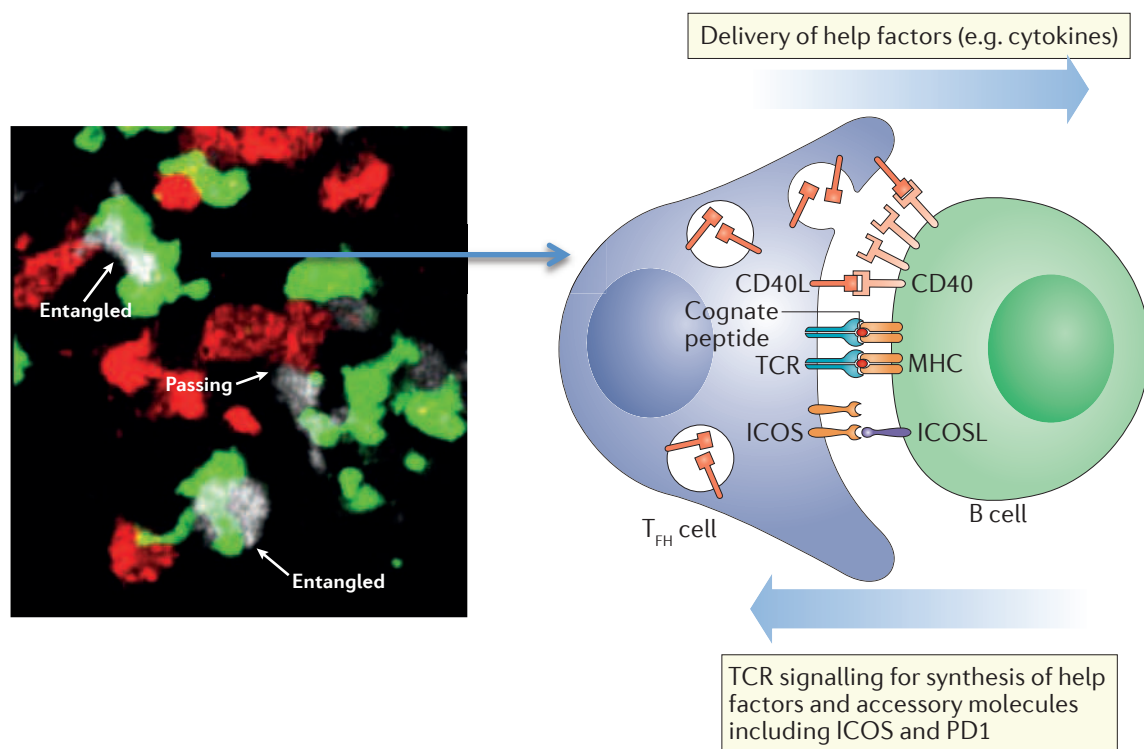


Figure 9: Mécanismes d'enchevêtrement/d'emboîtement entre TFH et LB dans les CG.

Les interactions entre LB des CG (en vert) et les TFH (en blanc sur la photo et en bleu ciel sur le schéma) sont courtes mais sur une surface de contact étendue. La liaison d'ICOSL (à la surface des LB) avec ICOS va induire dans les TFH un influx calcique permettant l'externalisation de molécules de CD40L jusqu'alors contenues dans des vésicules intracellulaires. Ces mécanismes constituent une boucle d'amplification positive de la collaboration TFH-LB (adaptée de Qi H Nat Rev Immunol 2016).

- (iii) La collaboration TFH-LB mémoire est également nécessaire lors d'une nouvelle exposition antigénique (Aiba et al., 2010; Fazilleau et al., 2007). En effet, la formation de CG est également importante pour le développement des réponses mémoires. Dans ce cas, les résultats de l'équipe de Kurosaki suggèrent que, lors d'une nouvelle exposition antigénique, les LB mémoires constituent les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les TFH mémoires et permettent leur activation dans les CG en contribuant notamment à une ré-expression de Bcl6 (Ise et al., 2014) (Figure 8d). Très récemment, Zabel *et al.* ont cherché à caractériser le rôle des TFH dans l'activation des réponses mémoires contre des antigènes particuliers viraux. Ils suggèrent dans ce modèle une implication différente des TFH selon la nature des LB effecteurs mémoires ou PC (Zabel et al., 2017).

2.2. Nature moléculaire du dialogue TFH-LB : identification des partenaires impliqués

Il est important de comprendre quelles molécules interviennent dans le dialogue entre TFH et LB et définissent ainsi la « nature de l'aide » délivrée par les TFH aux LB, et réciproquement (Figure 10).

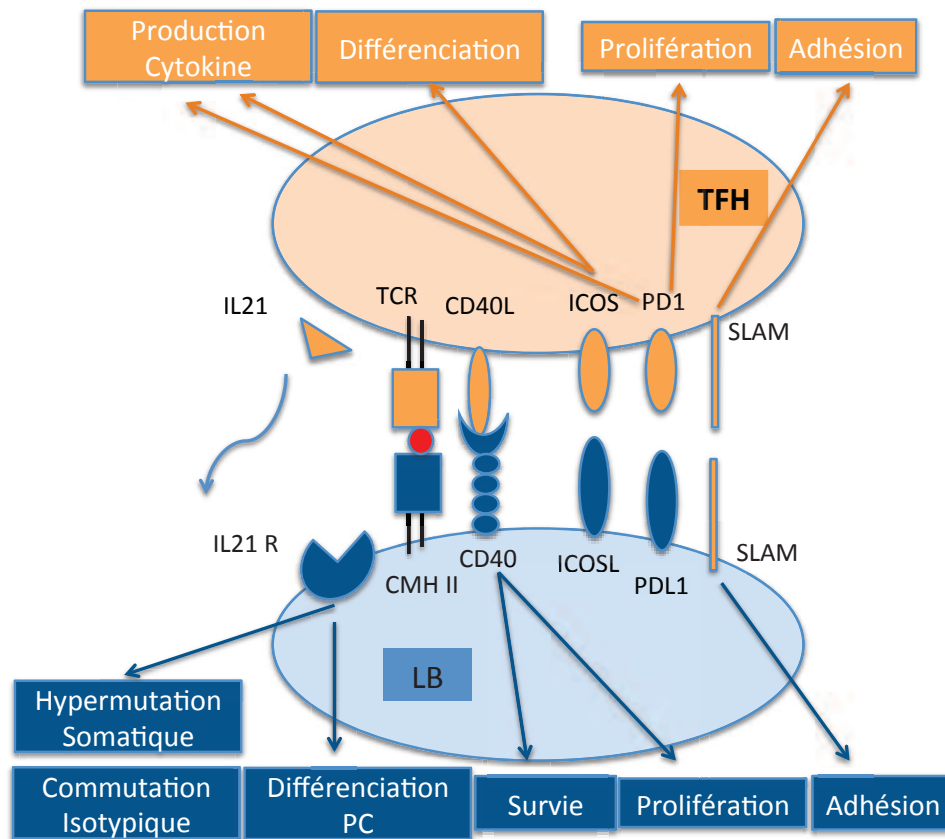


Figure 10: Interactions moléculaires fondamentales pour la collaboration TFH-LB des CG.

Ces interactions de plusieurs natures comprennent (i) la liaison TCR/molécule HLA de classe II, (ii) l'interaction de molécules de co-stimulation (40/40L, ICOS/ICOSL, PD1/PDL1), (iii) de molécules d'adhésion, les SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) et (iv) l'intervention de signaux de cytokines, au 1er rang duquel figure l'IL21.

2.2.1. Interaction CD40L (TFH)/CD40 (LB)

L'interaction CD40-CD40L est l'un des mécanismes majeurs pour la collaboration TFH - LB (Armitage et al., 1992). Chez l'Homme, les mutations du gène CD40L sont en effet responsables d'un syndrome de déficit immunitaire, le syndrome hyper-IgM lié à l'X. Les patients concernés présentent un défaut de production d'IgG et l'absence de CG (Allen et al., 1993; DiSanto et al., 1993; Korthäuer et al., 1993). Le signal induit par CD40L aboutit à une prolifération des LB (Crotty, 2011).

2.2.2. Sécrétion de cytokines : IL-21 et IL-4

L'IL-21 est la principale cytokine responsable de la différenciation plasmocytaire *in vivo* et *in vitro* (Ettinger et al., 2005; Good et al., 2006). L'IL-21 promeut également la prolifération des LB et la commutation isotypique (Ettinger et al., 2008). L'IL-4 favorise notamment la survie des LB et contribue principalement à la sécrétion d'IgE (Crotty, 2011). En effet, dans des modèles de souris déficientes pour l'IL4, la formation des CG et la sécrétion globale des IgG après immunisation ne sont pas impactées (Kopf et al., 1995). Cependant, les souris dépourvues d'IL-4 et du récepteur à l'IL-21 présentent des défauts majeurs de la réponse humorale et la combinaison de ces 2 cytokines semble être importante (Ozaki et al., 2002). Il a récemment été montré que les TFH acquéraient séquentiellement la capacité de sécréter l'IL-21 puis l'IL-4, ce qui modulait leurs capacités « d'aide » aux LB (Bélanger and Crotty, 2016).

2.2.3. Molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion jouent un rôle majeur dans le dialogue TFH-LB et notamment la protéine SAP (*SLAM-associated protein*). L'absence de SAP est responsable d'un raccourcissement des interactions TFH-LB rendant impossible la formation de CG et l'induction de LB mémoire ou de plasmocytes (Crotty et al., 2003; Qi et al., 2008).

2.2.4. Molécules de co-stimulation

ICOSL (Inducible T-cell co-stimulator ligand) est un partenaire moléculaire indispensable à la collaboration entre TFH et LB. Liu *et al.* ont récemment montré qu'ICOSL est un facteur important pour influencer le devenir individuel des LB vers une différenciation en PC. ICOSL induit notamment le mode de dialogue très particulier « de type emboitement » (Figure 9) entre les LB et les TFH qui participe à la sélection positive des clones de haute affinité (Liu et al., 2015b).

De plus, le maintien des TFH nécessite également une interaction avec ICOSL exprimé par les LB spectateurs (« bystander »), c'est à dire non spécifique de l'antigène. L'engagement d'ICOSL présent à la surface des LB « bystander » induit une activation de la voie de signalisation de la Pi3 kinase indispensable au maintien de la fonction et de la localisation des TFH (Xu et al., 2013).

L'expression de PD1 sur les TFH serait un marqueur spécifique d'une collaboration active entre TFH et LB dans les CG (Haynes et al., 2007; Qi, 2016). En effet lorsque des TFH induites après stimulation antigénique sont transférées à des souris naïves non exposées à l'antigène, elles perdent rapidement l'expression de PD1 (Baumjohann et al., 2013). D'un point de vue fonctionnel, l'axe PD1/PDL1-PDL2 régulerait le dialogue TFH-LB dans les CG (Good-Jacobson et al., 2010; Kawamoto et al., 2012). Grâce à une approche génétique, l'équipe de M. Shlomchik a montré que les souris déficientes en PD1, PDL1 ou PDL2 présentaient une diminution de la sécrétion d'Ig à des temps tardifs après immunisation du fait d'une augmentation de la mortalité des LB des CG. De plus l'interruption de l'axe PD1-PDL1/2 interviendrait également dans le contrôle de l'homéostasie des TFH. Elle induit une augmentation de fréquence des TFH mais une diminution de leur sécrétion d'IL4 et IL21.

Les TFH sont les partenaires clés pour le développement des réponses humores. Il est important de comprendre d'où viennent ces cellules et comment il est possible de les caractériser.

2.3. Induction des TFH

Les TFH sont donc maintenant reconnus comme une classe indépendante de LT CD4+ helper à part entière. En 2001, Campbell *et al.* ont réalisé la première démonstration *in vivo* de la présence de ces cellules professionnelles responsables de la coordination de la réponse humorale (Campbell et al., 2001).

Ils ont en effet montré que le même précurseur naïf spécifique d'un antigène donnait « naissance » à deux types de LT effecteurs différents : une population exprimant fortement CXCR5 se dirigeait vers les ganglions et était responsable de la réponse humorale et l'autre exprimant fortement CXCR3 et la P-sélectine était dirigée vers le site inflammatoire (Campbell et al., 2001).

Le développement des LT effecteurs, selon la théorie actuelle, s'effectue sous l'impulsion des DC qui permettent au précurseur naïf de se différencier selon plusieurs voies effectrices possibles : Th1, Th2, Th17, T régulateur et TFH. Chaque catégorie de LT effecteur est caractérisée par l'expression inédite d'un facteur de transcription. Le facteur de transcription à l'origine de la voie TFH est Bcl6 (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009). L'expression de Bcl6 est dépendante de l'activation de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) induite par la sécrétion des cytokines IL-6 (produite par les DC) et IL-21 (produite par les LT activés) chez la souris (Nurieva et al., 2009). Chez l'Homme, d'autres groupes de cytokines seraient impliquées dans la différenciation en TFH : le TGF beta, l'IL-12 et l'IL-23 (Schmitt et al., 2014a; Vinuesa et al., 2016).

Les facteurs précis permettant d'engager les LT après reconnaissance de l'antigène spécifiquement vers la voie TFH ne sont pas complètement élucidés.

Il a été montré que les DC jouent un rôle majeur dans l'induction des TFH (Deenick et al., 2010; Goenka et al., 2011). Elles gouvernent l'engagement des LT activés vers la voie TFH, grâce à leur capacité de présentation d'antigène associée à l'expression de molécules de co-stimulation (ICOS notamment) et la sécrétion d'une combinaison singulière de cytokines dans un environnement précis (« niche ») (Choi et al., 2011). Ainsi l'induction de TFH s'effectuerait en présence d'une forte expression forte d'IL6 puis d'IL21 associée à une faible concentration en IL2. L'orchestration spatio-temporelle de la réponse semble en effet être un élément primordial à prendre en compte pour comprendre l'engagement des LT activés vers la voie des TFH (Li et al., 2016). Pour l'induction en TFH, le dialogue DC-LT activés devrait alors s'effectuer dans des « niches » à la périphérie de la zone T dans les organes lymphoïdes secondaires permettant de réguler, de façon très précise, la disponibilité des cytokines (notamment de l'IL2).

Les DC de cette zone, grâce à leur expression membranaire de CD25, séquestrent l'IL2 et limite sa disponibilité aux LT activés dans cette zone permettant leur engagement vers la voie TFH (Li et al., 2016).

L'orchestration des mouvements des LT activés est extrêmement importante. CXCR5 a été la première molécule chimio-attractante démontrée comme essentielle pour les TFH puisqu'elle favorise leur migration vers les ganglions (Haynes et al., 2007). D'autres molécules d'adhésion entrent en jeu. L'intégrine LFA1 (*Leukocyte-Function Associated Antigen-1*), notamment, joue un rôle déterminant pour la survie des TFH dans les niches des CG (Meli et al., 2016).

2.4. Etude des TFH chez l'homme : identification de TFH circulants

Chez l'homme l'étude des réponses des CG est compliquée car l'accès aux organes lymphoïdes secondaires est très limité.

Une population circulante de LT mémoires (CD4+CD45RA-) exprimant CXCR5 a été identifiée chez l'Homme (Morita et al., 2011). Cette population présente des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles communes avec les TFH des CG. Elles sont en effet capables d'induire *in vitro* une différenciation en plasmablastes et la production d'Ig grâce à la sécrétion d'IL-21 (Ma and Deenick, 2014). Cependant, à la différence des TFH des CG, les TFH circulants (ou périphériques), n'expriment pas Bcl6 (He et al., 2013).

Elles peuvent être catégorisées selon (Schmitt et al., 2014b; Vinuesa et al., 2016)

- (i) l'expression des molécules CXCR3 et CCR6 (Bentebibel et al., 2013; Morita et al., 2011). Ces marqueurs permettent de définir trois sous-groupes de TFH circulantes (cTFH) aux potentialités différentes en terme de stimulation/capacités d'aide des LB *in vitro*. Ces propriétés ont été étudiées en triant les différents sous-groupes de TFH puis en réalisant des co-cultures autologues entre ces différentes populations triées et des LB naïfs ou mémoires en présence d'un super antigène (en général l'entérotoxine staphylococcique de type B connue pour induire une collaboration entre LT et LB).

Dans une étude princeps, Morita *et al.* ont décrit que les sous-groupes cTFH2 (CXCR3- et CCR6-) et cTFH17 (CXCR3-CCR6+) sont les deux principaux sous-groupes capables de sécréter de l'IL-21 et d'induire la production d'Ig par les LB naïfs lors de ces co-cultures *in vitro*, contrairement au cTFH1 (CXCR3+ CCR6-). Les populations cTFH2 favoriseraient la sécrétion d'IgG et d'IgE alors que les cTFH17 induiraient la sécrétion d'IgG et d'IgA (Morita et al., 2011). Classiquement, les populations cTFH1 sont donc considérées comme peu pourvoyeuse d'aide pour les LB. Cependant, une activation polyclonale par stimulation Phorbol myristate acetate PMA/ionomycine les conduit à sécréter un niveau équivalent d'IL-21 que les deux autres sous-groupes. De plus, Bentebibel *et al.* ont récemment suggéré que les TFH ICOS+CXCR3+ favoriseraient le développement des réponses mémoires car ils sont capables d'induire la différenciation de LB mémoires en plasmocytes *in vitro* (Bentebibel et al., 2013). Parallèlement, l'émergence de cette population dans le sang de donneurs sains corrèle avec l'augmentation du taux d'anticorps protecteurs pré-existants, et donc avec l'activation des réponses mémoires, dans les suites d'une vaccination anti-grippale, *in vivo*.

- (ii) Les marqueurs ICOS, CCR7 et PD1 permettent de définir l'état d'activation des TFH circulants : les populations TFH circulantes ICOS+PD1hiCCR7lo correspondent à des populations activées alors que les populations ICOS-PD1+CCR7int et ICOS-PD1-CCR7hi correspondent à des populations quiescentes (Ueno et al., 2015). Ces deux populations quiescentes parmi les TFH2 et 17 sont capables de se réactiver et d'induire la sécrétion d'Ig par les LB naïfs (Schmitt et al., 2014b). La sous population PD1+CCR7int parmi les TFH2 et 17 serait tout particulièrement impliquée dans les réponses mémoires (Locci et al., 2013).

L'origine de ces TFH circulantes reste débattue.

Il est démontré que leur genèse est indépendante de la constitution des CG. En effet, les patients porteurs d'un déficit en protéine SAP (Syndrome lymphoprolifératif lié à l'X), nous l'avons vu, présentent un déficit immunitaire en lien avec l'absence de collaboration entre les TFH et les LB.

Cependant, l'induction de TFH grâce à l'aide des DC est préservée. Or ces patients (uniquement deux observations) présenteraient des taux normaux de TFH circulants, témoignant qu'au moins une partie de ces TFH circulants se développent avant la formation des CG (He et al., 2013).

Certains considèrent donc les TFH circulants comme des précurseurs de TFH (He et al., 2013). Les arguments en faveur de cette hypothèse sont (i) l'absence d'expression de Bcl6 à l'état basal, (ii) un niveau d'expression faible des marqueurs CXCR5 et PD1 comparativement à celui observé sur les TFH isolés à partir d'amygdales. Enfin, les modèles murins ont montré que la migration des TFH dans la circulation est limitée en période aigue de formation des CG (Shulman et al., 2014).

Cependant, il ne peut être exclu que les TFH des CG et notamment les TFH mémoires participent à la constitution du pool de TFH circulants, notamment lors de la résolution des réponses des CG (Linterman et al., 2011; Schmitt et al., 2014b; Ueno et al., 2015; Wollenberg et al., 2011).

Les arguments permettant de différencier ces deux étapes développementales n'ont pas encore été élucidés.

2.5. Particularités en TR : organes lymphoïdes tertiaires (OLT)

Lorsque le système immunitaire est stimulé de façon chronique, comme lors du rejet en transplantation, les interactions entre TFH et LB peuvent s'effectuer directement dans l'organe transplanté, avec ou sans formation de CG (Kerjaschki et al., 2004; Liarski et al., 2014; Thaunat et al., 2005). Dans un modèle d'interposition aortique chez le rat, modèle de rejet chronique vasculaire, Thaunat *et al.* ont même démontré que la quantité d'allo-anticorps de classe I produite dans le greffon aortique était plus élevée comparativement à celle produite dans les ganglions drainants ou la rate (Thaunat et al., 2005).

Chez l'Homme, des structures de type folliculaire ont été mises en évidence dans les pièces histologiques de greffons non fonctionnels explantés dans les suites d'un rejet chronique (Deteix et al., 2010).

En effet, des structures nodulaires sont observées, au sein desquelles les LB expriment l'enzyme AID gouvernant la commutation isotypique et les recombinaisons somatiques. Ces observations suggèrent que ces nodules correspondent à des CG fonctionnels et ont été confirmées par la caractérisation plus approfondie de la microarchitecture de ces nodules (Thaunat et al., 2010a). De plus, en développant un outil informatique, Liarski *et al.* ont démontré, sur des biopsies de greffon, lors de rejets mixtes cellulaires et humoraux qu'une interaction étroite, sous forme de conjugué, existait entre LB et TFH, ces derniers exprimant fortement Bcl-6 et l'IL-21 (Liarski et al., 2014).

Ces structures pourraient promouvoir le rejet chronique car plusieurs conditions sont réunies pour rendre les réponses immunitaires de ces structures plus « agressives » : inflammation locale, sur-représentation des T effecteurs par rapport aux T régulateurs et une forte concentration d'allo-antigènes (Thaunat et al., 2005, 2010b, 2012). Cependant, le rôle exact des OLT dans la physiopathologie du rejet n'est pas encore parfaitement défini (Koenig and Thaunat, 2016).

Nous venons de caractériser les étapes ainsi que les partenaires cellulaires et moléculaires impliqués dans la différenciation de LB effecteurs spécialisés dans la sécrétion d'anticorps affins. Dans le contexte allogénique, ces LB effecteurs jouent donc un rôle délétère puisqu'ils sont à l'origine de la production des DSA, *primum movens* du rejet humoral.

Cependant, la fonction des LB ne se limite pas à celle de la sécrétion des anticorps. Les LB peuvent de façon plus générale polariser la réponse immunitaire du fait de leur triple capacité de (i) CPA, (ii) d'expression de molécules de co-stimulation et (iii) de sécrétion de cytokines (Crawford et al., 2006; Lund and Randall, 2010; Thaunat et al., 2010c).

Ainsi, certains LB participeraient au contrôle des réponses inflammatoires et à la promotion de la tolérance. Ils sont appelés LB régulateurs. Ils ont initialement été mis en évidence dans les contextes pathologiques de rupture de la tolérance au soi et des maladies auto-immunes (Mauri and Menon, 2017; Rosser and Mauri, 2015). Ils participent à l'homéostasie de la réponse immune en favorisant la résolution de l'inflammation, permettant ainsi un retour à l'état « d'équilibre ».

3. Lymphocytes B régulateurs

3.1. Fonctions

Chez l'homme, l'identification de LB régulateurs repose sur la démonstration de leurs capacités fonctionnelles immunosuppressives. Pour être définis comme régulateurs, ces LB doivent en effet être capables de contrôler *in vitro* le développement de réponse inflammatoire (ou immune).

La fonction immunosuppressive des LB régulateurs humains a principalement été étudiée sur leurs capacités à contrôler *in vitro* l'activation de LT : inhibition de la sécrétion de cytokines inflammatoires, prolifération ou induction d'apoptose des LT, modification de la différenciation des LT en favorisant l'induction de LT régulateurs et inhibant les LT effecteurs (Th1 et Th17) (tableau 2) (Bigot et al., 2016; Blair et al., 2010; Bouaziz et al., 2010; Flores-Borja et al., 2013; Iwata et al., 2011).

Cependant, ces cellules sont également capables d'inhiber d'autres signaux inflammatoires : la sécrétion d'interféron (IFN)- γ par les LT CD8+ en réponse à l'infection par le virus de l'hépatite B (Das et al., 2012), la production de TNF- α par les monocytes dans les suites d'une activation dépendante des TLR (LPS et CPG) (Iwata et al., 2011) et la production d'IFN- α par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Menon et al., 2016). Le principal mécanisme impliqué dans la fonction immunosuppressive des LB régulateurs dans le contrôle de l'activation des LT est la sécrétion d'IL-10.

D'autres mécanismes sont également à l'origine des capacités fonctionnelles des LB régulateurs :

- Sécrétion d'autres molécules immunosuppressives (TGF β , IDO, IL-35) (Nouël et al., 2015)
- Mécanismes contact-dépendant par l'intermédiaire de granzyme B notamment (Chesneau et al., 2015)

3.2. Caractérisation phénotypique chez l'homme

Des LB régulateurs immunosuppresseurs sécrétant de l'IL-10 ont été définis à plusieurs stades de maturation des LB (**Tableau 2**) :

- Immatures transitionnels
- LB effecteurs (au terme de leur différenciation) :
 - LB mémoires
 - Plasmocytes

La conjonction de ces 2 facteurs, caractéristiques phénotypique et fonctionnelle, permet de différencier plusieurs « classes » de LB régulateurs (**Tableau 2**).

Mécanisme De Régulation	Stade De Maturation	Fonctions In vitro	Signaux D' induction	Phénotype	Contexte D'étude vivo
IL10-dépendant					
IL10	Transitionnel Mauri C	↓ IFN et TNFα LT ↓ Prolifération LT <u>Autres cibles :</u> CD8+, pDC, iNKT	CD40L CPG	24 ^{hi} 38 ^{hi}	Maladie auto-immune (MAI), greffe
	Mémoires Tedder, Bouaziz	↓ Prolifération LT	CPG, anti Ig	CD24 ^{hi} CD27+	MAI, Maladie du greffon contre l'hôte (GVH)
	Mémoires Tim-1 Rothstein, Liu	↓ IFN et TNFα LT spécifique de gag	CpG, Pam3CSK4	CD19+CD20+ Tim1+ CD27+/-	VIH
	Plasmocytes De Masson	? Non décrits	3 étapes (40L, IL21, IL2, IL10, IL15, IL6, IFNα)		GVH
IL10-indépendant					
Autres molécules immunosuppressives TGFβ, IDO	Nouel	↓ IFN et TNFα LT ↓ Prolifération LT	CpG	—	—
Granzyme B	Plasmocytes Brouard S	↓ Prolifération LT	CD40L CPG	CD5+CD27+ CD138+	Grefe

Tableau 2: Principales caractéristiques des LB régulateurs isolés chez l'homme

3.3. Implication des LB régulateurs en transplantation

Plusieurs arguments ont conduit à la démonstration de l'implication des LB régulateurs dans (i) le contrôle des réponses inflammatoires et (ii) l'induction de tolérance dans le contexte de l'allo-immunité.

Leur rôle anti-inflammatoire a été suggéré par les résultats catastrophiques d'un essai clinique évaluant l'utilisation du Rituximab comme unique traitement d'induction de patients transplantés rénaux non immunisés avant la greffe (Clatworthy et al., 2009). Cette étude a dû être interrompue prématurément en raison de la survenue d'une fréquence extrêmement élevée de rejet cellulaire parmi les patients traités par Rituximab. En effet, 83% des patients traités par Rituximab ont présenté des épisodes de rejet cellulaire. Cette incidence était plus élevée que celle décrite en l'absence totale de traitement d'induction ciblant les LT (évaluée à 35%, (Vincenti et al., 1998)). De façon concordante, le taux de cytokines inflammatoires plasmatiques des patients traités par Rituximab après transplantation était significativement plus élevé que celui de patients contrôles (Clatworthy et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle anti-inflammatoire des LB en transplantation.

De façon concordante, trois études ont montré une association inverse entre la fréquence des LB transitionnels régulateurs circulants et le risque de rejet cellulaire et/ou humoral, suggérant que ces LB pourraient avoir un rôle bénéfique en transplantation rénale (Cherukuri et al., 2014; Nouël et al., 2014; Shabir et al., 2015).

	Cherukuri	Nouel	Shabir
Design	Rétrospectif	Rétrospectif	Prospectif
Nombre (N) de patients	88	44	73
Immunosuppression	CNI, MPA	CNI, MPA, CT	CNI, MPA, CT
Modalités du suivi	-	-	J0, J14, M3,M6,M12
Suivi (mois)	26-320	12-234	Médian : 48
Rejet et LB transitionnels	Diminution significative du N de LB transitionnels et du ratio IL10/TNF lors de rejet humoral chronique (cABMR)	Diminution significative du N de LB transitionnels lors de cABMR ; « perte » de leur capacités fonctionnelles	Fréquence augmentée de LB transitionnels = diminution du risque rejet aigu cellulaire
Dn DSA et LB transitionnels	Non déterminé	Non déterminé	Pas d'association temporelle, fréquence + élevée de LB transitionnels pour dnDSA+rejet-

Tableau 3: Association inverse entre fréquence des LB régulateurs et risque de rejet.

Enfin, LB régulateurs participeraient à l'induction de tolérance en transplantation. Leur implication a été fortement suggérée par les données expérimentales. Une étude de souris greffées cardiaques rendues tolérantes après injection d'un anti-CD45-RB montre que l'état de tolérance est aboli chez des animaux déficients en LB et restaurée lors du transfert adoptif de LB provenant de souris tolérantes (Deng et al., 2007). Dans un autre modèle expérimental de tolérance, le transfert de LB purifiés à partir de rate de rats tolérants est également capable d'induire une tolérance dans un modèle de greffe cardiaque (Le Texier et al., 2011). Enfin, le groupe de David Rothstein a montré que le transfert adoptif de lymphocytes B régulateurs murins amplifié par l'anticorps anti-TIM1 (T cell Immunoglobulin mucin1) pouvait contrôler une réponse allogénique spécifique d'antigène dans un modèle de greffe d'îlots pancréatiques (Ding et al., 2011). Concernant les propriétés potentiellement suppressives des lymphocytes B chez l'Homme, une étape majeure a sans doute été franchie ces dernières années par l'étude de patients transplantés en situation dite de « tolérance opérationnelle » suggérant de façon alors inattendue que des LB pourraient avoir un rôle bénéfique quant au devenir des greffons rénaux (Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010). En effet, dans deux études cliniques distinctes, ces patients, ne manifestant aucun signe de rejet alors qu'ils avaient cessé leur traitement immunosuppresseur, présentent de manière homogène une signature cellulaire et transcriptomique « B » (Newell et al., 2010; Pallier et al., 2010).

La modulation des réponses immunitaires de patients transplantés devrait dans l'idéal inhiber les réponses effectrices délétères de sécrétion de DSA tout en préservant les populations LB régulatrices bénéfiques pour la survie des greffons.

III. Contrôle des réponses immunitaires par les traitements immunosuppresseurs

Cependant les stratégies actuelles pour permettre d'éviter les rejets des greffons reposent sur l'utilisation de traitements immunosuppresseurs qui vont neutraliser de façon globale le système immunitaire du receveur (Halloran, 2004). Ainsi, l'utilisation des traitements immunosuppresseurs est responsable de deux problématiques majeures qui représentent les deux principaux défis actuels en transplantation d'organe.

1. Généralités et enjeux

Premièrement, l'inhibition globale du système immunitaire expose les patients transplantés traités par immunosuppresseurs aux risques d'infection et de cancer (Rama and Grinyó, 2010). Ainsi, la première cause de perte des greffons est le décès du patient avec un greffon fonctionnel. Réduire voir arrêter définitivement les traitements immunosuppresseurs représentent donc un objectif majeur en transplantation.

Dans ce cadre il apparaît comme fondamental de définir des stratégies immunosuppressives individualisées basées sur une conjonction de paramètres clinico-biologiques et notamment l'utilisation de biomarqueurs prédictifs, permettant d'adapter l'intensité et la nature du traitement immunosuppresseur à chacune des situations immunologiques.

Le corollaire serait de définir une stratégie thérapeutique permettant d'induire une tolérance du greffon, c'est-à-dire de « reprogrammer le système immunitaire » pour pouvoir à terme interrompre les traitements immunosuppresseurs tout en maintenant une stabilité de fonction du greffon.

Plusieurs protocoles d'induction de tolérance centrale et périphérique sont actuellement développés chez l'homme en transplantation rénale (Braza et al., 2015; Cetrulo et al., 2015).

La compréhension des principaux mécanismes immunologiques et des protagonistes immunitaires impliqués dans « l'acceptation » du greffon est une étape préliminaire fondamentale pour mettre en œuvre ces objectifs

L'utilisation des traitements immunosuppresseurs a permis d'améliorer la survie des greffons rénaux à 1 an grâce à une excellente prévention du rejet cellulaire aigu (Hariharan et al., 2000). Cependant, la survie à long terme des greffons n'a que peu progressé ces dernières années malgré des progrès thérapeutiques (Meier-Kriesche et al., 2004). En effet, les stratégies immunosuppressives classiques contrôlent mal la survenue des DSA, responsables comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, d'un rejet chronique et d'une athérosclérose accélérée du greffon.

Il est donc devenu primordial de comprendre comment agissent les différents traitements immunosuppresseurs sur la réponse lymphocytaire B. Cette connaissance permettrait de combiner au mieux les différents outils thérapeutiques à notre disposition afin d'optimiser les stratégies thérapeutiques pour prévenir l'apparition des DSA après transplantation mais également de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement plus efficaces.

2. Différentes classes des traitements immunosuppresseurs

En greffe rénale, la prévention du rejet du greffon s'effectue selon deux temps thérapeutiques successifs :

- (i) le traitement d'induction, correspondant à une immunosuppression intense à la phase initiale de la transplantation
- (ii) le traitement d'entretien au long cours

L'activation du système immunitaire peut être bloquée selon 3 voies théoriques : (i) en induisant la déplétion globale des lymphocytes, (ii) en inhibant leur mobilisation ou en (iii) bloquant leurs voies d'activation (Halloran, 2004).

Les différents traitements immunosuppresseurs ont ainsi principalement été développés pour induire une déplétion ou cibler l'activation des LT (Figure 11).

2.1. Les traitements d'induction

Le traitement d'induction consiste en des traitements immunosuppresseurs administrés par voie intra-veineuse au moment du geste chirurgical. Il permet de diminuer le risque de rejet aigu cellulaire (Padiyar et al., 2009).

2.1.1. Anti-thymocytes (Thymoglobuline)

Il s'agit d'anticorps polyclonaux provenant de lapins immunisés par des thymocytes humains. Ils induisent une déplétion des LT et la lymphopénie T profonde qui en résulte peut persister jusqu'à 1 an post-greffe (Brennan et al., 1999; Kho et al., 2012). Il est le traitement d'induction de référence pour les patients immunisés, c'est à dire porteurs d'anticorps anti-HLA, avec ou sans individualisation de DSA (Brokhof et al., 2014; Noël et al., 2009; Thibaudin et al., 1998).

2.1.2. Anti-CD25 (Basiliximab)

Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD25 (récepteur de la chaîne alpha de l'IL-2), exprimé par les LT activés. Il induit donc une déplétion peu profonde des LT. Il est utilisé pour des patients de faible risque immunologique, c'est à dire sans événement immunisant et ne présentant pas d'antécédent de DSA.

2.1.3. Anti CD52 (Alemtuzumab)

Il s'agit d'un anticorps humanisé dirigé contre le CD52. Il induit une déplétion massive des populations lymphocytaires T et B pendant plus d'un an (Lee et al., 2014).

2.1.4. Bolus de corticoïdes

Les corticoïdes agissent notamment en modifiant les voies de signalisation déclenchée par l'activation du récepteur des LT (TCR) (Löwenberg et al., 2005; Van Laethem et al., 2001). A forte dose par voie intraveineuse, il participe systématiquement au traitement d'induction pour tous les patients transplantés rénaux. A faible dose, *per os*, il constitue un des piliers du traitement d'entretien.

2.2. Les traitements d'entretien

Le traitement d'entretien repose sur la combinaison de plusieurs classes de traitements immunosuppresseurs que le patient doit prendre quotidiennement pour diminuer le risque et retarder l'apparition de rejets cellulaires et humoraux.

2.2.1. Les anticalcineurines (CNI)

Les CNI sont la pierre angulaire des stratégies immunosuppressives en transplantation d'organes. Ils inhibent partiellement la voie de signalisation des calcineurines déclenchée par la combinaison des deux premiers signaux d'activation (signal 1 induit par le BCR et 2 par les molécules de co-stimulation) (Jørgensen et al., 2003). Cette classe thérapeutique regroupe deux molécules : la ciclosporine et le tacrolimus

2.2.2. Mycophenolate Mofetil (MPA)

Il s'agit d'inhibiteurs des bases puriques. Ils induisent un blocage de la production de nucléotides de guanidine, nécessaires pour la synthèse d'ADN et sont donc responsables d'un blocage du cycle cellulaire (Mele and Halloran, 2000).

Ils inhibent également la glycosylation de molécules d'adhésion impliquées dans les interactions entre lymphocytes et endothélium.

L'association corticoïdes, CNI et MPA constituent le traitement d'entretien de référence chez les patients transplantés rénaux.

2.2.3. Les inhibiteurs de mTOR (Sirolimus et Everolimus)

Ils bloquent le signal 3 d'activation des LT c'est à dire la signalisation induite par les récepteurs des cytokines. Ils inhibent la prolifération des LT et la sécrétion de cytokines (Kahan et al., 1991; Zhang et al., 2011).

Leur place dans l'arsenal thérapeutique n'est pas encore parfaitement définie (Rostaing and Kamar, 2010). Bien que présentant des avantages en terme de diminution du risque anti-tumoral et de protection vasculaire, l'utilisation des inhibiteurs de mTOR en remplacement des CNI ou associée aux CNI à « fortes doses » a été marquée par de nombreux effets secondaires (Holdaas et al., 2011) et par une augmentation du risque d'apparition de DSA *de novo* (cf. partie 3) (Grimbert and Thaumat, 2017). L'évaluation de protocole utilisant ces 2 molécules à faibles doses est en cours d'évaluation mais semble prometteuse (Grimbert and Thaumat, 2017).

2.2.4. Les inhibiteurs des molécules de co-stimulation (Belatacept)

Cibler les molécules de co-stimulation est également une stratégie thérapeutique qui connaît un véritable essor. Le CTLA4-Ig est la seule spécialité commercialisée et comprend deux molécules (Abatacept et Belatacept). Nous revenons plus en détail sur le Belatacept, objet de cette thèse au chapitre 4.

De nouvelles molécules sont en cours de développement, dont l'anticorps anti-CD28 (F(ab)') (Ville et al., 2016).

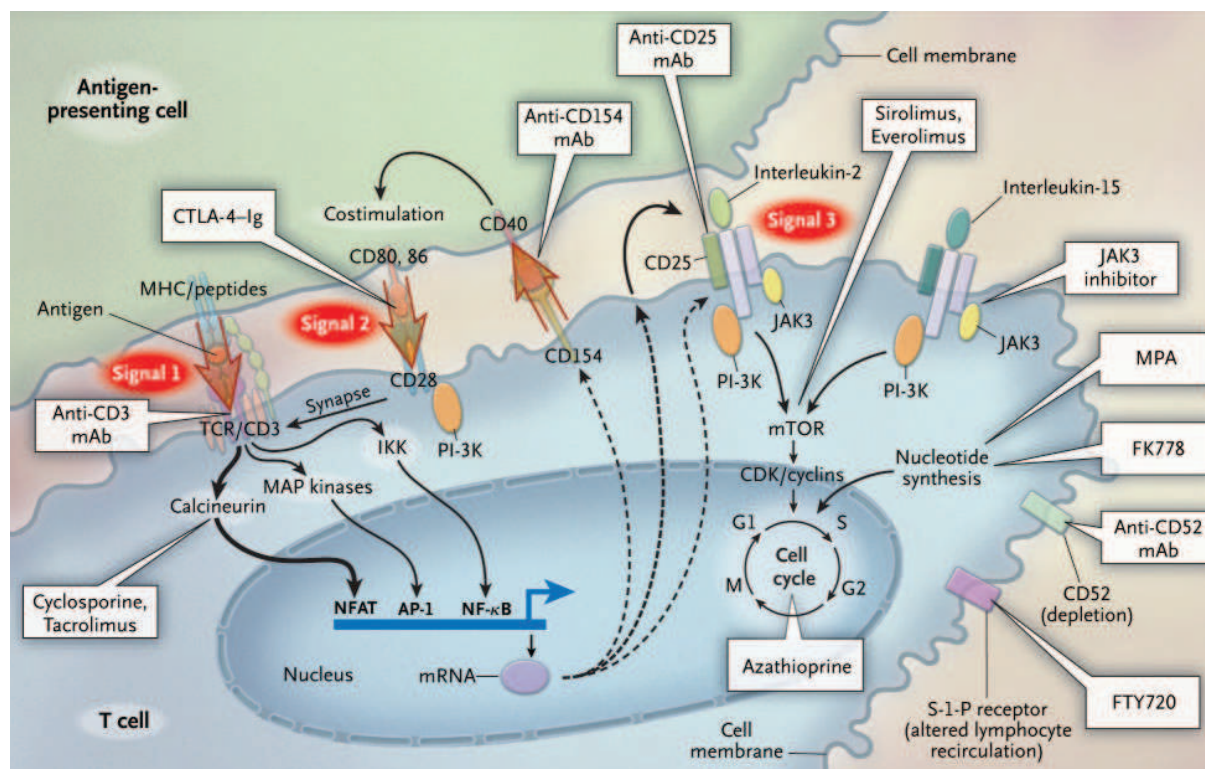


Figure 11: Cibles théoriques des différentes classes des traitements immunosuppresseurs pour inhiber l'activation du lymphocyte T. (tiré de Halloran NEJM 2004)

3. Mode d'action sur le lymphocyte B

Les modalités d'action de ces différents traitements immunosuppresseurs sur la réponse lymphocytaire B et leurs conséquences font l'objet d'une revue insérée dans le manuscrit page 149 (O'Leary et al., 2016; Thaumat et al., 2016).

Une des difficultés de l'évaluation « clinique » provient de l'utilisation combinée des traitements immunosuppresseurs chez les patients rendant difficile d'individualiser les effets/implications propres de chaque molécule. Ainsi c'est la stratégie thérapeutique, c'est à dire la combinaison des différents traitements d'entretien, qui est évaluée. L'efficacité des différentes stratégies immunosuppressives en terme de contrôle de la réponse humorale repose sur l'évaluation de l'incidence des DSA *de novo*, celle des rejets humoraux aigus et la survie globale des greffons.

L'incidence générale d'apparition de DSA avec les stratégies immunosuppressives classiques associant CNI, MPA et CT est de l'ordre de 15 à 30% selon les études (Everly et al., 2013; Rebellato et al., 2011; Wiebe et al., 2012). Bien que les inhibiteurs de mTOR

semblent avoir dans les modèles pré-cliniques et *in vitro* une action directe sur la réponse B en diminuant leur prolifération, la production d'Ig et la différenciation en plasmablastes, un doute persiste encore sur leur bénéfice pour prévenir l'apparition des DSA *de novo* (Grimbert and Thaumat, 2017). En effet l'utilisation des inhibiteurs de mTOR, non associée aux CNI, augmente le risque d'apparition de DSA *de novo* dans les études cliniques.

Etant donné notre accès limité aux OLS des patients, la mise en évidence des différents modes d'action sur la réponse B repose sur le développement de modèles expérimentaux associé à des études *in vitro*.

Le tableau 4 résume l'état des connaissances concernant les différents modes d'action *in vitro* des traitements immunosuppresseurs classiques sur les différentes fonctions des LB.

Traitements Immuno- suppresseurs	Prolifération		Différenciation		Sécrétion d'Ig		CPA	Sécrétion de cytokines
	LB Naïf	LB Mémoire	Plasmablaste	Plasmocyte	LB activé	Plasmocyte		
CNI	0	0	0	0	0	0	?	0
MPA	Inh +++	Inh +	0	0	Inh	0	?	↓ IL10
mTOR	Inh +	Inh +++	Inh	0	Inh	0	↑ >polarisation Th1	↓ IL10 et IL6
Forte dose CT	Inh +	0	0	Inh	Inh	Inh	?	?

Tableau 4 : Mode d'action des différentes classes thérapeutiques sur les différentes fonctions des LB *in vitro*. CPA (Cellules présentatrices d'antigènes), Inh (Inhibition)

La compréhension des mécanismes de contrôle de la réponse humorale par les différents immunosuppresseurs couplés aux résultats des études cliniques permet de définir les meilleures stratégies immunosuppressives pour prévenir l'apparition des DSA *de novo*. Elle permet également d'acquérir des données fondamentales sur les mécanismes sous-tendant la réponse B et ainsi de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques potentiellement plus efficaces.

Enfin la portée de ces données dépasse le cadre de la transplantation puisque les traitements immunosuppresseurs sont également la pierre angulaire du traitement des maladies auto-immunes. De plus l'utilisation des immunothérapies (et notamment inhibiteur de « checkpoint ») pour booster le système immunitaire explose dans le traitement du cancer (Suarez-Almazor et al., 2017). Les connaissances fondamentales

sur le fonctionnement (blocage ou stimulation) du signal de co-stimulation sont primordiales pour optimiser leur efficacité et la gestion des complications auxquelles sont exposées les patients.

4. Le CTLA4-Ig

Le CTLA4-Ig, molécule LEA29Y (Belatacept, *Bristol Myers Squibb, BMS*), est un nouvel immunosuppresseur développé pour remplacer les CNI dans la triade du traitement d'entretien du patient transplanté rénal non immunisé (c'est à dire ne présentant pas de DSA historique).

Cette molécule a été développée dans l'objectif de diminuer la néphrotoxicité associée au CNI, puisque dans cette configuration la stratégie immunosuppressive des patients ne comporterait pas de CNI.

Il s'agit d'une molécule de fusion associant la partie extracellulaire du CTLA4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) avec le fragment constant Fcγ d'une IgG1 humaine. La molécule de CTLA4 a bénéficié d'une mutagénèse dirigée de deux acides aminés permettant d'augmenter son affinité pour le CD86 (Larsen et al., 2005).

Le CTLA4-Ig bloque la liaison entre (i) les molécules de co-stimulation CD80-CD86 présentes à la surface des cellules présentatrices d'antigène et (ii) le CD28, situé à la surface des LT. Il inhibe ainsi l'activation des LT en inhibant le 2^{ème} signal de co-stimulation (*cf.* Figure 11).

Cependant en dehors de l'inhibition de la signalisation de CD28, le CTLA4-Ig modifie également les interactions des autres molécules de co-stimulation de la famille du CD28. Le CTLA4-Ig bloque en effet également (i) la liaison du CTLA4 « naturel » ainsi que (ii) celle de PDL1 avec CD80, tout en laissant la possibilité à ICOS-L de se lier au CD28 (Figure 12) (Ford, 2016).

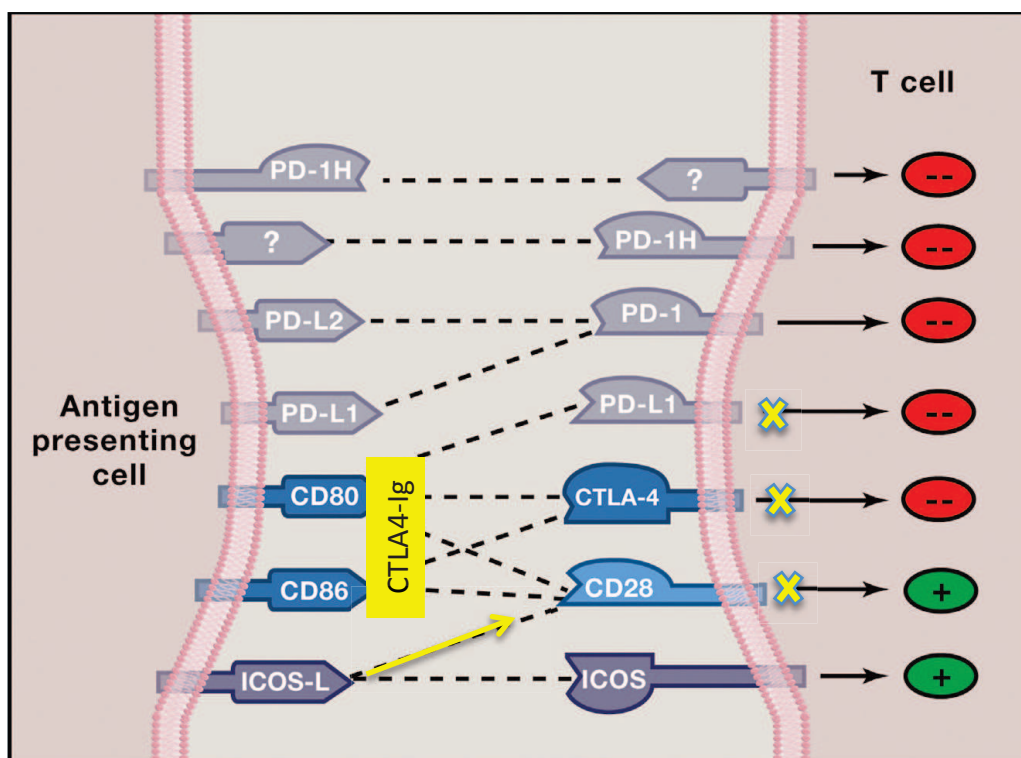


Figure 12 : Conséquences du Belatacept (CTLA4-Ig) sur les mécanismes de co-stimulation lors de la synapse immunologique. La famille du CD28 comprend différents acteurs moléculaires à l'origine d'une signalisation inhibitrice (Rond rouge) ou activatrice (Rond vert) dans le LT.

Deux études cliniques de phase III (BENEFIT et BENEFIT-EXT) ont comparé l'évolution clinique de patients transplantés rénaux non immunisés avant la greffe, traités soit par CTLA4-Ig, MPA et corticoïdes soit par un protocole standard associant CNI, MPA et corticoïdes.

Sur la base des résultats cliniques à trois ans de ces deux études de non infériorité, les agences françaises et américaines du médicament ont validé la mise sur le marché du CTLA4-Ig en 2011 (Rostaing et al., 2013; Vincenti, 2012).

Malgré une incidence plus élevée de rejets aigus cellulaires traités efficacement par bolus de corticoïdes (17 versus 7%), la survie à 3 ans des greffons des patients traités par CTLA4-Ig était comparable à celle des patients contrôle. Cette augmentation du risque de rejet cellulaire pourrait être expliquée par le fait que la signalisation de CD28 dans les LT mémoires allo-réactifs ne serait pas nécessaire à leur activation (Ford, 2016) comme cela a été suggérée par les modèles expérimentaux (Adams et al., 2003; Kitchens et al., 2012).

Cependant, ce sont surtout la publication des résultats cliniques de ces deux études de phase III sur le long terme (avec sept ans de recul) qui ont retenu l'attention de la communauté de transplantateurs (Vincenti et al., 2016). En effet dans un contexte où la survie à long terme des greffons n'a que peu progressé au cours de ces dix dernières années, le CTLA4-Ig pourrait ouvrir de nouvelles perspectives. En effet, les patients traités par CTLA4-Ig présentent une meilleure survie des greffons par rapport au groupe de patients contrôle traités par CNI. De plus la fonction des greffons est également significativement meilleure pour les patients traités par CTLA4-Ig par rapport aux patients CNI.

Problématique

Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être avancées pour expliquer cette excellente efficacité clinique. Elle pourrait être liée à :

- (i) L'amélioration de l'observance des patients traités par CTLA4-Ig. En effet, ce traitement est administré mensuellement en hôpital de jour par voie intraveineuse.
- (ii) L'abolition de la néphrotoxicité des CNI, du fait de la stratégie d'épargne en anti-calcineurines.
- (iii) Des différences de cibles immunologiques.

De façon importante, les résultats cliniques ont également mis en évidence que l'incidence des DSA *de novo* est significativement plus faible dans le groupe de patients traités par CTLA4-Ig par rapport au groupe CNI (5% contre 18% respectivement).

L'efficacité du contrôle de la réponse humorale par le CTLA4-Ig chez l'Homme est concordante avec les données expérimentales (Chen et al., 2013; Ford et al., 2007; Kim et al., 2014). En effet, dans des modèles murins et de primates non humains, l'utilisation du CTLA4-Ig diminue la production de DSA. Dans un modèle de rejet aigu humoral induit par une incompatibilité rhésus, un traitement par Belatacept permet de réduire l'incidence de DSA *de novo*. De plus les analyses histologiques montrent une réduction de taille des ganglions, ainsi qu'une diminution de la fréquence des LB et des TFH dans les CG ainsi que de la production d'IL21 (Kim et al., 2014).

Même si la plus faible incidence des DSA *de novo* chez l'Homme pourrait être expliquée par une meilleure observance thérapeutique, les résultats de mon travail de master 2 apportent un éclairage différent (Leibler et al., 2014). En effet, nous avons montré que le répertoire des LB circulants des patients transplantés rénaux traités par CTLA4-Ig était significativement différent par rapport à un groupe contrôle de patients traités par CNI. Les patients du groupe CTLA4-Ig présentaient notamment une fréquence augmentée de LB immatures transitionnels (*cf.* Annexe 2) (Leibler et al., 2014).

Aux vues de l'association de ces 2 résultats (incidence plus faible de DSA et différence du répertoire des LB circulants), mon travail de thèse a testé l'hypothèse selon laquelle **l'efficacité clinique du CTLA4-Ig serait liée à des mécanismes de contrôle inédits sur la différenciation lymphocytaire B et la réponse humorale.**

Résultats

Title: Control of humoral response in renal transplantation by CTLA4-Ig depends on a direct effect on B cells and impaired T follicular helper (Tfh)- B cells crosstalk.

Authors: Claire Leibler^{1,2,3}, Allan Thiolat^{1,2,\$}, Carole Hénique^{1,2,\$}, Chloé Samson^{1,2}, Caroline Pilon^{1,2}, Marie Tamagne⁴, France Pirenne⁴, Benoit Vingert⁴, José L. Cohen^{1,2,3}, Philippe Grimbert^{1,2,3}.

Présenté oralement : **Congrès de la SFT, Liège 2016**

Soumis à JASN

Nous avons voulu déterminer l'action du CTLA4-Ig sur la différenciation lymphocytaire B et la réponse humorale.

Nous avons dans un premier temps voulu étudier si la liaison du CTLA4-Ig sur les récepteurs CD80-CD86 exprimés à la surface des LB activés avait des conséquences directes, c'est à dire indépendantes de l'implication des LT, sur leur différenciation et la fonction humorale.

Nous avons ensuite voulu étudier les conséquences du blocage des signaux de co-stimulation sur le dialogue TFH-LB, qui joue un rôle primordial dans l'induction et le maintien de la réponse humorale. Nous avons pour ce faire développé un modèle *in vitro* de co-culture TFH-LB.

Enfin nous avons voulu vérifier la cohérence de nos données *in vitro* en étudiant les caractéristiques des LB effecteurs et des TFH circulants des patients transplantés rénaux traités par CTLA4-Ig.

Ce travail de thèse a permis de montrer que le CTLA4-Ig peut moduler (i) la réponse humorale en agissant directement sur les LB, c'est-à-dire sans moduler l'implication des LT mais module également (ii) la fonction présentatrice d'antigène et stimulatrice des LB lors de la synapse TFH-LB.

Control of humoral response in renal transplantation by CTLA4-Ig depends on a direct effect on B cells and impaired T follicular helper (Tfh)- B cells crosstalk.

Running Title

Direct effect of CTLA4-Ig on B cells

Authors

Claire Leibler^{1,2,3}, Allan Thiolat^{1,2,\$}, Carole Hénique^{1,2,\$}, Chloé Samson^{1,2}, Caroline Pilon^{1,2}, Marie Tamagne⁴, France Pirenne⁴, Benoit Vingert⁴, José L. Cohen^{1,2,3}, Philippe Grimbert^{1,2,3}.

Affiliations

1 : Université Paris-Est, UMR 955, UPEC, Créteil, France

2 : Inserm, U955, team 21, Créteil, France

3 : AP-HP, Hopital Henri-Mondor – A. Chenevier, CIC-BT-504, Creteil, France

4 : Inserm, U955, team 2, Créteil, France

\$ Authors equally contributed to the study

Corresponding author:

Pr Philippe Grimbert

Service de Néphrologie et Transplantation

Pôle Cancérologie-Immunité-Transplantation-Infectiologie (CITI) et unité INSERM U955

CHU Henri Mondor and Université Paris-Est-Créteil (UPEC)

France

Tel: +33 1 49 81 24 60/ 24 53 Email: philippe.grimbert@aphp.fr

Key Words: Belatacept (CTLA4-Ig) ; Kidney Transplantation ; B cells ; T follicular helper cells

Words count: (2901/3000 words) – Abstract: (248/250 words)

Abstract

Generation of *de novo* DSAs (*dn*DSAs) after renal transplantation is recognized as the leading cause of late transplant failure. Hence there is a need to define the best immunosuppressive strategies to limit their development. Recent clinical trials using the novel co-stimulatory blockade agent CTLA4-Ig (Belatacept) have shown that kidney transplanted recipients (KTR) treated with Belatacept exhibit better graft survival and function, and lower proportion of *dn*DSAs compared with control recipients. Mechanisms involved in the control of humoral responses by CTLA4-Ig remain to be investigated. Here, we analyzed the effect of CTLA4-Ig on different steps of the B cell mediated response in human. *In-vitro*, we showed that CTLA4-Ig reduced plasmablast differentiation and immunoglobulin production in a T cell-independent manner. The expression of the transcription factor Blimp-1, mainly involved in plasma cell differentiation and function, was significantly decreased in the presence of CTLA4-Ig. Moreover the reduced expression of CD86 after CTLA4-Ig treatment suggested a direct intracellular signaling in B cells. Additionally, we showed that CTLA4-Ig blocked CD28-mediated activation of T follicular helper cells (Tfh) in an autologous Tfh-memory B cells model. We validated these observations in KTR treated with Belatacept by showing reduced proportion of blood effector B cells and activated Tfh (PD1+ICOS+) compared with control recipients. Our *in-vitro* and *in-vivo* results suggest that CTLA4-Ig modulates B cells function at two levels, directly on B cells and at the B cell-Tfh crosstalk level. These mechanisms likely account for the optimal control of humoral responses observed in KTR treated with Belatacept.

Introduction

Over the last decade, donor-specific anti-HLA antibodies (DSAs) arising after kidney transplantation, also called *de novo* DSAs (*dn*DSAs), have increasingly been recognized as the leading cause of late transplant failure in kidney transplanted recipients (KTR) ^{1,2}. Precisely, around 15–30% of KTR develop *dn*DSAs ^{3,4}. Despite the numerous treatment strategies directed to boost conventional immunosuppression or to inhibit or remove B cells, plasma cells, antibodies, and/or complement, there has been no satisfactory therapy that could reliably reverse the effects of DSAs once established ⁵. Therefore, clinicians have to focus on the primary prevention of *dn*DSAs generation. One of the risk factors associated with the development of *dn*DSAs is the therapeutic immunosuppression which obviously represents the parameter with the widest range of potential improvement in terms of patient's compliance, the degree of immunosuppression, and maybe the nature of the drugs itself.

Belatacept (CTLA4-Ig, LEA29Y, Bristol Myers Squibb) is a human fusion protein combining the extracellular portion of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) that has been mutated to confer greater binding avidity to CD80 and CD86 (B7 molecules), and the constant region fragment of human immunoglobulin G1 (IgG1). CTLA4 binds to surface costimulatory ligands (CD80 and CD86) of antigen-presenting cells (APCs), thus prevents their interaction with CD28 and thereby blocks T-cell activation ⁶. Belatacept got approval of the U.S. Food and Drug Administration and the European Medicines Agency in 2011, based on the 3-year data from two phase III studies: Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-line Immunosuppression Trial (BENEFIT), and BENEFIT-Extended Criteria Donors (BENEFIT-EXT) ^{7,8}. In their follow-up analysis of the BENEFIT trial, Vincenti *et al.* found that recipient mortality and the graft failure rate at 7 years after transplantation was significantly lower in the group of recipients treated with Belatacept compared with the control recipients treated with calcineurin inhibitors (CNI)⁹. Interestingly, incidence of *dn*DSAs at year 7 was significantly lower in Belatacept-treated patients than in CNI-treated patients⁹. This latter result can be considered as an active determinant of long-term graft outcome in patients treated with Belatacept. In those trials, it was suggested that improved adherence to the intravenous regimen could explain why Belatacept was associated with less *dn*DSAs formation¹⁰. However, in our cohort of KTR included in the

BENEFIT trial, we previously showed that the proportion and absolute number of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, a subset known to be associated with operational tolerance^{11,12}, are increased compared with controls. This suggests that CTLA4-Ig may have regulatory effect on B cells¹³.

The mechanisms of action of CTLA4-Ig begin to be elucidated. In animal models, CTLA4-Ig inhibits T-dependent antibody production. Larsen *et al.* demonstrated improved inhibition of anti-sheep red blood cell antibodies by Belatacept compared with its parent Abatacept¹⁴. The combined blockade of both CD28:B7 and CD40:40L pathways suppressed DSAs formation in kidney-transplanted macaques¹⁵. Moreover, Kim *et al.* have shown in a non-human primate model that Belatacept or anti-CD40 mAb, combined with lymphodepletion suppressed the humoral response leading to the prevention of antibody-mediated rejection. This observation was associated with a reduced frequency and size of germinal centers and a reduced proportion of follicular helper T cells (Tfh)¹⁶. Altogether, these results led us to evaluate in human whether CTLA-Ig could act (i) directly on immunoglobulin production by B cells and/or (ii) on their antigen presenting cell property.

Our results show that CTLA4-Ig worked directly by decreasing the plasmablasts differentiation and IgG secretion, and by modifying the expression of co-stimulatory molecules on the surface of activated B cells. We also demonstrated, using an *in-vitro* model and *in-vivo* data collected on KTR, that CTLA4-Ig decreases the proportion and activation status of circulating Tfh, and impairs Tfh/B cells crosstalk.

Results

CTLA4-Ig modulates plasmablasts differentiation and function

Since patients treated with Belatacept showed a reduced DSAs production, we first assessed whether CTLA4-Ig could have a direct effect on B cells. To assess plasmablast differentiation (defined as CD19^{lo}CD38^{hi}CD27^{hi}, Figure 1A), untouched B cells were stimulated with CD40L and IL-21 to mimic Tfh help. After 5 days, such stimulation significantly increased plasmablasts by 29 fold as compared with unstimulated B cells (Figure 1B). In the presence of CTLA4-Ig, the plasmablast proportion was slightly but

significantly decreased compared with untreated cells (Figure 1C). The mortality of B cells and the proportion of memory B cells (defined as CD19+CD38-CD27+) were not affected by CTLA4-Ig (Supplemental Figure S1, A-B). The proliferative capacities of plasmablasts (Supplemental Fig S1 C-D), and more generally of B cells (data not shown), were not altered by CTLA4-Ig.

Secondly, we studied the functionality of activated B cells in terms of IgG and IgM secretions. Given that CTLA4-Ig is composed of type 1 human gamma chain, total IgG and IgG1 production could not be quantified. We also observed that CTLA4-Ig interfered with IgG3 detection (data not shown). However, the secretions of both IgG2 and IgG4 were significantly decreased in the presence of CTLA4-Ig (Figure 1, D and E). The production of IgM was not statistically different between treated and untreated cultures although it showed a trend to decrease in CTLA4-Ig treated cultures (Figure 1F).

Blimp-1 is the major transcription factor involved in plasmablasts differentiation and antibodies secretion. Importantly, using western blot, we showed a decrease in Blimp-1 expression in CTLA4-Ig stimulated culture compared to control at day 5 (Figure 1, G and H). Thus, our model reveals that the reduced amount of DSAs observed in treated patients could rely on a direct effect on B cells without T cell participation.

CTLA4-Ig modifies the expression of co-stimulatory molecules on B cell surface

We next aimed to assess whether CTLA4-Ig could directly act on CD80 and CD86 expressed by the different B cells subsets.

We firstly showed, using flow cytometry, that the *in-vitro* stimulation induced high expression of CD80 and CD86 on cultured B cells at day 5 *i.e.* the proportions of CD80+ and CD86+ B cells increased by 128% and 413%, respectively after stimulation (Supplemental Figure S2 A-B). Interestingly, we observed different patterns of expression of CD80 and CD86 on memory B cells and on plasmablasts, the two types of fully differentiated B cells. Indeed, CD80 mean proportion was similar on memory B cells and plasmablasts, but CD80 mean fluorescence index (MFI) was 3 fold higher in memory B cells compared with plasmablasts. CD86 proportion was significantly lower in memory B cells compared with plasmablasts, and the same trend was seen for MFI (Supplemental Figure S2 C-D).

Afterwards, when CTLA4-Ig was added to the culture, we observed a significant decrease in the proportion and MFI of CD80 and CD86 in activated B cells (Supplemental Figure S2 E), memory B cells, and plasmablasts as compared with untreated cultures (Figure 2, A-D). Moreover, the decrease in CD86 expression was confirmed by immunoblot on CTLA4-Ig treated B cells lysates as compared with untreated cells (Figure 2, E and F), which strongly suggests that the decreased CD86 expression was due to a direct signal *via* CD86 rather than epitope blockade by CTLA4-Ig. We also observed that about 6% of B cells expressed CD28 and that was not modulated by CTLA4-Ig (Figure 2G).

ICOSL (Inducible T-cell co-stimulator ligand) expression was not modified by CTLA4-Ig (data not shown). In contrast, PDL1 (Programmed cell death ligand 1) expression on total activated B cells and plasmablasts was significantly increased in the presence of CTLA4-Ig (Figure 2H).

CTLA4-Ig disrupts Tfh-B cells interaction both *in-vitro* and *in-vivo*

Given that CTLA4-Ig directly induced modification of co-stimulatory molecules expression on B cells, we wondered whether CTLA4-Ig could also impact Tfh-B cells crosstalk. For such, we co-cultured sorted autologous Tfh (CD4+CD45RA-CXCR5+PD1+) and memory B cells (CD19+IgD-CD38^{dim}CD27+/-) from healthy blood donors (HBD) for 5 days, with or without CTLA4-Ig. We did not observe any difference in Tfh cell proportion and survival in the presence of CTLA4-Ig (data not shown). However, the proportion and MFI of activated ICOS (Inducible T-cell co-stimulator)+ and the proportion of PD1 (Programmed cell death-1)ICOS+ Tfh cells were reduced in the presence of CTLA4-Ig (Fig. 3A, B-D). Interestingly, we observed that plasmablasts proportion was lower in the CTLA4-Ig treated cultures (Fig. 3F).

Our following question was whether the B and Tfh phenotypes modification observed *in-vitro* could also be observed in the peripheral blood of grafted patients. For this, we analyzed blood samples of kidney-transplanted recipients (KTR), who had stable graft functions treated with either CTLA4-Ig (CTLA4-Ig group, n=10) or CNI (CNI group, n=12), and an additional cohort of HBD (n=12). Basic clinical characteristics of KTR treated with CTLA4-Ig or CNI, are displayed in Table 1.

Although CD19⁺ cells proportion and lymphocytes counts were not different between both groups of KTR, recipients treated with CTLA4-Ig displayed significantly reduced absolute number of CD19⁺ (Table 2). Moreover, the proportions and absolute numbers of memory B cells (CD19⁺CD27⁺), switched memory B cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁻), and unswitched memory B cells (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) were significantly reduced in KTR treated with CTLA4-Ig compared with CNI patients (Figure 4, A-F). Finally, CTLA4-Ig group also displayed lower proportion of blood plasmablasts (CD19⁺CD38^{hi}CD24⁻) in CD19⁺ cells as compared with CNI group (Figure 4, G).

To assess B cells capacities to interact with Tfh, we analyzed the pattern of expression of CTLA4-Ig ligands *i.e.* CD80 and CD86, on circulating B cells. CD80 and CD86 were not expressed on the same circulating B cell subpopulations of HBD, and their expression varied according to the maturation stages of B cells (Figure 5, A-C). For instance, CD80 was mainly expressed on memory B cells (CD19⁺CD24⁺CD38⁻), whereas CD86 expression was predominant on immature transitional B cells (CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}) (Figure 5, A-C). In KTR treated with CTLA4-Ig, the proportion and MFI of CD80⁺ B cells were significantly reduced in B cells, compared with CNI treated patients (Figure 5, D and E). A similar significant reduction of MFI of CD80⁺ B cells was noticed in memory B cells of CTLA4-Ig group (Figure 5, G), while the proportion of CD80⁺ B cells tended to be lower in the CTLA4-Ig group ($p=0.069$, $n=6$) (Figure 5, F). No difference was detected in the proportion of CD86⁺ B cells between CTLA4-Ig and CNI groups (data not shown). The analysis of CD86 MFI could not be interpreted due to the scarce number of events.

We finally aimed to compare the proportions and activation status of circulating Tfh between the 3 groups of individuals (KTR and HBD). The proportions of total CD4⁺ and memory CD4⁺CD45RA⁻ were similar in both groups of KTR (Table 2). However, KTR treated with CTLA4-Ig had lower absolute numbers of memory CD4⁺CD45RA⁻ T cells than those treated with CNI (Table 2, Figure 6, A-C). The proportion and absolute numbers of circulating Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺) were significantly lower in KTR treated with CTLA4-Ig than in CNI treated patients (Figure 6, D and E). The quantitative Tfh defect observed in KTR treated with CTLA4-Ig affected the three subgroups of functional Tfh (Tfh1, 2 and 17) (Figure 6, F-H). Interestingly, 99% of Tfh expressed CD28 in its 3 subgroups (Fig 7, A).

In order to evaluate the activation status of blood Tfh, we quantified highly activated Tfh (ICOS⁺ and ICOS⁺PD1⁺) in CD4⁺ and Tfh cells. The proportion in CD4⁺ cells and absolute numbers of activated Tfh ICOS⁺ and ICOS⁺PD1⁺ were significantly reduced in KTR treated with CTLA4-Ig compared with CNI patients (figure 7 B and C-F). Moreover, in Tfh cells, the proportion of ICOS⁺PD1⁺Tfh was significantly lower (five times) in CTLA4-Ig than in CNI group (Figure 7, G-H). Altogether, our results highlight both quantitative and functional defects of circulating Tfh in KTR treated with CTLA4-Ig.

Discussion

Prevention of *dn*DSAs formation is a major step in the prevention of the subsequent humoral rejection, a leading cause of graft loss in kidney transplantation. Our study shows that the lowest level of *dn*DSAs observed in CTLA4-Ig-treated KT recipients might be related to a direct control of B cells responses by CTLA4-Ig.

First, our study shows that CTLA4-Ig directly modulates effector B cells responses and humoral function, without any modulation of T-cell intervention. When we used highly purified B cells that we stimulated *in-vitro* to reproduce Tfh help, we saw that CTLA4-Ig reduced plasmablasts proportion, and more significantly IgG2 and IgG4 secretion. Thus, we were able to demonstrate for the first time that CTLA4-Ig directly modulates both plasma cells differentiation and function. Additionally, our data show that CTLA4-Ig reduces the expression of the transcription factor, Blimp-1, majorly involved in plasma-cells generation and antibodies secretion ¹⁷. Tellier *et al* have already shown that the inactivation of Blimp-1 in mature plasma cells impaired their ability to secrete antibodies but not their survival ¹⁸. We did not observe any increase in B cell mortality *in-vitro* nor any modification in B cells and plasmablasts proliferation in the presence of CTLA4-Ig. We thus hypothesize that the reduction of Blimp-1 by CTLA4-Ig does not primarily affect plasma cells differentiation but rather “blocks” their Ig production.

The rational for the development and use of CTLA4-Ig molecule is mainly based on its ability to provide an optimal blockade of naïve T cell activation to prevent allograft rejection ¹⁹. By binding on B7 receptors (CD80/CD86) on APCs, CTLA4-Ig prevents APCs delivery of co-stimulatory signal to T cell by inhibiting CD28 (expressed on T-cells) interactions with its APCs ligands. Kowalczyk *et al.* were the first to suggest that CTLA4-

Ig may also have direct effect on APCs cells. Indeed, they showed that CTLA4-Ig could induce a reverse signaling by B7 molecules in human dendritic cells (DCs) that led to the generation of tolerogenic DCs ²⁰. In contrast, it was shown that triggering CD86 on human or murine splenic B cells, using an agonist antibody or CD28-Ig, could activate B cells leading to increase IgG production ²¹⁻²³. A direct effect of CTLA4-Ig on B cells has never been assessed so far. In our work, the decrease of CD86 expression, which was detected by immunoblot in cultured B cells treated with CTLA4-Ig, highly suggests that the binding of CTLA4-Ig to its B7 receptors could mediate a direct signal in B cells. Interestingly, our results also show that CD86 was mainly expressed on plasmablasts after activation and that expression was significantly repressed in the presence of CTLA4-Ig. Altogether, our results support that CTLA4-Ig triggering of CD86 expression on plasmablasts may inhibit their secretion of Ig by down-regulating Blimp-1 expression. However, we cannot exclude that other mechanisms may be implicated in the modulation of humoral responses observed in our *in-vitro* study. The cultured, stimulated B cells expressed low levels of CD28, and PDL1. CD28 expression on long-lived plasma cells was shown to be necessary for their function and maintenance in bone marrow ^{24,25}. Moreover PDL1 can bind to CD80 and we observed that PDL1 expression was up-regulated in the presence of CTLA4-Ig. Still, admitting that the blockade of CD28 or PDL1 signaling by CTLA4-Ig in B cells participates in the direct modulation of humoral responses *in-vitro* remains to be further investigated.

Beyond that, we assessed whether the down-regulation of CD80 and CD86, and the up-regulation of PDL1 on B cells could influence the Tfh-B cells crosstalk in the presence of CTLA4-Ig. So far, it has been thought that CTLA4-Ig alters germinal center responses due to Tfh priming blockade by DC ¹⁶. We showed that CTLA4-Ig decreased the expression of Tfh activation markers in an *in-vitro* co-culture of Tfh and memory B cells. This suggests that blocking costimulatory molecules such as CD80/86 on B cells reduces Tfh activation, given that all circulating Tfh highly express CD28. Our results are in accordance with the work of Ville et al who reported, in a model of Tfh-B cells co-culture isolated from pediatric tonsil, a reduced proportion of Tfh in the presence of CTLA4-Ig or of a selective antagonist of CD28, suggesting that both molecules control proliferative capacities of human Tfh ²⁶. Previous studies identified ICOS-ICOSL as the main driver for Tfh cells differentiation and maintenance ^{27,28}. Our results bring further evidence that CD28 expression on Tfh could also be a determinant pathway for Tfh activation.

Afterwards, we assessed whether the above described *in-vitro* CTLA4-Ig effects could also be observed in KTR treated with Belatacept. We showed that these patients displayed lower proportion of circulating effector B cells (*i.e.* memory B cells, switched memory B cells, and plasmablasts) associated with diminished proportion of circulating Tfh compared with control patients treated with CNI. Furthermore, the circulating Tfh of KTR treated with CTLA4-Ig displayed lower levels of markers of activation, as assessed by the proportion of ICOS+PD1+Tfh in Tfh populations. Interestingly, the employment of Tfh/B cells defect in the control of DSAs secretion was suggested in operational tolerant KTR, who also displayed the lowest levels of *dn*DSAs. These patients also had Tfh defect and impaired Tfh-B cells crosstalk *in-vitro*. Moreover, an increase in the proportion of circulating Tfh preceded the appearance of *dn*DSAs in a cohort of stable KTR²⁹. Eventually, these results suggest that therapeutic intervention on Tfh-B cells crosstalk may be a crucial step to control HLA sensitization.

In conclusion, our study strongly suggests that immunosuppressive therapy using CTLA4-Ig plays a direct and active role at several steps of the humoral response. CTLA4-Ig may uniquely control B cells responses by modulating both their antigen presenting capacities leading to the impairment of Tfh-B cells crosstalk, and the production of antibodies by effector B cells. These results allow, at least in part, to account for the lesser extend of HLA sensitization observed in KTR. They also raise new clinical perspectives in the development of immunosuppressive strategies aiming to target co-stimulatory molecules both in the field of transplantation and autoimmune disease.

Concise Methods

A detailed description including information on materials and reagents, flow cytometry, and western blotting is written in the Complete Methods [supplemental material](#) of this paper.

Isolation and culture of B cells

Peripheral Blood of Healthy Blood Donors (HBD) was obtained from *Etablissement Français du Sang* (Créteil, France). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation with Lymphocyte separation medium, (Laboratoires Eurobio, Les Ulis, France). Total B cells from freshly isolated PBMCs were purified by negative selection using the B cell isolation kit II for magnetic cell separation (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). CTLA4-Ig (Bristol Myers Squibb) was added to the cell cultures at the concentration of 40 µg/ml during 5 or 10 days ²⁰. The controls consisted in cultures without drug.

Please see our [Supplemental Material](#) for culture details.

Flow cytometry, CFSE labeling and immunoglobulin production in B cells assays

After 5 and 10 days of culture, cell-culture supernatants were collected and stored at -80°C. Cultured B cells were analyzed for expression of surface markers by multi-color flow cytometry. Cell aliquots were stained for 20 minutes with selected combinations of fluorochrome-conjugated antibodies at 4°C. Please see our [Supplemental Material](#) for details.

For the proliferation assay, $1-10 \times 10^6$ cells of the concerned cell populations were labeled with 1µM cell proliferation dye (CPD, ebioscience) before culture initiation. After 5 days of culture, cells were harvested and incubated with antibodies, and the dilution of the cell proliferation dye was assessed by flow cytometry.

Immunoglobulin concentrations were measured in the culture supernatants by Luminex following the manufacturer's protocol (Affymetrix E-bioscience, Human Isotyping procartaplex).

Western Blot Analysis of purified B cells.

At day 5, activated B cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS) containing a cocktail of protease and

phosphatase inhibitors (Roche). After concentration assessment, proteins were separated on SDS gels and transferred on nitrocellulose membranes (Amersham, GE Healthcare Life Sciences). The blots were incubated with different primary antibodies. Please see our [Supplemental Material](#) for details.

***In-vitro* Tfh-B cell co-culture assays**

B and Tfh cells were isolated from HBD whole blood using MACSprep HLA B/T Cell Isolation Kit (Miltenyi). Sorting conditions were detailed in Supplemental Material. Memory B cells (1×10^4) were co-cultured with blood Tfh at a 1:1 ratio with endotoxin-reduced staphylococcal enterotoxin B (SEB) (100 ng/ml; Sigma). CTLA4-Ig (Bristol Myers Squibb) was added to the cell cultures at different concentrations (10 and 40 µg/ml).

Please see our [Supplemental Material](#) for details.

Patients

Two groups of first KTR were included in the study:

- (1) KTR treated with Belatacept (CTLA4-Ig) (LEA29Y Bristol-Myers Squibb Company BMS), Mycophenolate Mofetil, and steroids (N=10). We picked out patients from Phase III clinical studies cohorts (BMS) from Henri Mondor and Bicêtre Hospitals. These patients had had stable renal function (MDRD >35ml/min, proteinuria < 0.5 g/g). Time between transplantation and sample analysis ranged from 8 and 14 years.
- (2) Patients with stable graft function treated with CNI, Mycophenolate Mofetil, and/or steroids (CNI) (N=12). Patients were selected from our database, were not immunized at the time of transplantation, and matched Belatacept patients for the date of transplantation.

In both groups, we excluded patients with history of humoral rejection or HLA sensitization (defined by DSAs with MFI > 1100) or with a recent event of acute T cell mediated rejection, infection, or tumor (< 6 months).

Detailed clinical data are presented in Table 1. All participating patients gave written informed consent.

A control group of HBD was included (N=12)

Immunophenotyping of blood B cells and Tfh.

B and Tfh subsets were characterized from freshly isolated PBMCs by flow cytometry (BD Canto II) with the following markers: CD19, CD24, CD38, CD80, CD3, CD4, CD45RA, CXCR5, CD274, CD278, CD27, IgD, IgM, CD86, CD197, CXCR5, CCR6, CXCR3, and CD279. Please see our [Supplemental Material](#) for further details.

Markers of activation and co-stimulation were analyzed according to the percentage of positive cells and the intensity of expression as evaluated by MFI with the FlowJo v.10 software (Treestar).

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Statistical analyses were adapted to data distribution (Kruskal-Wallis test, Mann Whitney test, and non parametric paired Wilcoxon Test). Continuous variables from patients and HBD groups were expressed as mean $\pm$ SEM, and compared using Kruskal-Wallis test. Paired biological observations from cells cultures were analyzed using Wilcoxon paired-nonparametric test (flow-cytometry and Western Blot data). Significance was defined as a p-value of less than 0.05.

Disclosure

None

Acknowledgements

We thank A. Guguin and A. Henry from IMRB cells sorting facility, M. Surenaud from IMRB luminex platform, and K. Bailly from Cochin Hospital cells sorting facility.

Reference

1. Loupy A, Hill GS, Jordan SC: The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat. Rev. Nephrol.* 8: 348–357, 2012
2. Terasaki PI: A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation* 93: 751–756, 2012
3. Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, Sellares J, Reeve J, Halloran PF: De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am. J. Transplant.* 9: 2532–2541, 2009
4. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, Goldberg A, Birk PE, Rush DN, Nickerson PW: Evolution and Clinical Pathologic Correlations of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Post Kidney Transplant: Clinical Pathologic Correlations of De Novo DSA. *Am. J. Transplant.* 12: 1157–1167, 2012
5. Everly MJ, Terasaki PI: The state of therapy for removal of alloantibody producing plasma cells in transplantation. *Semin. Immunol.* 24: 143–147, 2012
6. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blancho G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B: Costimulation Blockade with Belatacept in Renal Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 353: 770–781, 2005
7. Rostaing L, Vincenti F, Grinyó J, Rice KM, Bresnahan B, Steinberg S, Gang S, Gaithe LE, Moal M-C, Mondragón-Ramírez GA, Kothari J, Pupim L, Larsen CP: Long-Term Belatacept Exposure Maintains Efficacy and Safety at 5 Years: Results From the Long-Term Extension of the BENEFIT Study: BENEFIT Long-Term Extension. *Am. J. Transplant.* 13: 2875–2883, 2013
8. Vincenti F, Tedesco Silva H, Busque S, O’Connell P, Friedewald J, Cibrik D, Budde K, Yoshida A, Cohn S, Weimar W, Kim YS, Lawendy N, Lan S-P, Kudlacz E, Krishnaswami S, Chan G: Randomized phase 2b trial of tofacitinib (CP-690,550) in de novo kidney transplant patients: efficacy, renal function and safety at 1 year. *Am. J. Transplant.* 12: 2446–2456, 2012

9. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaité L, Moal M-C, Mondragon-Ramirez GA, Kothari J, Polinsky MS, Meier-Kriesche H-U, Munier S, Larsen CP: Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 374: 333–343, 2016
10. Heher E, Markmann JF: The Clearer BENEFITS of Belatacept. *N. Engl. J. Med.* 374: 388–389, 2016
11. Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, Dugast E, Ashton-Chess J, Pettré S, Lozano JJ, others: 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, 2010
12. 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, Gerstmayr 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 H-D, Souillou J-P, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI: Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120: 1848–1861, 2010
13. 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: B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients. *Am. J. Transplant.* 14: 1173–1182, 2014
14. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, Anderson D, Cowan S, Price K, Naemura J, Emswiler J, Greene J, Turk LA, Bajorath J, Townsend R, Hagerty D, Linsley PS, Peach RJ: Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant.* 5: 443–453, 2005
15. Pearson TC, Trambley J, Odom K, Anderson DC, Cowan S, Bray R, Lin A, Hollenbaugh D, Aruffo A, Siadak AW, Strobert E, Hennigar R, Larsen CP: Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 74: 933–940, 2002
16. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, Hong JJ, Farris AB, Iwakoshi NN, Villinger F, Kirk AD, Knechtle SJ: Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* 14: 59–69, 2014
17. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, Tarakhovsky A, Nutt SL, Jaritz M, Busslinger M: Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* 17: 331–343, 2016
18. Tellier J, Shi W, Minnich M, Liao Y, Crawford S, Smyth GK, Kallies A, Busslinger M, Nutt SL: Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* 17: 323–330, 2016

19. Ford ML: T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. *Immunity* 44: 1020–1033, 2016
20. Kowalczyk A, D'Souza CA, Zhang L: Cell-extrinsic CTLA4-mediated regulation of dendritic cell maturation depends on STAT3. *Eur. J. Immunol.* 44: 1143–1155, 2014
21. Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat J-F, Ellis J, Bonnefoy J-Y: CD86 (B7-2) on Human B Cells a functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4- producing cells. *J. Biol. Chem.* 272: 15613–15619, 1997
22. Kasprovicz DJ, Kohm AP, Berton MT, Chruscinski AJ, Sharpe A, Sanders VM: Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J. Immunol.* 165: 680–690, 2000
23. Rau FC, Dieter J, Luo Z, Priest SO, Baumgarth N: B7-1/2 (CD80/CD86) Direct Signaling to B Cells Enhances IgG Secretion. *J. Immunol.* 183: 7661–7671, 2009
24. Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, Nair J, Boise LH, Chanan-Khan AA, Schoenberger SP, Lee KP: Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* 208: 1435–1446, 2011
25. Rozanski CH, Utey A, Carlson LM, Farren MR, Murray M, Russell LM, Nair JR, Yang Z, Brady W, Garrett-Sinha LA, Schoenberger SP, Green JM, Boise LH, Lee KP: CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J. Immunol.* 194: 4717–4728, 2015
26. Ville S, Poirier N, Branchereau J, Charpy V, Pengam S, Nerriere-Daguin V, Le Bas-Bernardet S, Coulon F, Mary C, Chenouard A, Hervouet J, Minault D, Nedellec S, Renaudin K, Vanhove B, Blancho G: Anti-CD28 Antibody and Belatacept Exert Differential Effects on Mechanisms of Renal Allograft Rejection. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 2016
27. Crotty S: T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41: 529–542, 2014
28. Choi YS, Kageyama R, Eto D, Escobar TC, Johnston RJ, Monticelli L, Lao C, Crotty S: ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* 34: 932–946, 2011
29. Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, Le Bot S, Cadoux M, Dugast E, Paul C, Malard-Castagnet S, Ville S, Guérif P, Soullillou J-P, Degauque N, Danger R, Giral M, Brouard S: Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help. *Am. J. Transplant.* 2016

Figure Legends

Figure1: CTLA4-Ig alters differentiation of plasmablasts and function of stimulated B cells *in-vitro*. B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation for 10 days. **(A)** Analysis of plasmablast (CD19^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}) differentiation on day 5 using the indicated gating strategy. **(B-C)** Proportion of plasmablasts before and after stimulation (B, n=18), with or without CTLA4-Ig (C, n=25). **(D-F)** Quantification of IgG2 (D, n=14), IgG4 (E, n=8) and IgM (F, n=6) after 10 days of culture. **(G)** Expression of Blimp-1 in B cells lysate by Western blot at day 5. Tubulin was used as a loading control. One representative of eight immunoblots is shown. **(H)** Ratio of Blimp1 signal on tubulin signal (n=8). Data are given as mean $\pm$ SEM for each group, *p<0.05 vs. CTLA4-Ig+, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Figure 2: Co-stimulatory molecule expression on B cells subset.

B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation in the presence or absence of CTLA4-Ig for 5 days (n=10). **(A-B)** Proportion (A) and MFI (B) of CD80 in total B cells, memory B cells and plasmablasts. **(C-D)** Proportion (C) and MFI (D) of CD86 in B cells subsets described in A. **(E)** Expression of CD86 in B cells lysates at day 5 by western blot. Tubulin was used as a loading control. One representative of eight immunoblots is displayed. **(F)** Ratio of CD86 signal on Tubulin signal (n=8). **(G)** Proportion of CD28⁺ B cells after CTLA4-Ig treatment, analyzed by flow-cytometry (n=5). **(H)** Proportion of PDL1⁺ B cells after CTLA4-Ig treatment, analyzed by flow-cytometry (n=7). Data are given as mean $\pm$ SEM for each group, *p<0.05 vs. CTLA4-Ig+, Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

Figure 3: Tfh-memory B cells crosstalk is altered in the presence of CTLA4-Ig

Purified blood memory B cells (CD19⁺IgD⁻CD38^{dim}CD27^{+/-}) were co-cultured with Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺PD1⁺) at a 1:1 ratio (1-3x10⁴) in the presence of the superantigen SEB for 5 days, with or without CTLA4-Ig. **(A)** Dot plot of ICOS in CD4⁺ cells for a representative donor with or without CTLA4-Ig or stimulation by SEB. Notably, the expression of ICOS (left plot) and PD1 (data not shown) were negative

without SEB stimulation. **(B-C)** Proportions of ICOS⁺ (B) and ICOS⁺PD1⁺ (C) Tfh were analyzed by flow-cytometry. **(D)** MFI of ICOS positive Tfh cells. **(E)** Plasmablasts (CD19⁺CD38^{hi}) proportion. Data are given as mean $\pm$ SEM for each group.

Figure 4: Immunophenotyping of healthy blood donors (HBD) and kidney-transplanted recipient (KTR) effector-B cells subsets.

Blood B cells immunophenotyping of HBD (n=12) or KTR treated with CNI (n=12) or with CTLA4-Ig (n=10). **(A-B)** Proportion (A) and number (B) of memory (CD27⁺) B cells among CD19⁺ cells. **(C-D)** Proportion (C) and number (D) of switched memory (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) B cells in CD19⁺ cells. **(E-F)** Proportion (E) and number (F) of unswitched memory (CD19⁺CD27⁺IgD⁺) B cells in CD19⁺ cells. **(G)** Proportion of plasmablasts (CD19⁺CD24⁺CD38^{hi}) in CD19⁺ cells. Data are given as mean $\pm$ SEM for each group, *p<0.05 vs. CNI, #p<0.05 vs. HBD, Kruskal-Wallis test (A,C,E,G) or Mann Whitney test (B,D,F).

Figure 5: CD80 and CD86 expressions on KTR and HBD circulating B cells, according to B cells subsets

(A) Staining of B cells with CD80 and CD86 antibody (**Top plot**) and isotype control (**bottom**). **(B-C)**: Proportion of CD80⁺ (B) and CD86⁺ (C) B cells were evaluated according to B cells subsets of HBD (n=10). Data are given as mean $\pm$ SEM for each group, #p<0.05 memory vs. transitional B cells, *p<0.05 memory vs. mature B cells, &p<0.05 transitional vs. mature B cells, Kruskal-Wallis test. **(D-E)** CD80 proportion (D) and MFI (E) in B cells of HBD (n=10) or KTR treated with CNI (n=12) or with CTLA4-Ig (n=10) described in table 1. **(F-G)** CD80 proportion (F) and MFI (G) in memory B cells of patients described above. Data are given as mean $\pm$ SEM for each group, *p<0.05 vs. CNI, #p<0.05 vs. HBD, Kruskal-Wallis test.

Figure 6: Immunophenotyping of HBD and KTR Tfh cells.

(A) Representative dot plot showing gating strategy of memory (CD4+CD45RA-) T-cells, Tfh cells (CD4+CD45RA-CXCR5+) (Top panel) and Tfh subsets: Tfh17 (CCR6+CXCR3), Tfh2 (CCR6-CXCR3-) and Tfh1 (CCR6-CXCR3+) (Bottom panel). **(B-C)** Proportion (B) and number (C) of memory CD4 cells (CD45RA- cells) in CD4+ cells. **(D-E)** Proportion (D) and number (E) of Tfh (CD45RA-CXCR5+ cells) in CD4+ cells. **(F-H)** Proportion of Tfh1 (CCR6-CXCR3+ cells) (F), Tfh2 (CCR6-CXCR3-) (G) and Tfh17 (CCR6+CXCR3-) (H) in CD4+ cells. Data are given as mean $\pm$ SEM for each group (CTLA4-Ig n= 10, CNI n=8, HBD n=10), *p<0.05 vs. CNI, #p<0.05 vs. HBD, Kruskal-Wallis test (B,D,F,G,H) or Mann Whitney test (C and E).

Figure 7: Markers of activation of HBD and KTR Tfh cells.

PD1, ICOS, and CD28 expression were studied on gated Tfh (CD4+CD45RA-CXCR5+) by flow-cytometry. **(A-B)** Dots plots are shown for Fluorescence Minus One (FMO) and one representative of KTR treated with CNI and another with CTLA4-Ig. **(C-D)** Proportion (C) and number (D) of activated ICOS+ Tfh in CD4+cells. **(E-F)** Proportion (E) and number (F) of activated PD1+ICOS+ Tfh in CD4+ cells. **(G-H)** Proportion of ICOS+ Tfh (G) or PD1+ICOS+ Tfh (H) in Tfh. Data are given as mean $\pm$ SEM for each group (CTLA4-Ig n=6, CNI n=6, HBD n=6), *p<0.05 vs. CNI, #p<0.05 vs. HBD, Kruskal-Wallis test (D,F,G) or Mann Whitney test (C,E,H).

Table 1: Clinical and demographic characteristic of KTR

Demographic and transplant characteristics	KTR		p-value
	CNI	CTLA4-Ig	
Patients (n)	12	10	
Demography			
Recipient age at the time of follow-up (year)	64 $\pm$ 3	65 $\pm$ 4	0.9
Sex (M/F)	5/7	6/4	0.7
Donor age (year)	50 $\pm$ 5	54 $\pm$ 4	1
Living/cadaveric donor	1 / 11	0 / 10	
HLA A-B-DR incompatibilities	3 $\pm$ 0.4	3 $\pm$ 0.4	1
Time after transplantation, years	11.2 $\pm$ 1	10.6 $\pm$ 0.7	0.85
Primary renal disease, n (%)			0.2
Immunological (a)	2 (17)	5 (50)	
Non Immunological (b)	10 (83)	5 (50)	
Immunosuppressive treatment, n (%)			
CTLA4-Ig	0	10 (100)	<0.0001
CNI	12 (100)	0	<0.0001
Tacrolimus	9 (75)	0	
Cyclosporine A	3 (25)	0	
Steroid	10 (83)	9 (90)	1
MPA	12 (100)	10 (100)	1
Episode of biopsy proven acute rejection, n (%)	1 (8)	1 (10)	1
Biological data			
Glomerular filtration rate (ml/min/1.73m ²)	60 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	0.4
Proteinuria (g/24h)	0.1 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.06	0.06
DSA score 4 (MFI< 1100), n (%)	4 (33)	3 (30)	1
MFI, mean $\pm$ SEM	803 $\pm$ 80	935 $\pm$ 127	0.4

Data are presented as mean $\pm$ SEM or n (%), unless otherwise indicated

GFR was estimated according to MDRD formula

(a) immunological renal diseases include IgA nephropathy, Wegener granulomatosis

(b) Non immunological diseases include, uropathy, nephroangiosclerosis, autosomal dominant polycystic kidney disease, diabetic nephropathy and tubulo-interstitial disease

p value was calculated by two-tailed Mann Whitney test or Fischer's exact test

Table 2: Summary of immunological characteristics of KTR

	KTR		p
	CNI	CTLA4-Ig	
Number of lymphocytes (Number <i>per</i> mm ³)	1858 ± 178	1448 ± 282	0.15
CD4+ proportion (% in lymphocytes)	46.5 ± 2.6	42.6 ± 3.8	0.8
Number of CD4+ (Number <i>per</i> mm ³)	849 ± 107	624 ± 147	0.07
CD4+CD45RA- proportion (% in lymphocytes)	52 ± 7	40 ± 5	0.35
Number of CD4+CD45RA- (Number <i>per</i> mm ³)	425 ± 62	231 ± 49	0.01
CD19+ proportion (% in lymphocytes)	6.6 ± 1	5.2 ± 1.2	0.35
Number of CD19+ (Number <i>per</i> mm ³)	123 ± 19	100 ± 52	0.03

Data are presented as mean ± SEM.

Supplemental Material

Supplemental figures

Supplemental Figure 1: Characteristics of stimulated B cells in the presence or absence of CTLA4-Ig after activation.

B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation for 5 days in the presence or absence of CTLA4-Ig. **(A)** Mortality of B cells was not modified by CTLA4-Ig adjunction (n=20). **(B)** Similar proportion of memory B cells (CD19⁺CD27⁺CD38⁻) (n=25) in presence or absence of CTLA4-Ig. **(C)** Representative dot plot of cell proliferation dye (CPD) dilution in plasmablasts. **(D)** Equal proportion of proliferative plasmablasts (CD19^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}CPD^{lo}) (n=10) were observed in the presence or absence of CTLA4-Ig.

Supplemental Figure S2: Induction of CD80 and CD86 expression on stimulated B cells, according to effector B cells subsets.

B cells were cultured with or without CD40L and IL-21 stimulation for 5 days in the absence of CTLA4-Ig. **(A-B)** Increased proportion of CD80⁺ (A) (n=7) and CD86⁺ (B) (n=7) B cells in stimulated B cells. **(C-D)** Proportion (C) and MFI (D) of CD80 and CD86 B cells (n=7) varied according to effector B cells subsets (*i.e.* plasmablasts or memory B cells). **(E)** Representative dot plot showing gating strategy of CD86 and CD80 on unstimulated or stimulated B cells with or without CTLA4-Ig from a HBD. #p<0.05 vs. unstimulated, *p<0.05 memory B cells vs. plasmablasts, Wilcoxon matched-pairs signed rank test (A and B) or Mann Whitney (C and D).

Complete methods

Culture of B cells

Flow cytometry analysis of isolated B cells showed a mean ($\pm$ SEM) purity of 98.2% (± 0.45 , N=16). B cells were cultured in 96-well plates (1×10^5 per well/200 μ l medium) at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator, in a culture medium consisting of RPMI 1640+ Glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA), 5mM HEPES (Life

Technologies; Thermo Fisher Scientific), $\pm$ 50 μ M B-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). They were stimulated in the presence of 100ng/ml soluble recombinant Mega CD40L (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) and 50ng/ml IL-21 (Affymetrix eBioscience). The choice of CTLA4-Ig concentrations was based on the range previously reported in similar in vitro culture, albeit on T or DC cell responses²⁰.

Flow cytometry

For the analysis of B cell subpopulations and activation markers, the monoclonal antibodies used were CD19 (clone HIB19), CD24 (ML5), CD38 (HB-7), CD80 (L307-4), CD152 (BNI3), CD274 (MIH1), CD28 (L293), CD268 (11C1) from BD biosciences, CD27 (1A4CD27) from Beckman and Coulter, IgM (SA-DA4) from Ebiosciences, CD86 (FM95), CD275 (MIH12) from Miltenyi, CD279 (clone EH12) from Biolegend.

Cell viability was assessed with 7AAD (BD biosciences) or a viability dye (E-bioscience ref 65-0866) staining. It is worth mentioning that CD3+ contamination represented less than 0.3% of the total lymphocytes in the culture at day 5.

Western Blot Analysis of purified B cells.

Protein concentration of whole-cell extracts was evaluated using the Bradford assay. Lysates were mixed with reducing sample buffer (Laemmli) for electrophoresis and subsequently transferred on nitrocellulose membranes (Amersham, GE Healthcare Life Sciences). Equal loading (20 μ g) was verified using Ponceau red solution. After blocking with 5% non-fat milk TBS/T (0.05M Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20), membranes were probed with anti-CD86 (Abcam), anti-Blimp-1 (ebioscience), anti-XBP1s (cell-signaling) and anti-tubulin (Abcam) antibodies. After appropriate secondary antibody incubation (anti-rat HRP, anti-rabbit HRP, or anti-mouse HRP, 1:2000, Cell Signaling), immunodetection was performed using an ECL kit (Diagomics) and bands were revealed with Fusion-SL Imaging system (Vilber Lourmat) and Fusion software. Densitometry analysis with ImageJ software (NIH) was used for quantification.

***In vitro* Tfh-B cells co-culture assays**

For sorting, cells were stained with anti-CD4 (clone) (Biolegend), PD1 (clone), IgD, CD3, CD45RA, CXCR5, CD19, CD27, CD38 (BD Biosciences) and Aqua Live Dead (Life Technologies). Blood Tfh (CD3+CD4+CD45RA-CXCR5+PD1+) and memory B cells (CD3-CD19+IgD-CD38^{dim}CD27+/-) were sorted using a BD FACSAria III (BD Biosciences) with a purity > 95%.

Memory B cells ($1-3 \times 10^4$) were co-cultured with blood Tfh at a 1:1 ratio in complete RPMI (supplemented with 5% fetal bovine serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA), 5mM HEPES (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific), 1mM sodium pyruvate (Gibco; Thermo Fisher Scientific) and MEM NEAA 1X (Gibco; Thermo Fisher Scientific) with endotoxin-reduced staphylococcal enterotoxin B (SEB) (100 ng/ml; Sigma)).

After co-culture, cells were stained at day 5 with anti-CXCR5 (RF8B2), anti-CD210 (3F9), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD19 (HIB19), anti-IgD (IA6-2), anti-CD278 (DX29), anti-360 (17A12) (BD Biosciences), anti-CD4 (RPA-T4), anti-PD1 (EH12), anti-CD275 (MIH12), anti-CD274 (MIH1) (Biolegend), anti-CD38 (HIT2) (E-bioscience), and Aqua Live Dead (Life technologies).

Immunophenotyping of blood B cells and Tfh.

B cells and Tfh subsets were characterized from freshly isolated PBMCs by flow cytometry (BD Canto II) with the following anti-human antibodies: anti-CD19 (clone HIB19), anti-CD24 (ML5), anti-CD38 (HB-7), anti-CD80 (L307-4), anti-CD3 (UCHT1), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD45RA (T6D11), anti-CXCR5 (RF8B2), anti-CD274 (MIH1), and anti-CD278 (ISA3) from BD biosciences, anti-CD27 (1A4CD27) from Beckman and Coulter, anti-IgD (IA-62), anti-IgM (SA-DA4) from Ebiosciences, anti-CD86 (FM95), anti-CD197 (REA 108), anti-CXCR5 (REA103), anti-CCR6 (REA190), and anti-CXCR3 (REA 232) from Miltenyi, anti-CD279 (EH12), CD4 (RPA-T4) from Biolegend.

FIGURE

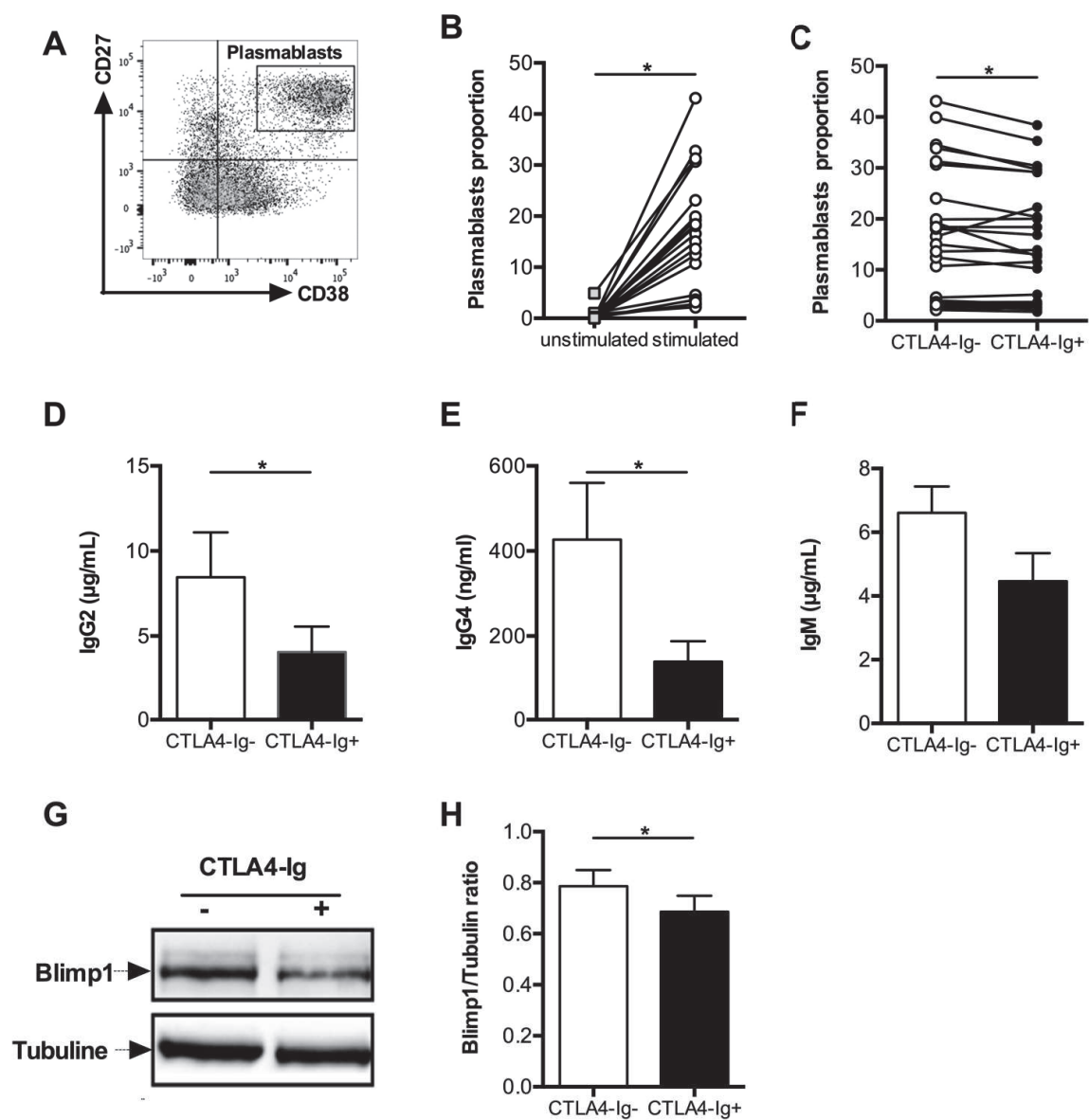


FIGURE 1

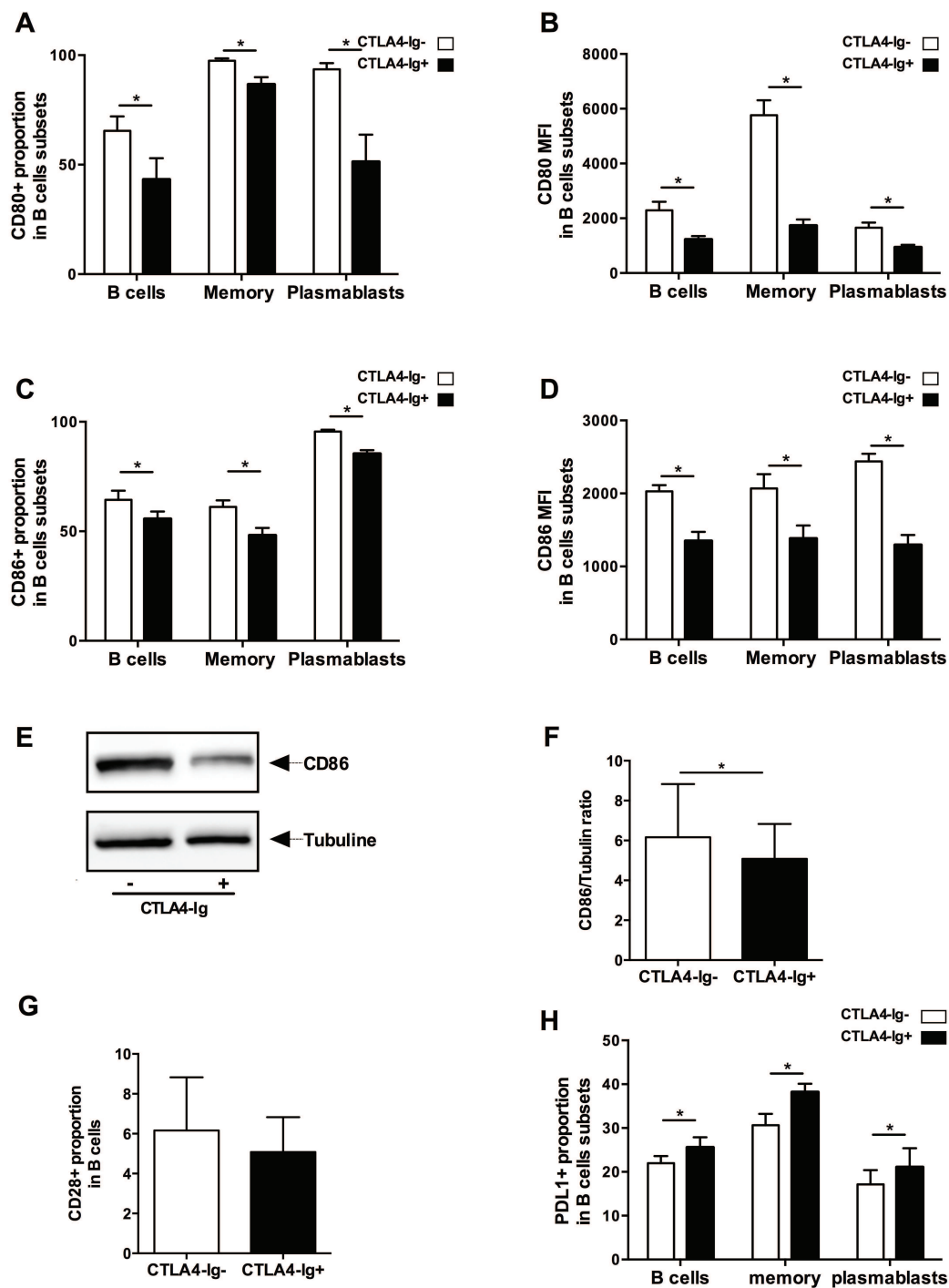


FIGURE 2

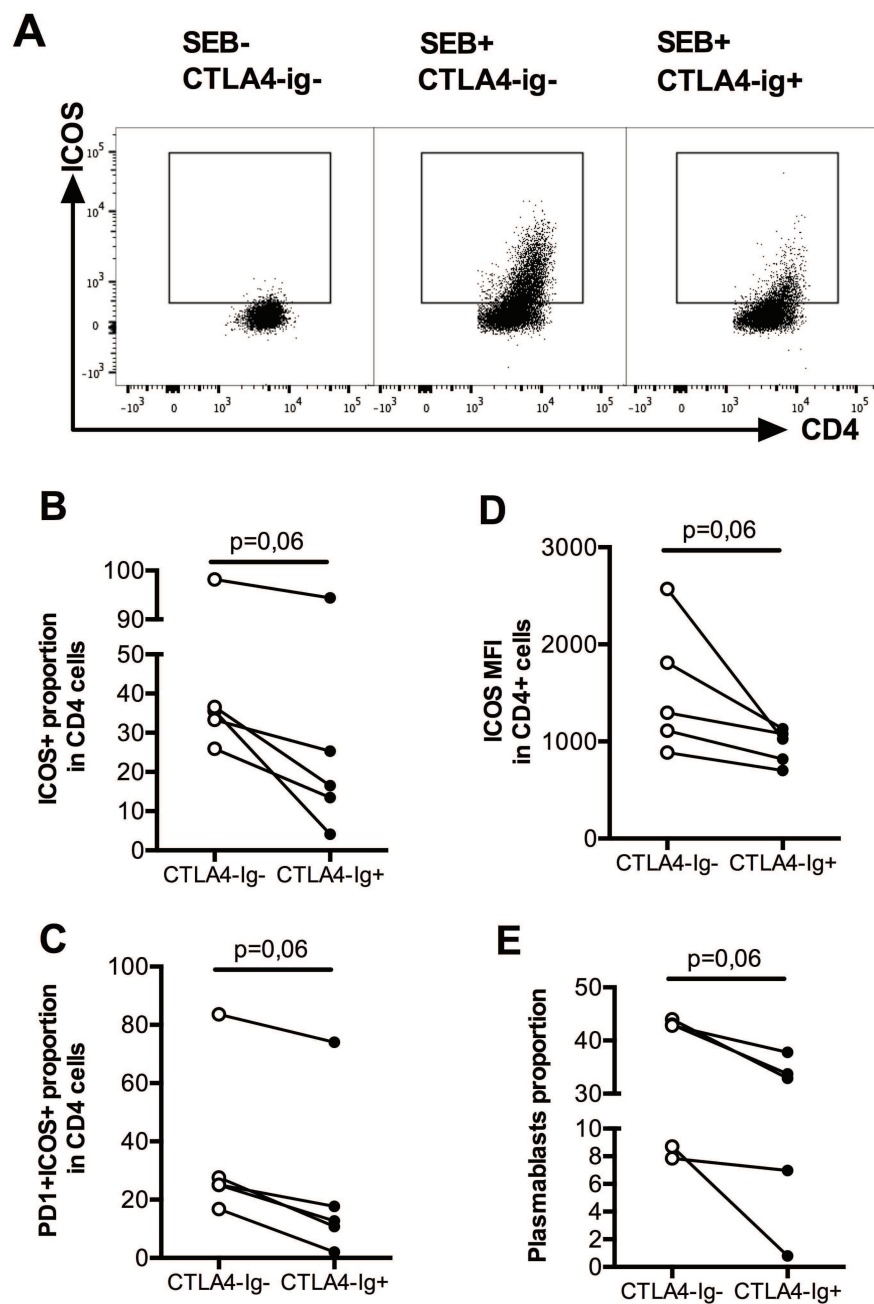


FIGURE 3

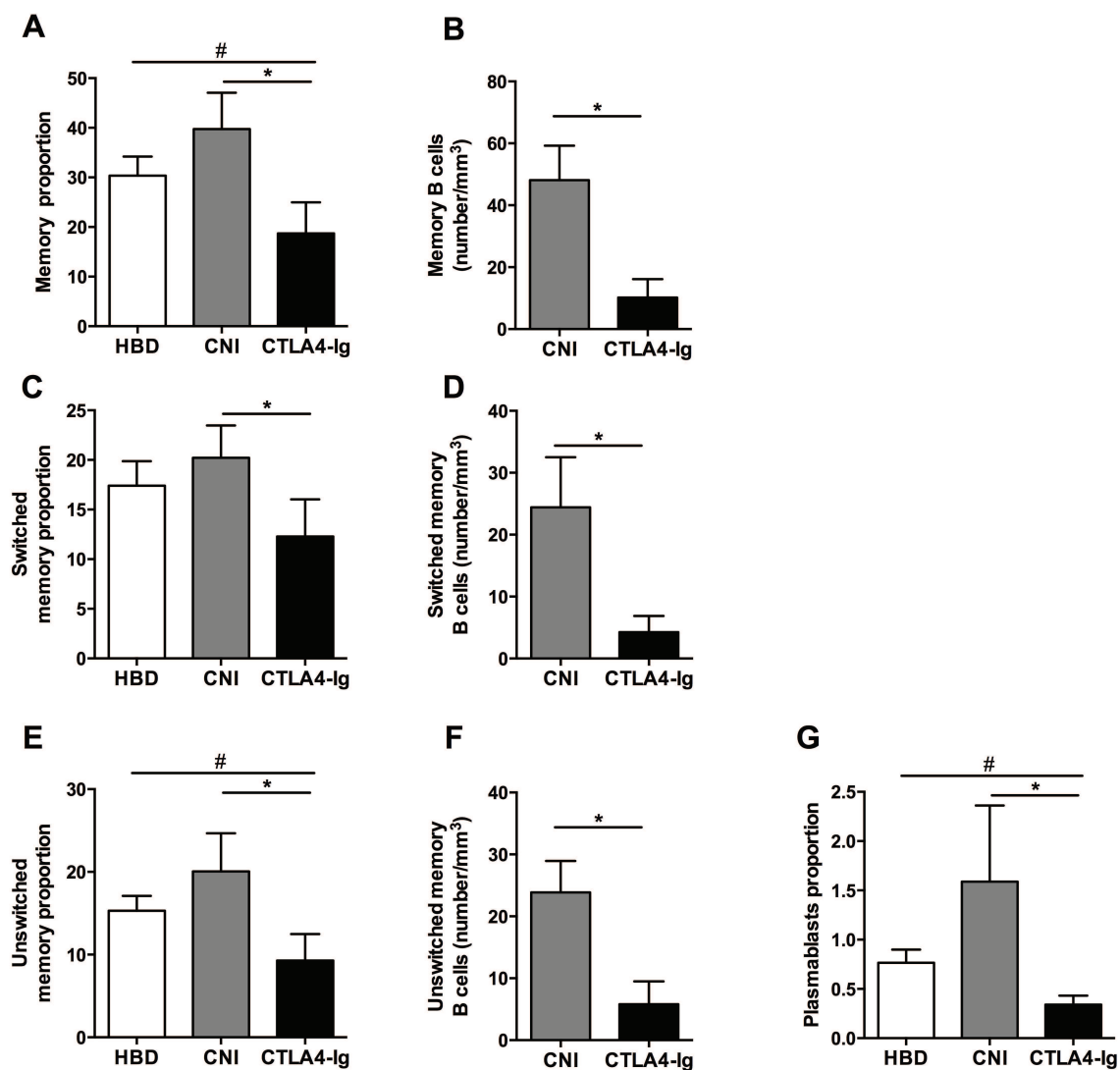


FIGURE 4

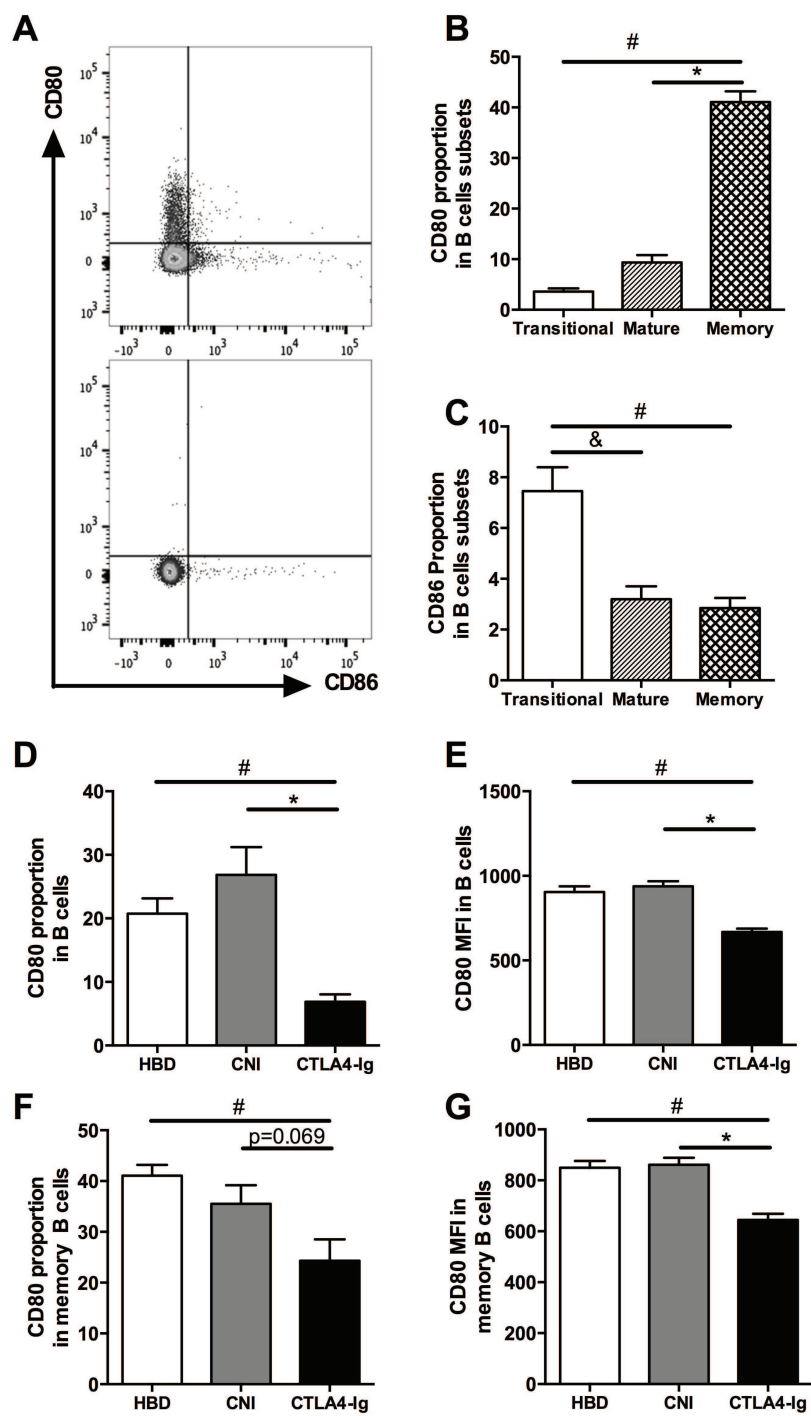


Figure 5

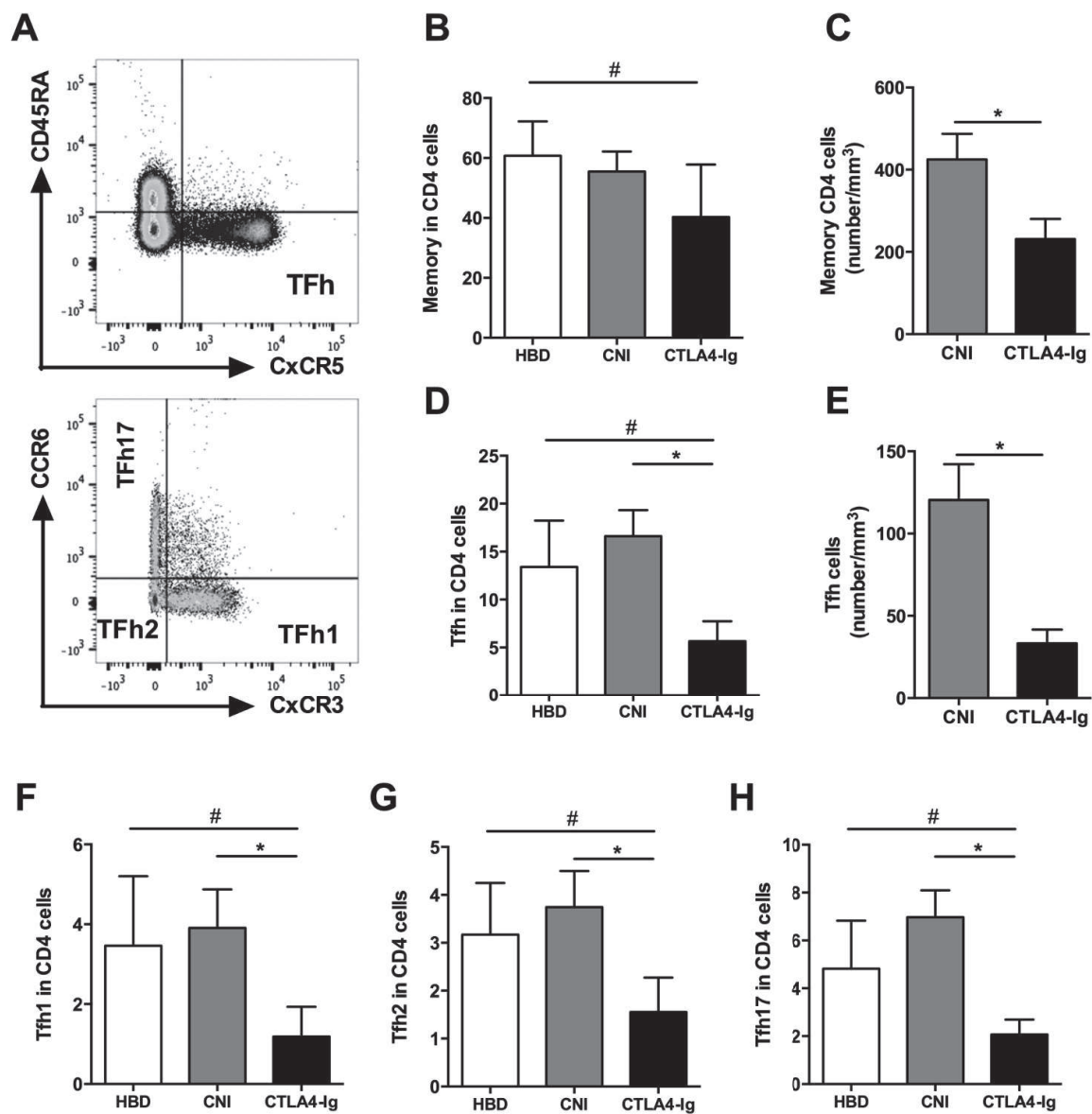


Figure 6

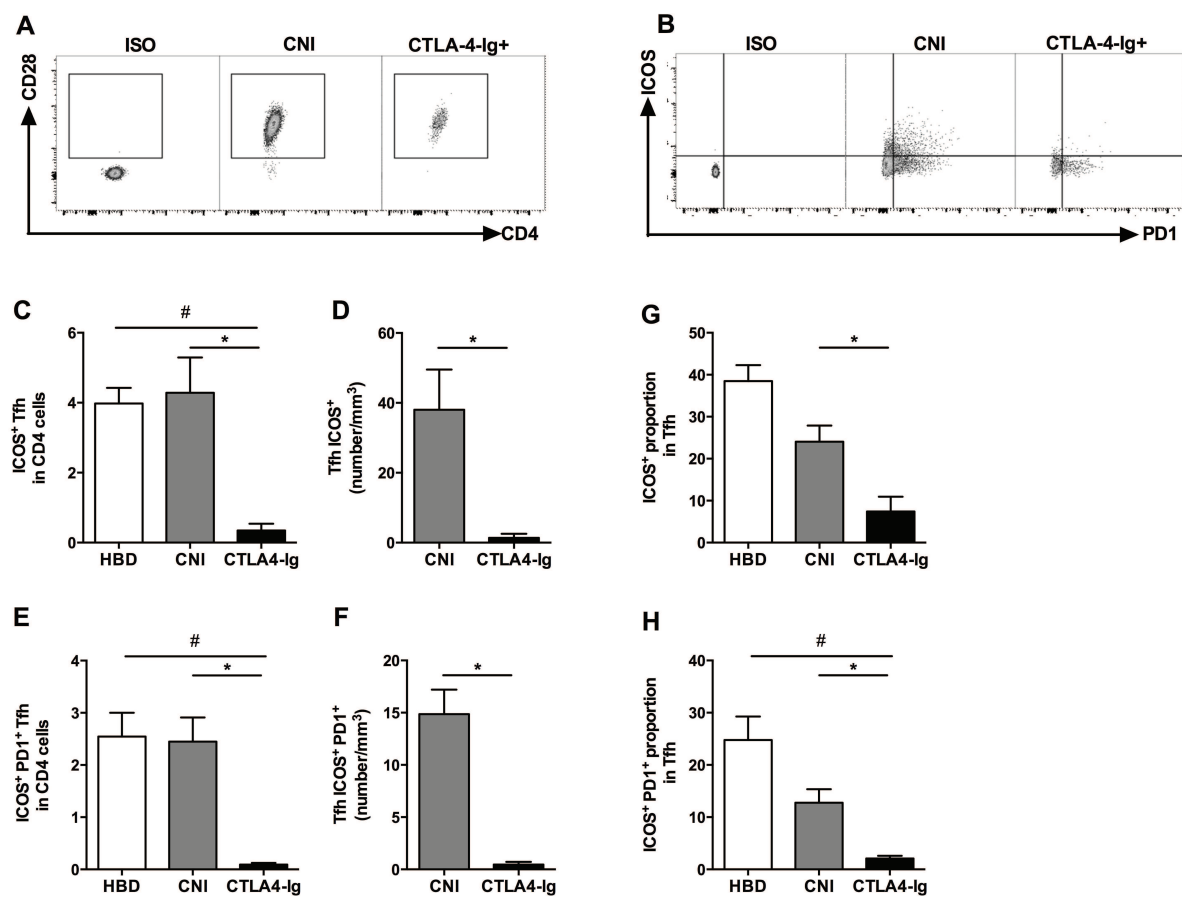


Figure 7

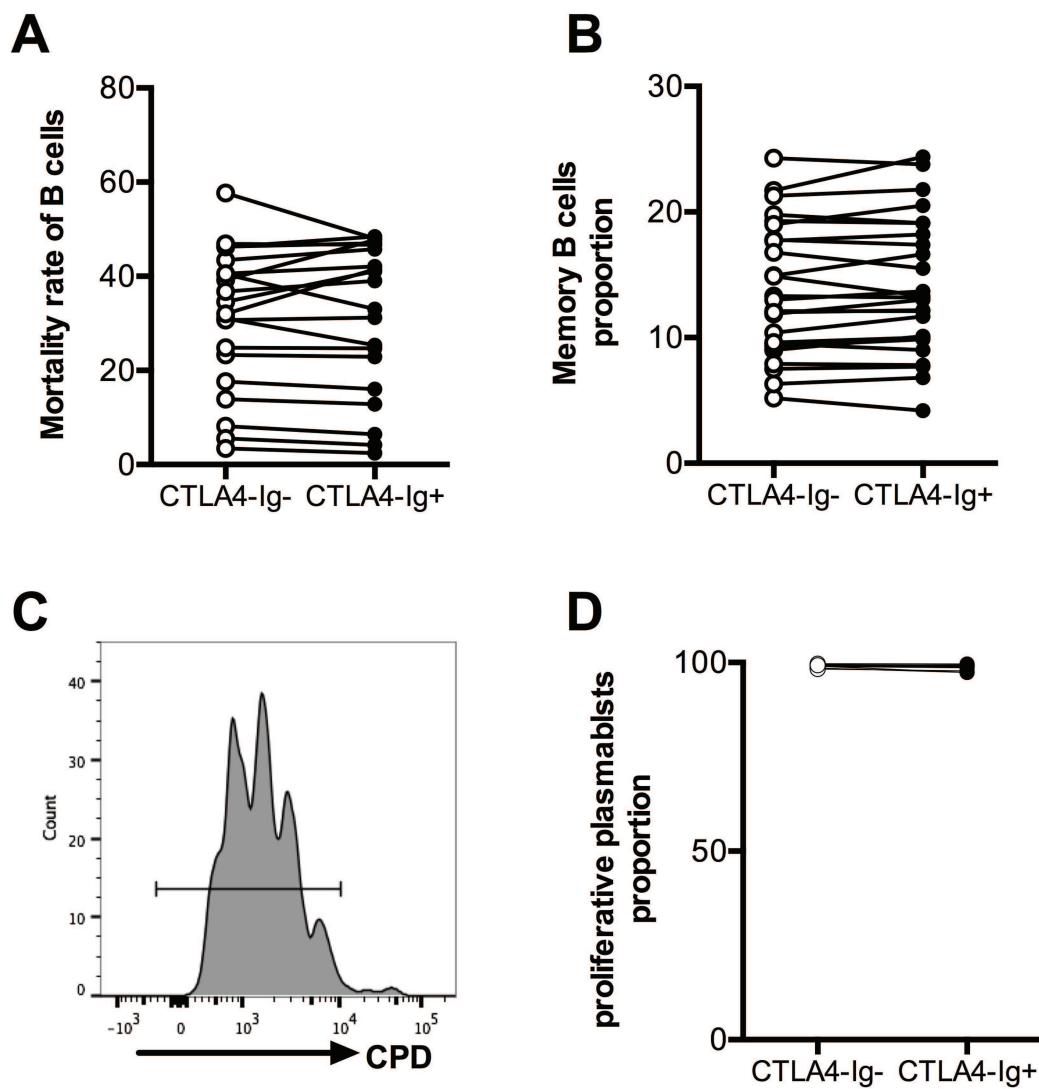


Figure S1

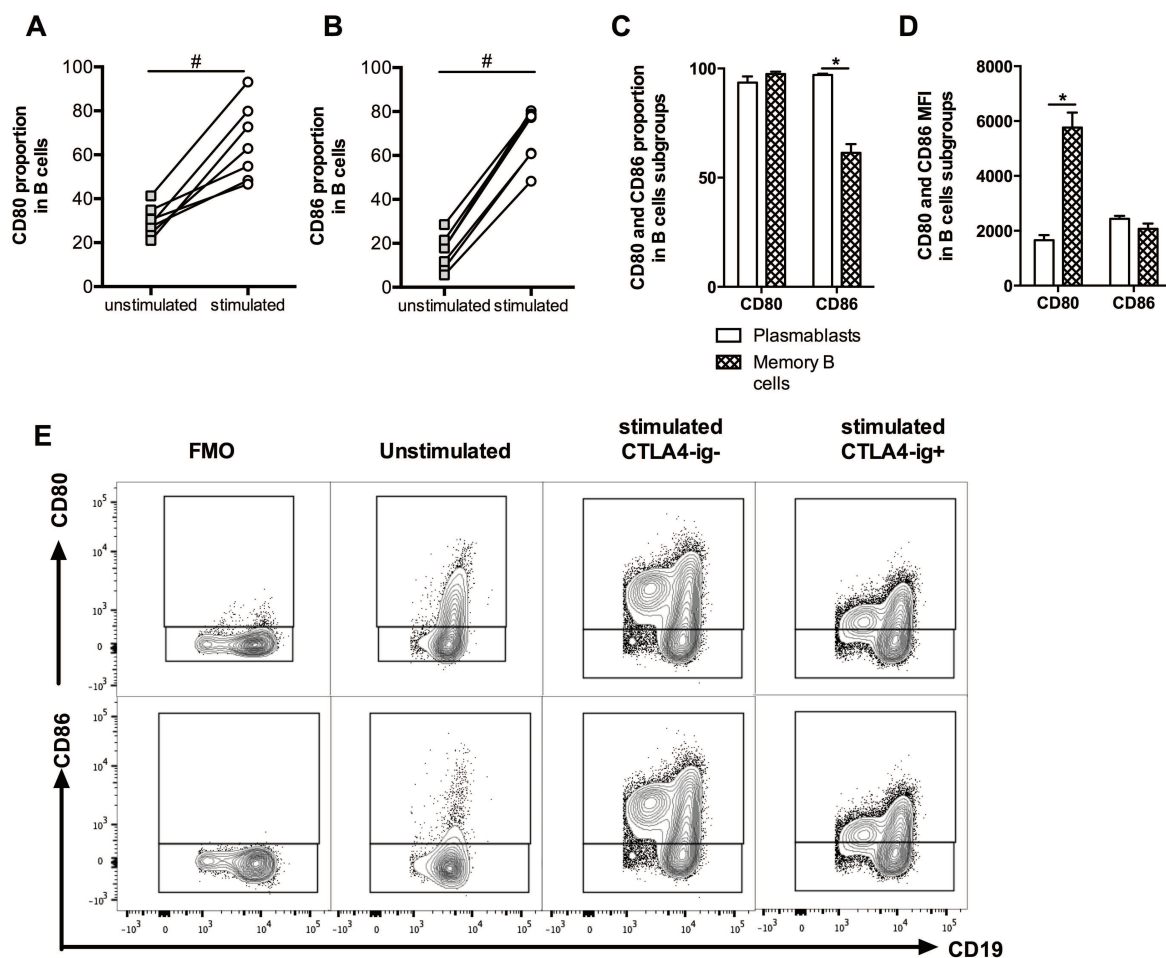


Figure S2

Discussion

Il est à présent bien établi que les DSA constituent les facteurs déterminants essentiels de la survenue des évènements humoraux aigus et chronique après transplantation rénale et du devenir à long terme des greffons.

Prévenir leur apparition est donc devenu un enjeu majeur, et longtemps sous évalué, des stratégies immunosuppressives initialement élaborées pour contrôler de manière optimal les réponses à médiation cellulaire.

Il est donc primordial de comprendre par quels mécanismes les différents traitements immunosuppresseurs contrôlent la réponse humorale.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux mécanismes d'action du CTLA4-Ig car les patients transplantés rénaux traités par Belatacept (CTLA4-Ig) développent moins de DSA comparativement aux patients traités par anti-calcineurines. Nous avons préalablement montré que le répertoire de leur LB circulants était différent. Ce résultat suggère des mécanismes inédits de contrôle de la réponse humorale par le CTLA4-Ig. A ce jour, ces mécanismes ne sont toujours pas élucidés (Ford, 2016; Heher and Markmann, 2016; Kwun et al., 2017).

Les résultats de ce travail de thèse suggèrent que le CTLA4-Ig contrôle efficacement la réponse B en agissant en parallèle sur deux fonctions primordiales des LB. Ainsi le CTLA4-Ig réduirait (i) la capacité des plasmablastes à sécréter des anticorps, via une action directe et (ii) les fonctions stimulantes-présentatrices d'antigène des LB vis à vis des TFH, dans les CG.

Nous suggérons de plus qu'agir sur l'une des molécules de co-stimulation aboutit à définir un nouvel état d'équilibre entre les différents partenaires de cette famille. Ainsi l'effet biologique du CTLA4-Ig pourrait être la résultante des modifications de ces différentes voies de signalisation.

Enfin nos résultats mis en parallèle avec ceux des patients transplantés tolérants opérationnels semblent suggérer que la collaboration TFH-LB est une étape clé à cibler pour un contrôle efficace de la réponse humorale.

I. Modulation directe du CTLA4-Ig de la réponse humorale B

Dans un premier temps, ce travail de thèse suggère un mécanisme inédit du CTLA4-Ig. En effet nous montrons (figure 1 et 2 de l'article soumis) que le CTLA4-Ig module directement la réponse humorale des LB activés *in vitro*, sans intervention des LT.

1. Mise au point du modèle d'activation *in vitro*

Le modèle d'activation *in vitro* que nous avons mis au point mime l'activation induite par les TFH dans les CG. Nous avons évalué les conséquences de différents protocoles de stimulation, associant CD40, IL21 avec ou sans IL4 et stimulation du BCR, sur la mortalité, la prolifération et la différenciation des LB en plasmablastes ainsi que sur la quantité et la nature des immunoglobulines (Ig) sécrétées. Aux termes de ces mises au point préliminaires, nous avons conclu qu'une stimulation par CD40 et IL21, représentant les 2 principaux signaux délivrés *in vivo* dans les CG par les TFH (Armitage et al., 1992; Crotty, 2011; Ettinger et al., 2005; Good et al., 2006; Kurosaki et al., 2015) étaient cohérents et compatibles *in vitro* puisqu'ils permettaient l'induction des LB en plasmablastes.

D'un point de vue méthodologique, il est important de signaler que nous avons trié les LB grâce à une sélection négative par billes magnétiques permettant (i) de nous affranchir d'une éventuelle influence de la manipulation du co-récepteur CD19 ou du CD20, et (ii) d'obtenir une excellente pureté à J0 des LB (98% en moyenne) avec une contamination minime par des CD3+ (< 0,3%). Cette excellente pureté permet d'attribuer les effets constatés *in vitro* à une action indépendante des LT.

2. Action directe : nature et cible

La présence de CTLA4-Ig modifie la réponse humorale *in vitro* des LB purifiés activés.

Le CTLA4-Ig diminue modestement (de l'ordre de 10%) mais significativement la différenciation des LB activés en plasmablastes.

Nous avons ensuite voulu déterminer les conséquences fonctionnelles du CTLA4-Ig en évaluant la sécrétion d'Ig. Nous avons néanmoins été limité dans l'analyse des différentes sous classes car les kits commerciaux permettant de quantifier les IgG (totales ou les sous-classes d'IgG) reconnaissent leur fragment constant. Le CTLA4-Ig, qui est composé du fragment constant (Fc γ 1) d'une IgG1 humaine, est alors dosé dans les surnageants de culture de LB traités et rend impossible la quantification d'IgG1 réellement produites. De plus, bien que l'IgG1 humaine contenue dans le CTLA4-Ig n'entraîne pas de faux positif (c'est à dire qu'elle n'est pas reconnue par les billes censées détecter les autres sous-classes), nous avons cependant constaté qu'elle interférait avec la détection des IgG3, probablement en formant des complexes immuns. Cette interférence est dépendante de la concentration. Il a été rapporté que les IgG1 et les IgG3 pouvaient former des complexes immuns (Manzo et al., 1983). De nombreuses biothérapies sont des chimères et comportent le fragment constant d'immunoglobuline. Les différents fragments Fc des quatre sous-classes d'immunoglobulines ont des propriétés particulières en terme de capacité à activer la voie classique du complément, à induire des complexes immuns ou des mécanismes d'ADCC (Vidarsson et al., 2014). De plus les fragments Fc de ces biothérapies font l'objet de mutagenèse dirigée pour modifier leurs propriétés intrinsèques. A notre connaissance, aucune biothérapie comportant des IgG1 n'a été décrite comme étant capable de former des complexes immuns avec les IgG3. La relevance de ce mécanisme in vivo nécessitera d'être évalué, notamment en quantifiant le ratio entre la quantité de molécules de CTLA4-Ig délivrée in vivo par rapport à celle des IgG3 naturellement sécrétées.

Nous montrons cependant que le CTLA4-Ig inhibe significativement la sécrétion d'immunoglobulines IgG2 et IgG4 d'un facteur 2,5 et 4,5 respectivement. De façon importante, la sécrétion d'IgM tend également à diminuer dans nos cultures. Cette observation suggère que le mécanisme à l'origine de la l'inhibition de sécrétion des IgG n'est pas un blocage de la commutation de classe (du switch isotypique) qui aurait alors induit une augmentation de la sécrétion des IgM.

Enfin nous montrons, par western blot, que l'expression du principal facteur de transcription Blimp-1, impliqué dans la différenciation plasmocytaire et la sécrétion d'Ig, est diminuée en présence de CTLA4-Ig.

Tellier et al. ont récemment montré dans un modèle murin de délétion conditionnelle que la perte d'expression de Blimp-1 dans les plasmocytes matures était responsable d'une diminution de la sécrétion d'Ig mais sans conséquence pour leur survie (Tellier et al., 2016).

Nous constatons que la mortalité globale et la prolifération des LB de nos cultures ne sont pas modifiées d'une part, et d'autre part que la diminution de proportion des plasmablastes est modeste comparativement au degré d'inhibition de la production d'Ig. Nous émettons alors l'hypothèse que l'inhibition de sécrétion d'IgG serait induite par la diminution d'expression de Blimp-1 dans les plasmablastes différenciés, d'avantage qu'au blocage de la maturation des plasmablastes en culture.

Cependant avant de conclure de manière plus probante sur ce dernier point, il apparaît important d'évaluer l'action du CTLA4-Ig sur la différenciation spécifique (i) des LB naïfs ou (ii) des LB mémoires en plasmablastes, en partant de ces 2 sous populations triées. Il est en effet possible que le CTLA4-Ig ait alors une action (et une importance) différentielle sur ces deux processus de différenciation. Enfin pour confirmer notre hypothèse d'une action directe du CTLA4-Ig sur les capacités de sécrétion d'Ig de plasmablastes « matures », il conviendrait également de dissocier les étapes d'induction des plasmablastes et de traitement (en triant par cytométrie de flux les plasmablastes différenciés avant de les traiter). Toutefois, d'un point de vue « technique », le tri des plasmablastes après différenciation in vitro et leur maintien en culture constituent deux étapes « sensibles » à mettre en œuvre.

3. Mécanismes à l'origine de l'inhibition de la réponse humorale par le CTLA4-Ig

Le CTLA4-Ig a été développé pour empêcher le priming des LT naïfs en inhibant le 2^{ème} signal de co-stimulation induit par CD28 (exprimé à la surface des LT) et nécessaire à leur activation. Le CTLA4-Ig, en venant se fixer avec une plus grande affinité sur les ligands du CD28, récepteurs CD80 et CD86 exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) notamment des DC, bloque donc toute possibilité d'interaction du CD28 avec ses ligands CD80-CD86 (Larsen et al., 2005).

Cependant le récepteur CD86 est une glycoprotéine membranaire de la superfamille des Ig et comporte un domaine intracellulaire, ce qui rend théoriquement possible l'induction d'une signalisation directement dans l'APC elle-même (Hathcock and Hodes, 1996; Marín et al., 2005).

La possibilité que le CTLA4-Ig puisse, en se liant aux molécules CD80 et CD86, modifier directement les réponses des APC en elle-même, cellules considérées comme uniquement « stimulantes » pour les LT, a été démontrée pour les DC. Dans un modèle *in vitro*, Kowalczyk *et al.* suggèrent que le CTLA4-Fc induit des DC humaines aux propriétés tolérogènes par l'intermédiaire d'une signalisation intracellulaire STAT3. De plus Grohmann et al. montrent, *in vitro* et *in vivo* grâce à un modèle murin de greffe d'îlots pancréatiques, que l'interaction entre le CTLA4-Ig et ses ligands à la surface des DC régule le catabolisme du tryptophane par un mécanisme dépendant de la sécrétion de cytokines (IFN gamma) (Grohmann et al., 2002). A l'inverse, certaines études *in vitro* ont suggéré que la stimulation du CD86 à la surface des LB par un anticorps agoniste ou le CD28-Ig induirait un fort signal activateur au sein des LB favorisant la sécrétion d'Ig. Ainsi Jeannin *et al* montrent que la stimulation de CD86 par un anticorps agoniste induit *in vitro* la prolifération de LB humains issus de pièces d'amygdalectomie ainsi que leur sécrétion d'IgE et IgG4 (Jeannin et al., 1997). De façon concordante, la stimulation du CD86 des LB murins spléniques activés *in vitro* augmente la sécrétion d'IgG1 (Kasprowicz et al., 2000), par l'intermédiaire d'une signalisation impliquant le facteur de transcription oct-2, une régulation des voies PI3K/PLCγ et NFκB (Podojil et al., 2004), et serait dépendante du CD19 (Kin and Sanders, 2007). De plus ces effets sont maximaux lorsque la stimulation du CD86 est réalisée 16h après le début de l'activation, suggérant qu'elle impliquerait majoritairement les LB préalablement activés (Kasprowicz et al., 2000; Kin and Sanders, 2007). Enfin Rau *et al* suggèrent également qu'un anticorps agoniste de CD86 favorise la sécrétion d'IgG2a de LB spléniques et particulièrement des LB mémoires switchés (IgD-) activés *in vitro* par CD40L, IL5 et IFNγ, sans modifier leur prolifération (Rau et al., 2009). Cependant, ces études n'ont jamais (i) caractérisé le phénotype des LB en culture et notamment leur différenciation en plasmablastes, (ii) évalué l'impact d'une telle signalisation directe de CD86 lorsque les LB sont activés par l'IL21, cytokine majeure pour l'induction de LB effecteurs et la sécrétion d'Ig (Ettinger et al., 2005, 2008; Good et al., 2006) et (iii) évalué l'impact spécifique de la molécule CTLA4 sur la modulation de la signalisation des récepteurs B7.

En nous appuyant sur nos résultats expérimentaux, nous suggérons pour la 1^{ère} fois chez l'homme que le CTLA4-Ig peut induire un signal inhibiteur dans les LB par l'intermédiaire de CD86. En effet, l'observation d'une diminution d'expression protéique du CD86 en Western Blot suggère fortement l'induction d'une signalisation du CTLA4-Ig *via* ce récepteur. De plus, nous montrons également que le CD86, décrit dans la littérature comme capable de stimuler la sécrétion d'Ig, est justement surexprimé par les plasmablastes, cellules spécialisées dans la sécrétion d'Ig, comparativement aux LB mémoires.

Ainsi, nous posons l'hypothèse que le récepteur CD86 régule directement l'activation et le niveau de sécrétion d'Ig des LB effecteurs, et tout particulièrement des plasmablastes qui le sur-expriment. Une stimulation positive de CD86 par le CD28 favoriserait une sécrétion intense d'Ig. Mais nous suggérons également qu'une stimulation négative par le CTLA4 l'inhibe par l'intermédiaire d'une diminution de l'expression de Blimp-1 dans les plasmablastes. La diminution d'expression de CD86 à la surface des LB activés induite par le CTLA4 (-Ig), permettrait de pérenniser l'inhibition des LB en diminuant leur possibilités d'interaction avec le CD28 qui *in vivo* est plus affin pour le CD86 que CTLA4. (Nous rappelons que l'affinité du CTLA4-Ig pour le CD86 a été artificiellement augmentée grâce à la création de 2 mutations ponctuelles dans le domaine CTLA4 (Larsen et al., 2005)).

Cependant, la seule induction par le CTLA4-Ig d'une signalisation directe via le CD86 (Figure 13. Encadré 3) n'est pas le seul mécanisme invocable pouvant conduire à l'inhibition de sécrétion d'Ig. (Figure 13).

Ces mécanismes pourraient faire intervenir :

- (i) un blocage de la signalisation de CD28 (Figure 13, partie 1 gauche)

L'expression de CD28 est réprimée dans les LB matures sous l'action du facteur de transcription Pax-5 (Delogu et al., 2006). Cependant CD28 joue un rôle sur la persistance des réponses anticorps *in vivo* car la survie des plasmocytes de longues durée de vie dans les niches de la moelle osseuse est dépendante de la ré-expression de CD28 (Delogu et al., 2006; Rozanski et al., 2011, 2015). Ainsi *in vivo* CD28 a un rôle intrinsèque

de contrôle de la réponse anticorps par les plasmocytes. Nous avons donc voulu évaluer si les LB stimulés *in vitro* étaient capables de ré-exprimer CD28. Nos résultats montrent que le niveau d'expression de CD28 est faible à la fois en terme de fréquence et de MFI, quelque soit la sous population de LB activés (totaux, mémoires ou plasmablastes). Cette expression ne semble pas modifiée par l'adjonction de CTLA4-Ig. Ainsi, l'hypothèse d'une modulation de la réponse humorale par CD28 ne nous semble pas la plus probable mais nous ne pouvons l'exclure avec certitude. Afin de déterminer son implication *in vitro*, il faudrait tester l'effet d'un anticorps bloquant le CD28 (Ville et al., 2016) sur la différenciation des LB et leur sécrétion d'Ig *in vitro*.

(ii) un blocage de la signalisation de PDL1 (Figure 13, partie 1 droite)

PDL-1 est un des ligands de CD80. Suivant le même raisonnement, il est en théorie possible qu'une partie des effets humoraux puissent être induits par le blocage de la signalisation normalement induite par la liaison de PDL1 avec CD80. Nous montrons en effet que l'expression de PDL1 est augmentée à la surface des LB activés. Cette hypothèse nécessiterait d'être testée avec un anticorps bloquant PDL1. Il a été montré récemment que PDL1 pouvait être exprimé par les plasmocytes de patients présentant un myélome (Sponaas et al., 2015) Cependant l'impact de PDL1 sur la réponse anticorps n'a jusqu'à présent pas été évalué à notre connaissance.

(iii) une modulation via les Fcγ récepteurs (FcγR) (Figure 13, partie 4)

L'effet d'une modulation de la réponse B « non spécifique » par le fragment Fc du CTLA4-Ig *via* le FcγR pourrait également en théorie intervenir. Nous n'avons pas utilisé d'isotype contrôle dans nos cultures car pour être valide nous aurions dû obtenir le fragment Fcγ1 avec les mêmes mutations que la molécule commerciale (qui modifient notamment ses propriétés de liaison au FcγR). Cependant l'hypothèse aspécifique du FcγR n'expliquerait pas la diminution spécifique de l'expression de CD86.

La figure 13 résume les mécanismes théoriques pouvant être à l'origine de l'action directe du CTLA4-Ig sur la modulation de la réponse humorale des LB activés in vitro.

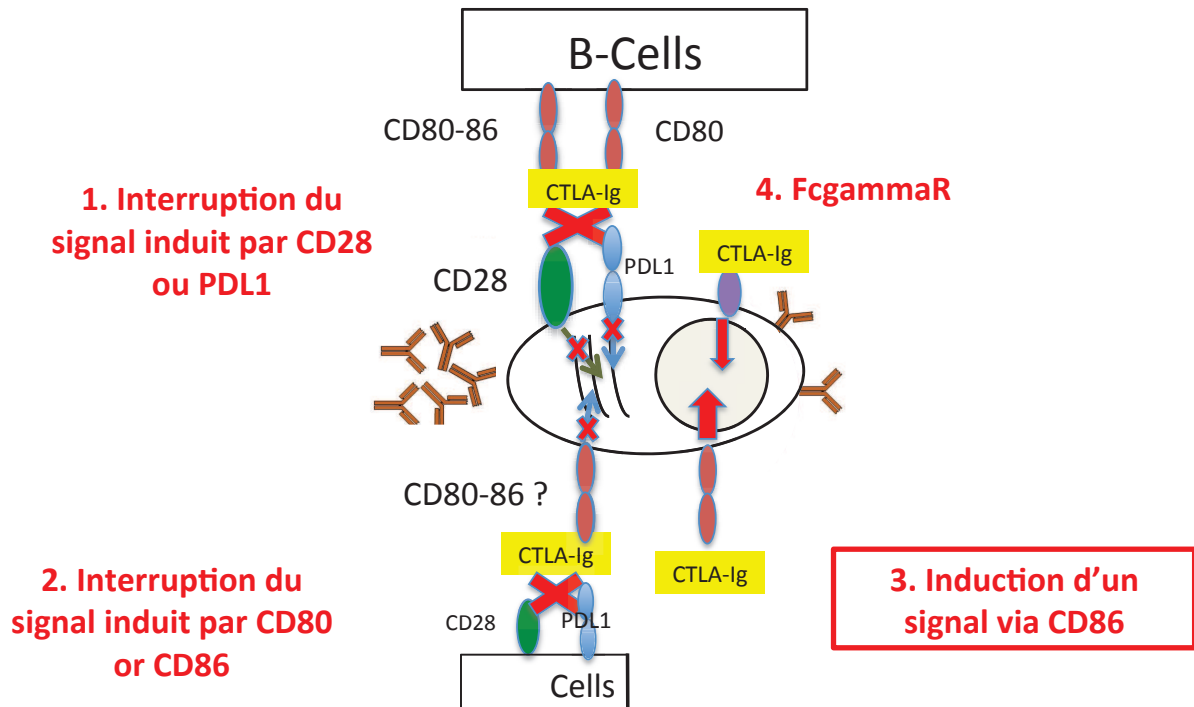


Figure 13: Mécanismes d'action potentiels du CTLA4-Ig.

4. Remodelage de l'expression des molécules de costimulation

Nous mettons en évidence un remodelage des molécules de co-stimulation à la surface des LB stimulés in vitro (Figure 14). En effet l'expression de CD80 et CD86 est bloquée du fait de leur liaison avec le CTLA4-Ig mais nous avons également montré que l'expression protéique de CD86 est diminuée, ce qui inhibe de façon pérenne toute possibilité de liaison avec le CD28. De plus l'expression de PDL1 est augmentée à la surface des LB. Du fait de l'encombrement du CD80 par le CTLA4-Ig, PDL1 ne peut alors pas se lier avec le CD80 et devient de fait d'autant plus disponible pour interagir avec PD1.

Il serait notamment important de démontrer l'origine de l'augmentation de l'expression de PDL1. Celle-ci peut en effet être double: (i) le blocage de la signalisation de PDL1 avec son récepteur CD80 et/ou (ii) une interaction entre les voies CD86 et PDL1.

Dans les LT, il a été montré très récemment une collaboration étroite entre les voies PD1 et CD28. Kamphorst et al montre que la signalisation induite par CD28 était indispensable pour obtenir une (ré)activation efficace des réponses CD8 après traitement par anti-PD1 dans des modèles murins de tumeur et d'infection virale (Kamphorst et al., 2017). De plus, Hui et al ont montré à un niveau biochimique que la stimulation de PD1 par son ligand PDL1 induit l'inhibition des fonctions des LT en inhibant la signalisation de CD28 (Hui et al., 2017).

La mise en évidence formelle d'une interaction entre ces 2 voies (CD28/CD80-CD86 et PDL1-CD80/PD1) nécessite néanmoins d'être démontrée.

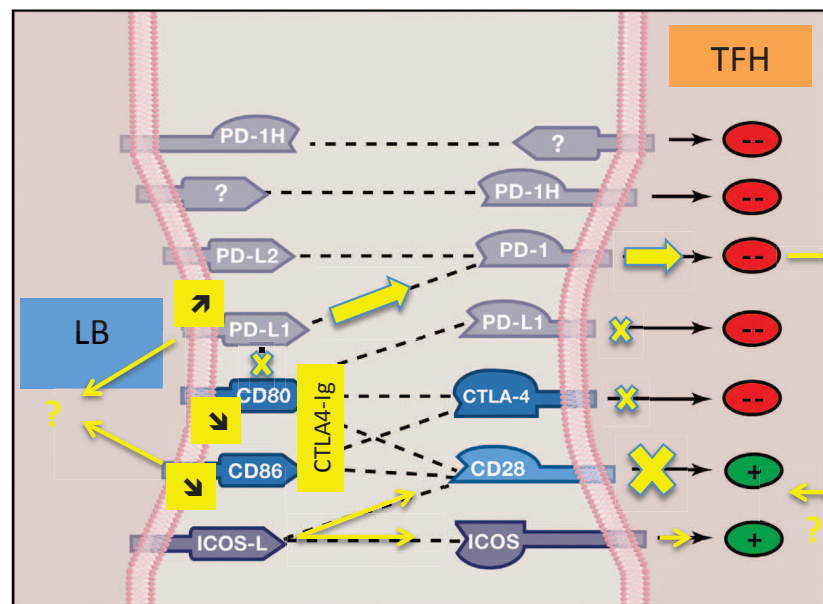


Figure 14: Remodelage des molécules de co-stimulation à la surface des LB et conséquences « théoriques » / « potentielles » pour le dialogue avec les TFH. (adaptée de Ford Immunity 2016)

L'expression des molécules de co-stimulation étant remodelée à la surface des LB en présence de CTLA4-Ig, nous avons voulu déterminer dans un 2^{ème} temps si ce traitement modulait le dialogue des LB avec les TFH.

II. Modulation par le CTLA4-Ig des capacités stimulatrices des LB dans la synapse TFH-LB

1. Rôle de la signalisation CD28/CD80-CD86 pour l'activation des TFH

Nous avons voulu déterminer si le CTLA4-Ig, et donc l'inhibition de la voie CD28/CD80-CD86, permettaient d'inhiber une co-stimulation/activation efficace des TFH par les LB dans la synapse TFH-LB. Nous avons donc développé un modèle *in vitro* de co-culture autologue entre TFH et LB mémoires, isolés à partir du sang circulant de donneur sains, et stimulée avec un poly-antigène (l'enterotoxine du staphylocoque B) qui favorise le « dialogue /cross-linking » entre les LT et les LB. Ce protocole a été utilisé dans différents contextes pathologiques pour mimer la collaboration TFH-LB des CG *in vitro* (He et al., 2013; Locci et al., 2013; Morita et al., 2011), du fait d'un accès limité aux organes lymphoïdes secondaires humains.

De façon importante, nous observons que 100% des TFH circulants des donneurs sains expriment CD28 et sont donc théoriquement sensibles au blocage de ce signal. *In vitro*, nous observons, en présence de CTLA4-Ig, une nette diminution de la fréquence et de la MFI des marqueurs d'activation PD1 et ICOS exprimés à la surface des TFH lorsque la collaboration entre TFH et LB est efficace. Nous montrons donc que le CTLA4-Ig inhibe l'activation des TFH induite par les LB.

Afin de déterminer si cet effet objectivé *in vitro* pouvait également être observé *in vivo*, nous avons comparé les fréquences des TFH circulants, leur statut d'activation et évalué les capacités stimulatrices des LB circulants, par l'étude de l'expression de CD80 et CD86 à leur surface, de deux groupes de patients transplantés rénaux traités par (i) Belatacept ou (ii) anti-calcineurines ainsi que (iii) des donneurs sains. Les patients traités par Belatacept sont tous issus des études cliniques de phase III (BENEFIT-BENEFIT-EXT), dont les résultats ont fait l'objet de la récente publication dans le NEJM (cf introduction). Les deux groupes ont été appariés selon des critères cliniques et immunologiques (fonction du greffon stable et absence de DSA à titre significatif). Les différences de phénotype reflèteront donc celles des mécanismes immunologiques relatifs à l'action des deux traitements immunosuppresseurs (CNI ou CTLA4-Ig).

Nous montrons que les patients traités par CTLA4-Ig présentent une expression significativement plus faible de CD80 à la surface des LB comparativement au groupe de patients traités par CNI. De plus, la fréquence et le nombre de TFH circulants totaux et activés (TFH PD1+ICOS+) sont significativement diminués dans le groupe de patients traités par CTLA4-Ig par rapport aux patients traités par CNI. Enfin, la diminution de fréquence des TFH activés n'est pas simplement le reflet d'une diminution de fréquence globale des TFH puisque l'état d'activation (défini par le double marquage ICOS et PD1) est également diminué parmi les TFH. Ainsi ces résultats suggèrent que l'inhibition d'activation des TFH lors de la synapse TFH-LB induite par le CTLA4-Ig s'opère également *in vivo*.

ICOS était considérée comme la principale molécule de co-stimulation impliquée dans la différenciation et l'homéostasie des TFH (Choi et al., 2011; Crotty, 2014). Nos résultats suggèrent cependant que la voie CD28 est également prépondérante *in vitro* et *in vivo* pour le contrôle de l'homéostasie des TFH par les LB.

Cette conclusion est en accord avec les travaux de Ville et al. En effet, dans un modèle humain de co-culture autologue de TFH et LB issus de pièces d'amygdalectomie pédiatriques, les auteurs montrent une diminution de fréquence des TFH induite par le CTLA4-Ig mais également par une nouvelle molécule bloquant spécifiquement le CD28 (Ville et al., 2016). Les modèles expérimentaux montrent de plus que le blocage de CD28 lors de la synapse TFH-LB peut être responsable d'une perturbation de l'homéostasie des TFH induisant les mêmes conséquences phénotypiques que celles observées chez nos patients transplantés rénaux traités par CTLA4-Ig. Ainsi, une délétion conditionnelle du CD28 dans les CD4+ réalisée après priming dans un modèle murin d'infection virale est responsable d'une diminution de la fréquence des TFH (Linterman et al., 2014). Cette altération de fréquence serait secondaire à la perturbation de la collaboration TFH-LB, notamment des LB des CG exprimant CD80 (Vinuesa et al., 2016). En effet l'équipe de M. Shlomchik montre dans un modèle de souris chimérique que la perte d'expression du CD80 exclusivement sur les LB est responsable, après immunisation, d'une diminution de fréquence des TFH et de leur statut d'activation (Good-Jacobson et al., 2012).

Afin de mieux caractériser l'implication du CTLA4-Ig lors de la collaboration TFH-LB, il faudrait évaluer *in vivo* son rôle respectif :

- (a) sur chacune des 3 étapes de la différenciation des LB. Comme nous l'avons vu au chapitre II.2. de l'introduction, la synapse TFH-LB intervient lors de 3 étapes développementales du LB. Les 3 « types » de LB concernés par la collaboration avec les TFH sont: (i) les LB activés lors de l'induction des CG (ii) les LB des CG lors de la sélection des clones affins et (iii) les LB mémoires lors de la réactivation des réponses mémoires.
Déterminer l'effet du CTLA4-Ig *in vivo* sur chacune de ces étapes séparément pourrait être réalisé à l'aide de techniques d'imagerie intravitale bi-photonique *in vivo*.
- (b) Dans les CG, le rôle du CTLA4-Ig pourrait varier selon que l'on étudie le dialogue TFH avec les LB spécifiques de l'antigène des CG (« cognate interactions ») comparativement au dialogue TFH avec les « LB spectateurs/bystander » non spécifiques.
- (c) Sur la modulation de la distribution des molécules de co-stimulation. En effet, il est possible qu'en dehors du blocage de la signalisation du CD28, l'action du CTLA4-Ig sur l'homéostasie des TFH fasse intervenir d'autres partenaires. Il serait notamment important d'évaluer l'impact de la voie PD1/PDL1 sur l'action du CTLA4-Ig (cf Figure 13).

2. Rôle de la collaboration TFH-LB dans l'établissement des réponses humorales

Nous avons ensuite souhaité étudier les conséquences d'un blocage de l'activation des TFH par le CTLA4-Ig dans la synapse TFH-LB sur la réponse humorale.

Dans notre modèle de co-culture *in vitro*, la fréquence des plasmablastes normalement induits dans les suites d'une collaboration TFH-LB efficace est diminuée par le CTLA4-Ig. De plus les fréquences respectives des LB effecteurs, LB mémoires et plasmablastes circulants des patients transplantés rénaux traités par CTLA4-Ig sont significativement plus faibles que celle des patients traités par CNI *in vivo*.

Ces deux résultats suggèrent que l'inhibition/le blocage du dialogue TFH-LB par le CTLA4-Ig pourrait participer à l'inhibition de la réponse humorale *in vitro* et *in vivo* en diminuant l'induction de LB effecteurs.

Il a été montré dans différents modèles que le maintien de la collaboration TFH-LB est vital pour le développement d'une réponse anticorps efficace. Ainsi, l'inhibition de la collaboration entre TFH et LB secondaire à l'absence de protéine SAP, chez l'homme et chez la souris, est responsable d'un déficit immunitaire majeur marqué par une absence de CG et des altérations de la réponse humorale, alors même que le priming des TFH est assuré par les DC dans ce modèle (Crotty et al., 2003; Qi et al., 2008).

De plus, dans un modèle murin de réponses allogéniques, l'équipe d'A. Chong montre que l'injection de CTLA4-Ig sept jours après le challenge allogénique induit un « collapsus » des CG et une diminution de la sécrétion de DSA alors que la différenciation des TFH était effective. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la collaboration TFH-LB par le CTLA4-Ig participe dans ce modèle à une diminution de l'allo-immunisation (Young et al., 2016).

Enfin, chez l'homme, les résultats obtenus chez patients transplantés en situation de tolérance opérationnels suggèrent l'importance du contrôle de ce dialogue TFH-LB pour l'inhibition des réponses humorales en transplantation. En effet, le contexte clinique chez ces patients est le reflet d'une situation immunologique unique avec une fonction rénale parfaitement stable en moyenne dix après l'arrêt de tout traitement immunosuppresseur. De plus, l'équipe de Nantes a également montré que ces patients ne développent pas de DSA contre leur donneur (Chenouard et al., 2016). De façon très intéressante, ces patients présentent également une plus faible proportion et des défauts fonctionnels des TFH circulants par rapport à des patients transplantés rénaux ayant une fonction du greffon stable grâce à la prise d'anticalcineurines.

In vitro, les TFH des patients tolérants opérationnels induisent une diminution significative de la sécrétion d'IgG lors d'expériences de co-cultures entre TFH circulants et LB naïfs, associés à un défaut de sécrétion d'IL21, comparativement à ceux de patients transplantés rénaux traités par anticalcineurines. A l'inverse, l'apparition d'une augmentation des TFH circulants lors du suivi prospectif de patients transplantés

rénaux stables grâce à un traitement immunosuppresseur classique précède l'apparition de DSA chez ces patients.

Ainsi l'ensemble de ces résultats suggère fortement que le contrôle de la collaboration entre TFH et LB pourrait être une étape primordiale pour agir sur la réponse humorale allogénique.

De plus et dans l'hypothèse que les phénotypes des LB et des TFH (ou du moins leur état d'activation) circulants des patients transplantés sont le reflet de la synapse TFH-LB dans les CG (plus que de la synapse TFH-DC), nos résultats suggèrent alors que le traitement par CNI ne modifie pas cette collaboration TFH-LB. En effet, le phénotype lymphocytes circulants des patients transplantés traités par CNI est totalement similaire à celui des donneurs sains. L'hypothèse d'un contrôle limité de la collaboration TFH-LB par les CNI est en accord avec les résultats de Kwun et al dans un modèle de primates non humains greffés rénaux. Dans ce modèle, le traitement d'induction déplétant (anti-CD3) permet une disparition initiale des CG dans les organes lymphoïdes secondaires. Après reconstitution cependant, alors que les primates sont traités par anti-calcineurines, la taille des CG redevient similaire à celle des animaux naïfs. De plus, dans un modèle de rejet aigu humoral chez les primates, les auteurs montrent, concomitamment à l'apparition des DSA, une augmentation de la taille et du nombre de CG, alors que les animaux sont toujours traités par immunosuppresseurs à dose efficace (Kwun et al., 2017). En poussant ce raisonnement encore plus loin, nous pourrions suggérer qu'à l'inverse, le contrôle imparfait de l'allo-immunisation des patients traités par CNI viendrait d'une absence de contrôle efficace de la collaboration TFH-LB.

Inhiber la collaboration TFH-LB apparaît donc être une étape primordiale pour contrôler les réponses humorales allogéniques. Des perspectives thérapeutiques innovantes pourraient être développées pour cibler spécifiquement cette étape. Ainsi de nouvelles biothérapies ciblant d'autres molécules de co-stimulation sont en cours de développement et l'inhibition de la voie ICOS/ICOSL pourrait évidemment avoir un intérêt majeur. En dehors des traitements immunosuppresseurs classiques, l'utilisation

de miRNA pour bloquer l'activation des TFH et le dialogue TFH/LB est évaluée dans les modèles expérimentaux. Enfin Achour et al ont récemment suggéré que les LB « régulateurs », c'est à dire dans cette étude induits par la combinaison de CD40L et CPG, inhiberaient la collaboration TFH-LB en diminuant la différenciation en plasmablastes et la sécrétion d'Ig dans un modèle de co-culture TFH-LB naïfs (Achour et al., 2016).

Conclusion

Au total, nos résultats suggèrent deux modes d'action originaux permettant au CTLA4-Ig de contrôler efficacement les réponses humorales allogéniques. Il agirait (i) directement sur la capacité de sécrétion d'Ig des LB effecteurs exprimant le CD86, et donc en particulier les plasmablastes mais (ii) également sur les capacités « stimulatrices » des LB lors des synapses TFH-LB, permettant de diminuer l'activation des TFH et d'inhiber la différenciation terminale des LB en retour.

Cependant, la compréhension exacte des mécanismes sous-tendant l'action du CTLA4-Ig doit prendre en compte l'impact des autres molécules de co-stimulation.

Ces deux mécanismes d'action peuvent être complémentaires et non exclusifs. Déterminer l'impact de la signalisation directe du CD86 *in vivo* nécessiterait le développement de modèle génétique innovant qui créerait une mutation ponctuelle de son domaine intracellulaire.

Enfin, nous suggérons que le contrôle de la collaboration TFH-LB serait une étape primordiale à cibler pour prévenir l'alloimmunisation HLA en transplantation et peut-être renforcer l'intérêt potentiel de ces molécules dans le champ des pathologies auto-immunes. Le développement de nouvelles thérapies ciblant cette étape permettrait alors de prévenir plus efficacement l'émergence des DSA et peut être ainsi d'améliorer la survie des greffons sur le long terme.

Référence

- Achour, A., Simon, Q., Mohr, A., Séité, J.-F., Youinou, P., Bendaoud, B., Ghedira, I., Pers, J.-O., and Jamin, C. (2016). Human regulatory B cells control the TFH cell response. *J. Allergy Clin. Immunol.*
- Adams, A.B., Williams, M.A., Jones, T.R., Shirasugi, N., Durham, M.M., Kaech, S.M., Wherry, E.J., Onami, T., Lanier, J.G., Kokko, K.E., et al. (2003). Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J. Clin. Invest.* *111*, 1887–1895.
- Ahmed, R., and Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* *272*, 54–60.
- Aiba, Y., Kometani, K., Hamadate, M., Moriyama, S., Sakaue-Sawano, A., Tomura, M., Luche, H., Fehling, H.J., Casellas, R., Kanagawa, O., et al. (2010). Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 12192–12197.
- Ali, J.M., Bolton, E.M., Bradley, J.A., and Pettigrew, G.J. (2013). Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* *96*, 681–688.
- Allen, C.D.C., Ansel, K.M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N., and Cyster, J.G. (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat. Immunol.* *5*, 943–952.
- Allen, C.D.C., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007a). Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* *27*, 190–202.
- Allen, C.D.C., Okada, T., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007b). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* *315*, 528–531.
- Allen, R.C., Armitage, R.J., Conley, M.E., Rosenblatt, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bedell, M.A., Edelhoff, S., Disteche, C.M., and Simoneaux, D.K. (1993). CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* *259*, 990–993.
- von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 867–878.
- Antoine, C., and Legendre, C. (2017). Organ Transplantation in France. *Transplantation* *101*, 445–448.
- Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., and Maliszewski, C.R. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* *357*, 80–82.
- Bannard, O., Horton, R.M., Allen, C.D.C., An, J., Nagasawa, T., and Cyster, J.G. (2013). Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection. *Immunity* *39*, 912–924.
- Bar-Or, A., Oliveira, E.M., Anderson, D.E., Krieger, J.I., Duddy, M., O'Connor, K.C., and

- Hafler, D.A. (2001). Immunological memory: contribution of memory B cells expressing costimulatory molecules in the resting state. *J. Immunol.* *167*, 5669–5677.
- Barrington, R.A., Pozdnyakova, O., Zafari, M.R., Benjamin, C.D., and Carroll, M.C. (2002). B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcγRIIB receptors. *J. Exp. Med.* *196*, 1189–1199.
- Barry, M., and Bleackley, R.C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 401–409.
- Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K.M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity* *38*, 596–605.
- Bélanger, S., and Crotty, S. (2016). Dances with cytokines, featuring TFH cells, IL-21, IL-4 and B cells. *Nat. Immunol.* *17*, 1135–1136.
- Belnoue, E., Pihlgren, M., McGaha, T.L., Tougne, C., Rochat, A.-F., Bossen, C., Schneider, P., Huard, B., Lambert, P.-H., and Siegrist, C.-A. (2008). APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. *Blood* *111*, 2755–2764.
- Benson, M.J., Dillon, S.R., Castigli, E., Geha, R.S., Xu, S., Lam, K.-P., and Noelle, R.J. (2008). Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. *J. Immunol.* *180*, 3655–3659.
- Bentebibel, S.-E., Lopez, S., Obermoser, G., Schmitt, N., Mueller, C., Harrod, C., Flano, E., Mejias, A., Albrecht, R.A., Blankenship, D., et al. (2013). Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci. Transl. Med.* *5*, 176ra32.
- Benzaquen, L.R., Nicholson-Weller, A., and Halperin, J.A. (1994). Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J. Exp. Med.* *179*, 985–992.
- Bigot, J., Pilon, C., Matignon, M., Grondin, C., Leibler, C., Aissat, A., Pirenne, F., Cohen, J.L., and Grimbert, P. (2016). Transcriptomic Signature of the CD24(hi) CD38(hi) Transitional B Cells Associated With an Immunoregulatory Phenotype in Renal Transplant Recipients. *Am. J. Transplant.*
- Blair, P.A., Noreña, L.Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D.J., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., and Mauri, C. (2010). CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity* *32*, 129–140.
- Blink, E.J., Light, A., Kallies, A., Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., and Tarlinton, D.M. (2005). Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *J. Exp. Med.* *201*, 545–554.
- Bouaziz, J.-D., Calbo, S., Maho-Vaillant, M., Saussine, A., Bagot, M., Bensussan, A., and Musette, P. (2010). IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell

activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 40, 2686–2691.

Braudeau, C., Ashton-Chess, J., Giral, M., Dugast, E., Louis, S., Pallier, A., Braud, C., Moreau, A., Renaudin, K., Soulillou, J.-P., et al. (2008). Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 86, 130–136.

Braza, F., Durand, M., Degauque, N., and Brouard, S. (2015). Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? *Am. J. Transplant.* 15, 2288–2300.

Braza, F., Brouard, S., Chadban, S., and Goldstein, D.R. (2016). Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 281–290.

Brennan, D.C., Flavin, K., Lowell, J.A., Howard, T.K., Shenoy, S., Burgess, S., Dolan, S., Kano, J.M., Mahon, M., Schnitzler, M.A., et al. (1999). A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 67, 1011–1018.

Brinkmann, V., and Heusser, C.H. (1993). T cell-dependent differentiation of human B cells into IgM, IgG, IgA, or IgE plasma cells: high rate of antibody production by IgE plasma cells, but limited clonal expansion of IgE precursors. *Cell. Immunol.* 152, 323–332.

Brokhof, M.M., Sollinger, H.W., Hager, D.R., Muth, B.L., Pirsch, J.D., Fernandez, L.A., Bellingham, J.M., Mezrich, J.D., Foley, D.P., D'Alessandro, A.M., et al. (2014). Antithymocyte Globulin is Associated with a Lower Incidence of De Novo Donor-Specific Antibodies in Moderately Sensitized Renal Transplant Recipients. *Transplantation* 97, 612–617.

Butler, J.A., Roderick, P., Mullee, M., Mason, J.C., and Peveler, R.C. (2004). Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation* 77, 769–776.

Campbell, D.J., Kim, C.H., and Butcher, E.C. (2001). Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat. Immunol.* 2, 876–881.

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* 27, 160–171.

Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* 197, 179–191.

Cetrulo, C.L., Drijkoningen, T., and Sachs, D.H. (2015). Tolerance induction via mixed chimerism in vascularized composite allotransplantation: is it time for clinical application? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 602–607.

Chemouny, J.-M., Suberbielle, C., Rabant, M., Zuber, J., Alyanakian, M.-A., Lebreton, X., Carmagnat, M., Pinheiro, N., Loupy, A., Van Huyen, J.-P., et al. (2015). De Novo Donor-Specific Human Leukocyte Antigen Antibodies in Nonsensitized Kidney Transplant Recipients After T Cell Mediated Rejection: *Transplantation* 99, 965–972.

- Chen, J., Yin, H., Xu, J., Wang, Q., Edelblum, K.L., Sciammas, R., and Chong, A.S. (2013). Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am. J. Transplant.* *13*, 2280–2292.
- Chen, L., Wang, T., Zhou, P., Ma, L., Yin, D., Shen, J., Molinero, L., Nozaki, T., Phillips, T., Uematsu, S., et al. (2006). TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am. J. Transplant.* *6*, 2282–2291.
- Chenouard, A., Chesneau, M., Bui Nguyen, L., Le Bot, S., Cadoux, M., Dugast, E., Paul, C., Malard-Castagnet, S., 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. Transplant.*
- Cherukuri, A., Rothstein, D.M., Clark, B., Carter, C.R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., Hewitt, E., Salama, A.D., and Baker, R.J. (2014). Immunologic Human Renal Allograft Injury Associates with an Altered IL-10/TNF- Expression Ratio in Regulatory B Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* *25*, 1575–1585.
- Chesneau, M., Michel, L., Dugast, E., Chenouard, A., Baron, D., Pallier, A., Durand, J., Braza, F., Guerif, P., Laplaud, D.-A., et al. (2015). Tolerant Kidney Transplant Patients Produce B Cells with Regulatory Properties. *J. Am. Soc. Nephrol.*
- Choi, Y.S., Kageyama, R., Eto, D., Escobar, T.C., Johnston, R.J., Monticelli, L., Lao, C., and Crotty, S. (2011). ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity* *34*, 932–946.
- Choi, Y.S., Yang, J.A., Yusuf, I., Johnston, R.J., Greenbaum, J., Peters, B., and Crotty, S. (2013). Bcl6 expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory. *J. Immunol.* *190*, 4014–4026.
- Clatworthy, M.R., Watson, C.J.E., Plotnek, G., Bardsley, V., Chaudhry, A.N., Bradley, J.A., and Smith, K.G.C. (2009). B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2683–2685.
- Cobaleda, C., Jochum, W., and Busslinger, M. (2007). Conversion of mature B cells into T cells by dedifferentiation to uncommitted progenitors. *Nature* *449*, 473–477.
- Collins, A.B., Schneeberger, E.E., Pascual, M.A., Saidman, S.L., Williams, W.W., Tolckoff-Rubin, N., Cosimi, A.B., and Colvin, R.B. (1999). Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *10*, 2208–2214.
- Colvin, R.B., and Smith, R.N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 807–817.
- 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.* *188*, 2643–2652.

- Crawford, A., Macleod, M., Schumacher, T., Corlett, L., and Gray, D. (2006). Primary T cell expansion and differentiation in vivo requires antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* *176*, 3498–3506.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* *41*, 529–542.
- Crotty, S., Kersh, E.N., Cannons, J., Schwartzberg, P.L., and Ahmed, R. (2003). SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* *421*, 282–287.
- Crotty, S., Johnston, R.J., and Schoenberger, S.P. (2010). Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nat. Immunol.* *11*, 114–120.
- Das, A., Ellis, G., Pallant, C., Lopes, A.R., Khanna, P., Peppas, D., Chen, A., Blair, P., Dusheiko, G., Gill, U., et al. (2012). IL-10-Producing Regulatory B Cells in the Pathogenesis of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *J. Immunol.* *189*, 3925–3935.
- Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* *20*, 156–166.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 137–148.
- Deenick, E.K., Chan, A., Ma, C.S., Gatto, D., Schwartzberg, P.L., Brink, R., and Tangye, S.G. (2010). Follicular helper T cell differentiation requires continuous antigen presentation that is independent of unique B cell signaling. *Immunity* *33*, 241–253.
- Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* *24*, 269–281.
- Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., and Fearon, D.T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* *271*, 348–350.
- Deng, S., Moore, D.J., Huang, X., Lian, M.-M., Mohiuddin, M., Veledeoglu, E., Lee, M.K., Sonawane, S., Kim, J., Wang, J., et al. (2007). Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J. Immunol.* *178*, 6028–6032.
- Depoil, D., Fleire, S., Treanor, B.L., Weber, M., Harwood, N.E., Marchbank, K.L., Tybulewicz, V.L.J., and Batista, F.D. (2008). CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nat. Immunol.* *9*, 63–72.
- Descatoire, M., Weller, S., Irtan, S., Sarnacki, S., Feuillard, J., Storck, S., Guiochon-Mantel, A., Bouligand, J., Morali, A., Cohen, J., et al. (2014). Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J. Exp. Med.* *211*, 987–1000.
- Deteix, C., Attuil-Audenis, V., Duthey, A., Patey, N., McGregor, B., Dubois, V., Caligiuri, G., Graff-Dubois, S., Morelon, E., and Thaumat, O. (2010). Intragraft Th17 infiltrate promotes

- lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J. Immunol.* *184*, 5344–5351.
- Diebold, C.A., Beurskens, F.J., de Jong, R.N., Koning, R.I., Strumane, K., Lindorfer, M.A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A.J.R., et al. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* *343*, 1260–1263.
- 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.
- DiSanto, J.P., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1993). CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *361*, 541–543.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* *10*, 1292–1299.
- Duquesnoy, R.J. (2014). HLA epitope based matching for transplantation. *Transpl. Immunol.* *31*, 1–6.
- Ehrhardt, G.R.A., Hijikata, A., Kitamura, H., Ohara, O., Wang, J.-Y., and Cooper, M.D. (2008). Discriminating gene expression profiles of memory B cell subpopulations. *J. Exp. Med.* *205*, 1807–1817.
- Einecke, G., Sis, B., Reeve, J., Mengel, M., Campbell, P.M., Hidalgo, L.G., Kaplan, B., and Halloran, P.F. (2009). Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am. J. Transplant.* *9*, 2520–2531.
- El-Zoghby, Z.M., Stegall, M.D., Lager, D.J., Kremers, W.K., Amer, H., Gloor, J.M., and Cosio, F.G. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am. J. Transplant.* *9*, 527–535.
- Erlich, H.A., Opelz, G., and Hansen, J. (2001). HLA DNA typing and transplantation. *Immunity* *14*, 347–356.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J. Immunol.* *175*, 7867–7879.
- Ettinger, R., Kuchen, S., and Lipsky, P.E. (2008). The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol. Rev.* *223*, 60–86.
- Everly, M.J., Rebellato, L.M., Haisch, C.E., Ozawa, M., Parker, K., Briley, K.P., Catrou, P.G., Bolin, P., Kendrick, W.T., Kendrick, S.A., et al. (2013). Incidence and Impact of De Novo Donor-Specific Alloantibody in Primary Renal Allografts: *Transplant. J.* *95*, 410–417.
- Fazilleau, N., Eisenbraun, M.D., Malherbe, L., Ebright, J.N., Pogue-Caley, R.R., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2007). Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nat. Immunol.* *8*, 753–761.
- Fecteau, J.F., Côté, G., and Néron, S. (2006). A new memory CD27-IgG⁺ B cell population

in peripheral blood expressing VH genes with low frequency of somatic mutation. *J. Immunol.* **177**, 3728–3736.

Flores-Borja, F., Bosma, A., Ng, D., Reddy, V., Ehrenstein, M.R., Isenberg, D.A., and Mauri, C. (2013). CD19⁺ CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* **5**, 173ra23–173ra23.

Ford, M.L. (2016). T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. *Immunity* **44**, 1020–1033.

Ford, M.L., Wagener, M.E., Gangappa, S., Pearson, T.C., and Larsen, C.P. (2007). Antigenic disparity impacts outcome of agonism but not blockade of costimulatory pathways in experimental transplant models. *Am. J. Transplant.* **7**, 1471–1481.

Fuquay, R., Renner, B., Kulik, L., McCullough, J.W., Amura, C., Strassheim, D., Pelanda, R., Torres, R., and Thurman, J.M. (2013). Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 1063–1072.

Gitlin, A.D., Shulman, Z., and Nussenzweig, M.C. (2014). Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* **509**, 637–640.

Gloor, J.M., Sethi, S., Stegall, M.D., Park, W.D., Moore, S.B., DeGoey, S., Griffin, M.D., Larson, T.S., and Cosio, F.G. (2007). Transplant glomerulopathy: subclinical incidence and association with alloantibody. *Am. J. Transplant.* **7**, 2124–2132.

Goenka, R., Barnett, L.G., Silver, J.S., O'Neill, P.J., Hunter, C.A., Cancro, M.P., and Laufer, T.M. (2011). Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation. *J. Immunol.* **187**, 1091–1095.

Good, K.L., Bryant, V.L., and Tangye, S.G. (2006). Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J. Immunol.* **177**, 5236–5247.

Good-Jacobson, K.L., Szumilas, C.G., Chen, L., Sharpe, A.H., Tomayko, M.M., and Shlomchik, M.J. (2010). PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat. Immunol.* **11**, 535–542.

Good-Jacobson, K.L., Song, E., Anderson, S., Sharpe, A.H., and Shlomchik, M.J. (2012). CD80 expression on B cells regulates murine T follicular helper development, germinal center B cell survival, and plasma cell generation. *J. Immunol.* **188**, 4217–4225.

Grimbert, P., and Thaunat, O. (2017). mTOR inhibitors and risk for chronic antibody-mediated rejection after kidney transplantation: Where are we now? *Transpl. Int.*

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101.

Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **351**, 2715–2729.

- Hariharan, S., Johnson, C.P., Bresnahan, B.A., Taranto, S.E., McIntosh, M.J., and Stablein, D. (2000). Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N. Engl. J. Med.* 342, 605–612.
- Harwood, N.E., and Batista, F.D. (2010). Early events in B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 185–210.
- Hathcock, K.S., and Hodes, R.J. (1996). Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses. *Adv. Immunol.* 62, 131–166.
- Haynes, N.M., Allen, C.D.C., Lesley, R., Ansel, K.M., Killeen, N., and Cyster, J.G. (2007). Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. *J. Immunol.* 179, 5099–5108.
- He, J., Tsai, L.M., Leong, Y.A., Hu, X., Ma, C.S., Chevalier, N., Sun, X., Vandenberg, K., Rockman, S., Ding, Y., et al. (2013). Circulating precursor CCR7(lo)PD-1(hi) CXCR5⁺ CD4⁺ T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity* 39, 770–781.
- Heher, E., and Markmann, J.F. (2016). The Clearer BENEFITS of Belatacept. *N. Engl. J. Med.* 374, 388–389.
- 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.* 173, 4828–4837.
- Hikida, M., Casola, S., Takahashi, N., Kaji, T., Takemori, T., Rajewsky, K., and Kurosaki, T. (2009). PLC-gamma2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. *J. Exp. Med.* 206, 681–689.
- Hill, G.S., Nochy, D., Bruneval, P., Duong van Huyen, J.P., Glotz, D., Suberbielle, C., Zuber, J., Anglicheau, D., Empana, J.-P., Legendre, C., et al. (2011). Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 22, 975–983.
- Hirohashi, T., Uehara, S., Chase, C.M., DellaPelle, P., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2010). Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am. J. Transplant.* 10, 510–517.
- Holdaas, H., Rostaing, L., Serón, D., Cole, E., Chapman, J., Fellstrøm, B., Strom, E.H., Jardine, A., Midtvedt, K., Machein, U., et al. (2011). Conversion of long-term kidney transplant recipients from calcineurin inhibitor therapy to everolimus: a randomized, multicenter, 24-month study. *Transplantation* 92, 410–418.
- Hourmant, M. (2005). Frequency and Clinical Implications of Development of Donor-Specific and Non-Donor-Specific HLA Antibodies after Kidney Transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2804–2812.
- Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M.J., Wallweber, H.A., Sasmal, D.K., Huang, J., Kim, J.M., Mellman, I., et al. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for

PD-1-mediated inhibition. *Science*.

Ise, W., Inoue, T., McLachlan, J.B., Kometani, K., Kubo, M., Okada, T., and Kurosaki, T. (2014). Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 11792–11797.

Isnardi, I., Ng, Y.-S., Menard, L., Meyers, G., Saadoun, D., Srdanovic, I., Samuels, J., Berman, J., Buckner, J.H., Cunningham-Rundles, C., et al. (2010). Complement receptor 2/CD21-human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones. *Blood* *115*, 5026–5036.

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.

Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 197–216.

Jeannin, P., Delneste, Y., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J.-F., Ellis, J., and Bonnefoy, J.-Y. (1997). CD86 (B7-2) on Human B Cells a functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 15613–15619.

Jin, Y.-P., Jindra, P.T., Gong, K.W., Lepin, E.J., and Reed, E.F. (2005). Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation* *79*, S19–21.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science* *325*, 1006–1010.

Jørgensen, K.A., Koefoed-Nielsen, P.B., and Karamperis, N. (2003). Calcineurin Phosphatase Activity and Immunosuppression. A Review on the Role of Calcineurin Phosphatase Activity and the Immunosuppressive Effect of Cyclosporin A and Tacrolimus. *Scand. J. Immunol.* *57*, 93–98.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., et al. (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* *450*, 110–114.

Kahan, B.D., Chang, J.Y., and Sehgal, S.N. (1991). Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* *52*, 185–191.

Kallies, A. (2004). Plasma Cell Ontogeny Defined by Quantitative Changes in Blimp-1 Expression. *J. Exp. Med.* *200*, 967–977.

Kamphorst, A.O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D.L., Konieczny, B.T., Daugherty, C.Z., Koenig, L., Yu, K., et al. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*.

Kasprowicz, D.J., Kohm, A.P., Berton, M.T., Chruscinski, A.J., Sharpe, A., and Sanders, V.M.

- (2000). Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7-2), and the beta 2-adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J. Immunol.* *165*, 680–690.
- Kawamoto, S., Tran, T.H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L.M., and Fagarasan, S. (2012). The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science* *336*, 485–489.
- Kerjaschki, D., Regele, H.M., Moosberger, I., Nagy-Bojarski, K., Watschinger, B., Soleiman, A., Birner, P., Krieger, S., Hovorka, A., Silberhumer, G., et al. (2004). Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* *15*, 603–612.
- Kho, M.M.L., Bouvy, A.P., Cadogan, M., Kraaijeveld, R., Baan, C.C., and Weimar, W. (2012). The effect of low and ultra-low dosages Thymoglobulin on peripheral T, B and NK cells in kidney transplant recipients. *Transpl. Immunol.* *26*, 186–190.
- Kim, E.J., Kwun, J., Gibby, A.C., Hong, J.J., Farris, A.B., Iwakoshi, N.N., Villinger, F., Kirk, A.D., and Knechtle, S.J. (2014). Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant.* *14*, 59–69.
- Kin, N.W., and Sanders, V.M. (2007). CD86 Regulates IgG1 Production via a CD19-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* *179*, 1516–1523.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* *34*, 961–972.
- Kitchens, W.H., Haridas, D., Wagener, M.E., Song, M., Kirk, A.D., Larsen, C.P., and Ford, M.L. (2012). Integrin antagonists prevent costimulatory blockade-resistant transplant rejection by CD8(+) memory T cells. *Am. J. Transplant.* *12*, 69–80.
- Klein, U., Küppers, R., and Rajewsky, K. (1997). Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood* *89*, 1288–1298.
- Koenig, A., and Thaunat, O. (2016). Lymphoid Neogenesis and Tertiary Lymphoid Organs in Transplanted Organs. *Front. Immunol.* *7*, 646.
- Kopf, M., Le Gros, G., Coyle, A.J., Kosco-Vilbois, M., and Brombacher, F. (1995). Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice. *Immunol. Rev.* *148*, 45–69.
- Korthäuer, U., Graf, D., Mages, H.W., Brière, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., and Kroczeck, R.A. (1993). Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *361*, 539–541.
- Kosmoliaptsis, V., Chaudhry, A.N., Sharples, L.D., Halsall, D.J., Dafforn, T.R., Bradley, J.A., and Taylor, C.J. (2009). Predicting HLA class I alloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* *88*, 791–798.
- Kosmoliaptsis, V., Sharples, L.D., Chaudhry, A.N., Halsall, D.J., Bradley, J.A., and Taylor, C.J. (2011). Predicting HLA class II alloantigen immunogenicity from the number and

physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 91, 183–190.

Kräutler, N.J., Suan, D., Butt, D., Bourne, K., Hermes, J.R., Chan, T.D., Sundling, C., Kaplan, W., Schofield, P., Jackson, J., et al. (2017). Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells. *J. Exp. Med.*

Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159.

Kwun, J., Manook, M., Page, E., Burghuber, C., Hong, J., and Knechtle, S.J. (2017). Crosstalk Between T and B Cells in the Germinal Center After Transplantation. *Transplantation* 101, 704–712.

Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537–539.

Larsen, C.P., Morris, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J. Exp. Med.* 171, 307–314.

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.* 5, 443–453.

Le Texier, L., Thebault, P., Lavault, A., Usal, C., Merieau, E., Quillard, T., Charreau, B., Souillou, J.P., Cuturi, M.C., Brouard, S., et al. (2011). Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile: Accumulation of Inhibited B Cells. *Am. J. Transplant.* 11, 429–438.

LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580.

Lee, F., Luevano, M., Veys, P., Yong, K., Madrigal, A., Shaw, B.E., and Saudemont, A. (2014). The effects of CAMPATH-1H on cell viability do not correlate to the CD52 density on the cell surface. *PloS One* 9, e103254.

Lee, P.-C., Terasaki, P.I., Takemoto, S.K., Lee, P.-H., Hung, C.-J., Chen, Y.-L., Tsai, A., and Lei, H.-Y. (2002). All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74, 1192–1194.

Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G.S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D., and Suberbielle-Boissel, C. (2010). Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 1398–1406.

Leibler, C., Matignon, M., Pilon, C., Montespan, F., Bigot, J., Lang, P., Carosella, E.D., Cohen, J., Rouas-Freiss, N., Grimbert, P., et al. (2014). Kidney Transplant Recipients Treated With Belatacept Exhibit Increased Naïve and Transitional B Cells: B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients. *Am. J. Transplant.* 14, 1173–1182.

Li, H., Stegall, M.D., Dean, P.G., Casey, E.T., Reddy, K.S., Khamash, H.A., Heilman, R.L., Mai,

- M.L., Taner, C.B., Kosberg, C.L., et al. (2014). Assessing the efficacy of kidney paired donation--performance of an integrated three-site program. *Transplantation* 98, 300–305.
- Li, J., Lu, E., Yi, T., and Cyster, J.G. (2016). EBI2 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* 533, 110–114.
- Liarski, V.M., Kaverina, N., Chang, A., Brandt, D., Yanez, D., Talasnik, L., Carlesso, G., Herbst, R., Utset, T.O., Labno, C., et al. (2014). Cell distance mapping identifies functional T follicular helper cells in inflamed human renal tissue. *Sci. Transl. Med.* 6, 230ra46.
- Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.
- Linterman, M.A., Pierson, W., Lee, S.K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat. Med.* 17, 975–982.
- Linterman, M.A., Denton, A.E., Divekar, D.P., Zvetkova, I., Kane, L., Ferreira, C., Veldhoen, M., Clare, S., Dougan, G., Espéli, M., et al. (2014). CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* 3.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015a). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214–218.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015b). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214–218.
- Locci, M., Havenar-Daughton, C., Landais, E., Wu, J., Kroenke, M.A., Arlehamn, C.L., Su, L.F., Cubas, R., Davis, M.M., Sette, A., et al. (2013). Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 39, 758–769.
- Loupy, A., Hill, G.S., Suberbielle, C., Charron, D., Anglicheau, D., Zuber, J., Timsit, M.O., Duong, J.P., Bruneval, P., Vernerey, D., et al. (2011). Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *Am. J. Transplant.* 11, 56–65.
- Loupy, A., Hill, G.S., and Jordan, S.C. (2012). The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 348–357.
- Loupy, A., Haas, M., Solez, K., Racusen, L., Glotz, D., Seron, D., Nankivell, B.J., Colvin, R.B., Afrouzian, M., Akalin, E., et al. (2017). The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am. J. Transplant.* 17, 28–41.
- Löwenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J., Gaber, T., Buttgereit, F., Deventer, S. van, Peppelenbosch, M., and Hommes, D. (2005). Rapid immunosuppressive effects of

glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106, 1703–1710.

Lucchiari, N., Panajotopoulos, N., Xu, C., Rodrigues, H., Ianhez, L.E., Kalil, J., and Glotz, D. (2000). Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Hum. Immunol.* 61, 518–527.

Lund, F.E., and Randall, T.D. (2010). Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 236–247.

Ma, C.S., and Deenick, E.K. (2014). Human T follicular helper (Tfh) cells and disease. *Immunol. Cell Biol.* 92, 64–71.

MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* 194, 8–18.

Mandelbrot, D.A., Furukawa, Y., McAdam, A.J., Alexander, S.I., Libby, P., Mitchell, R.N., and Sharpe, A.H. (1999). Expression of B7 molecules in recipient, not donor, mice determines the survival of cardiac allografts. *J. Immunol.* 163, 3753–3757.

Manzo, C., Bianchin, A., Pirozzi, G., and Totaro, G. (1983). Immune complexes of IgG1 and IgG3 subclasses in human breast cancer sera detected by monoclonal antibodies in an indirect immunoenzymatic assay. *Oncology* 40, 395–399.

Marfo, K., Lu, A., Ling, M., and Akalin, E. (2011). Desensitization protocols and their outcome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 6, 922–936.

Marín, L.A., Moya-Quiles, M.R., Miras, M., Muro, M., Minguela, A., Bermejo, J., Ramírez, P., García-Alonso, A.M., Parrilla, P., and Alvarez-López, M.R. (2005). Evaluation of CD86 gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients. *Transpl. Immunol.* 15, 69–74.

Martin, L., Guignier, F., Mousson, C., Rageot, D., Justrabo, E., and Riflé, G. (2003). Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 76, 395–400.

Mauri, C., and Menon, M. (2017). Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 127, 772–779.

Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J.D., Srinivas, T.R., and Kaplan, B. (2004). Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am. J. Transplant.* 4, 378–383.

Mele, T.S., and Halloran, P.F. (2000). The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. *Immunopharmacology* 47, 215–245.

Meli, A.P., Fontés, G., Avery, D.T., Leddon, S.A., Tam, M., Elliot, M., Ballesteros-Tato, A., Miller, J., Stevenson, M.M., Fowell, D.J., et al. (2016). The Integrin LFA-1 Controls T Follicular Helper Cell Generation and Maintenance. *Immunity* 45, 831–846.

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.

Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., et al. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34, 108–121.

Nakashima, S., Qian, Z., Rahimi, S., Wasowska, B.A., and Baldwin, W.M. (2002). Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *J. Immunol.* 169, 4620–4627.

Nankivell, B.J., and Alexander, S.I. (2010). Rejection of the kidney allograft. *N. Engl. J. Med.* 363, 1451–1462.

Nevins, T.E., Kruse, L., Skeans, M.A., and Thomas, W. (2001). The natural history of azathioprine compliance after renal transplantation. *Kidney Int.* 60, 1565–1570.

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.

Noël, C., Abramowicz, D., Durand, D., Mourad, G., Lang, P., Kessler, M., Charpentier, B., Touchard, G., Berthoux, F., Merville, P., et al. (2009). Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 20, 1385–1392.

Nouël, A., Ségalen, I., Jamin, C., Doucet, L., Caillard, S., Renaudineau, Y., Pers, J.-O., Le Meur, Y., and Hillion, S. (2014). B cells display an abnormal distribution and an impaired suppressive function in patients with chronic antibody-mediated rejection. *Kidney Int.* 85, 590–599.

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.

Ntokou, I.-S.A., Iniotaki, A.G., Kontou, E.N., Darema, M.N., Apostolaki, M.D., Kostakis, A.G., and Boletis, J.N. (2011). Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl. Int.* 24, 1084–1093.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325, 1001–1005.

Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556–562.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171.

Oberbarnscheidt, M.H., Zeng, Q., Li, Q., Dai, H., Williams, A.L., Shlomchik, W.D., Rothstein,

- D.M., and Lakkis, F.G. (2014). Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection. *J. Clin. Invest.* 124, 3579–3589.
- Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Simonetti, G., Chen, J., Rosenthal, R., Brink, R., Chong, A.S., Klein, U., Dinner, A.R., Singh, H., et al. (2013). Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity* 38, 918–929.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.-F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630–1634.
- O’Leary, J.G., Samaniego, M., Barrio, M.C., Potena, L., Zeevi, A., Djamali, A., and Cozzi, E. (2016). The Influence of Immunosuppressive Agents on the Risk of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Production in Solid Organ Transplant Recipients. *Transplantation* 100, 39–53.
- Padiyar, A., Augustine, J.J., and Hricik, D.E. (2009). Induction antibody therapy in kidney transplantation. *Am. J. Kidney Dis.* 54, 935–944.
- Pallier, A., Hillion, S., Danger, R., Giral, M., Racapé, M., Degauque, N., Dugast, E., Ashton-Chess, J., 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.
- Pape, K.A., Catron, D.M., Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2007). The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity* 26, 491–502.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331, 1203–1207.
- Patel, R., and Terasaki, P.I. (1969). Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N. Engl. J. Med.* 280, 735–739.
- Pei, R., Lee, J.-H., Shih, N.-J., Chen, M., and Terasaki, P.I. (2003). Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 75, 43–49.
- Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* 8, 992–1000.
- Pinter, J., Hanson, C.S., Chapman, J.R., Wong, G., Craig, J.C., Schell, J.O., and Tong, A. (2017). Perspectives of Older Kidney Transplant Recipients on Kidney Transplantation. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 12, 443–453.
- Podofil, J.R., Kin, N.W., and Sanders, V.M. (2004). CD86 and beta2-adrenergic receptor signaling pathways, respectively, increase Oct-2 and OCA-B Expression and binding to the 3’-IgH enhancer in B cells. *J. Biol. Chem.* 279, 23394–23404.
- Qi, H. (2016). T follicular helper cells in space-time. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 612–625.

- Qi, H., Egen, J.G., Huang, A.Y.C., and Germain, R.N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312, 1672–1676.
- Qi, H., Cannons, J.L., Klauschen, F., Schwartzberg, P.L., and Germain, R.N. (2008). SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* 455, 764–769.
- Rama, I., and Grinyó, J.M. (2010). Malignancy after renal transplantation: the role of immunosuppression. *Nat. Rev. Nephrol.* 6, 511–519.
- Rau, F.C., Dieter, J., Luo, Z., Priest, S.O., and Baumgarth, N. (2009). B7-1/2 (CD80/CD86) Direct Signaling to B Cells Enhances IgG Secretion. *J. Immunol.* 183, 7661–7671.
- Rebellato, L.M., Everly, M.J., Haisch, C.E., Ozawa, M., Briley, K.P., Parker, K., Catrou, P.G., Bolin, P., Kendrick, W.T., Kendrick, S.A., et al. (2011). A report of the epidemiology of de novo donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in “low-risk” renal transplant recipients. *Clin. Transpl.* 337–340.
- Rock, K.L., Benacerraf, B., and Abbas, A.K. (1984). Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. *J. Exp. Med.* 160, 1102–1113.
- Roldán, E., García-Pardo, A., and Brieva, J.A. (1992). VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 175, 1739–1747.
- Roozendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity* 30, 264–276.
- Rosser, E.C., and Mauri, C. (2015). Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity* 42, 607–612.
- Rostaing, L., and Kamar, N. (2010). mTOR inhibitor/proliferation signal inhibitors: entering or leaving the field? *J. Nephrol.* 23, 133–142.
- Rostaing, L., Vincenti, F., Grinyó, J., Rice, K.M., Bresnahan, B., Steinberg, S., Gang, S., Gaite, L.E., Moal, M.-C., Mondragón-Ramirez, G.A., et al. (2013). Long-Term Belatacept Exposure Maintains Efficacy and Safety at 5 Years: Results From the Long-Term Extension of the BENEFIT Study: BENEFIT Long-Term Extension. *Am. J. Transplant.* 13, 2875–2883.
- Rozanski, C.H., Arens, R., Carlson, L.M., Nair, J., Boise, L.H., Chanan-Khan, A.A., Schoenberger, S.P., and Lee, K.P. (2011). Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J. Exp. Med.* 208, 1435–1446.
- Rozanski, C.H., Utley, A., Carlson, L.M., Farren, M.R., Murray, M., Russell, L.M., Nair, J.R., Yang, Z., Brady, W., Garrett-Sinha, L.A., et al. (2015). CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J. Immunol.* 194, 4717–4728.
- Russell, P.S., Chase, C.M., Winn, H.J., and Colvin, R.B. (1994). Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J. Immunol.* 152, 5135–

5141.

Saadi, S., Holzknicht, R.A., Patte, C.P., and Platt, J.L. (2000). Endothelial cell activation by pore-forming structures: pivotal role for interleukin-1 α . *Circulation* *101*, 1867–1873.

Schinstock, C., Dean, P.G., Li, H., Casey, E.T., Reddy, K.S., Khamash, H.A., Heilman, R.L., Mai, M.L., Taner, C.B., Kosbergl, C.L., et al. (2013). Desensitization in the era of kidney paired donation: the Mayo Foundation 3-site experience. *Clin. Transpl.* 235–239.

Schmitt, N., Liu, Y., Bentebibel, S.-E., Munagala, I., Bourdery, L., Venuprasad, K., Banchereau, J., and Ueno, H. (2014a). The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat. Immunol.* *15*, 856–865.

Schmitt, N., Bentebibel, S.-E., and Ueno, H. (2014b). Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol.* *35*, 436–442.

Scholz, J.L., Crowley, J.E., Tomayko, M.M., Steinell, N., O'Neill, P.J., Quinn, W.J., Goenka, R., Miller, J.P., Cho, Y.H., Long, V., et al. (2008). BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 15517–15522.

Schwickert, T.A., Victora, G.D., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Mugnier, M.R., Gitlin, A.D., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2011). A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* *208*, 1243–1252.

Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* *25*, 225–236.

Seifert, M., Przekopowicz, M., Taudien, S., Lollies, A., Ronge, V., Drees, B., Lindemann, M., Hillen, U., Engler, H., Singer, B.B., et al. (2015). Functional capacities of human IgM memory B cells in early inflammatory responses and secondary germinal center reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E546–555.

Sellarés, J., de Freitas, D.G., Mengel, M., Reeve, J., Einecke, G., Sis, B., Hidalgo, L.G., Famulski, K., Matas, A., and Halloran, P.F. (2012). Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am. J. Transplant.* *12*, 388–399.

Shabir, S., Girdlestone, J., Briggs, D., Kaul, B., Smith, H., Daga, S., Chand, S., Jham, S., Navarrete, C., Harper, L., et al. (2015). Transitional B Lymphocytes Are Associated With Protection From Kidney Allograft Rejection: A Prospective Study: Transitional B Cells and Rejection. *Am. J. Transplant.*

Shen, H., Kreisel, D., and Goldstein, D.R. (2013). Processes of sterile inflammation. *J. Immunol.* *191*, 2857–2863.

Shulman, Z., Gitlin, A.D., Weinstein, J.S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R.A., Craft, J.E., and Nussenzweig, M.C. (2014). Dynamic signaling by T follicular helper cells during

germinal center B cell selection. *Science* 345, 1058–1062.

Sicard, A., Ducreux, S., Rabeyrin, M., Couzi, L., McGregor, B., Badet, L., Scoazec, J.Y., Bachelet, T., Lepreux, S., Visentin, J., et al. (2015). Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26, 457–467.

Sis, B., Campbell, P.M., Mueller, T., Hunter, C., Cockfield, S.M., Cruz, J., Meng, C., Wishart, D., Solez, K., and Halloran, P.F. (2007). Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am. J. Transplant.* 7, 1743–1752.

Sis, B., Jhangri, G.S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B., and Halloran, P.F. (2009). Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am. J. Transplant.* 9, 2312–2323.

Sivaganesh, S., Harper, S.J., Conlon, T.M., Callaghan, C.J., Saeb-Parsy, K., Negus, M.C., Motallebzadeh, R., Bolton, E.M., Bradley, J.A., and Pettigrew, G.J. (2013). Copresentation of intact and processed MHC alloantigen by recipient dendritic cells enables delivery of linked help to alloreactive CD8 T cells by indirect-pathway CD4 T cells. *J. Immunol.* 190, 5829–5838.

Smith, R.N., and Colvin, R.B. (2012). Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin. Immunol.* 24, 115–121.

Smith, J.D., Lawson, C., Yacoub, M.H., and Rose, M.L. (2000). Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *Int. Immunol.* 12, 563–571.

Smith, R.N., Kawai, T., Boskovic, S., Nadazdin, O., Sachs, D.H., Cosimi, A.B., and Colvin, R.B. (2006). Chronic antibody mediated rejection of renal allografts: pathological, serological and immunologic features in nonhuman primates. *Am. J. Transplant.* 6, 1790–1798.

Smith, R.N., Kawai, T., Boskovic, S., Nadazdin, O., Sachs, D.H., Cosimi, A.B., and Colvin, R.B. (2008). Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. *Am. J. Transplant.* 8, 1662–1672.

Sponaas, A.-M., Moharrami, N.N., Feyzi, E., Standal, T., Holth Rustad, E., Waage, A., and Sundan, A. (2015). PDL1 Expression on Plasma and Dendritic Cells in Myeloma Bone Marrow Suggests Benefit of Targeted anti PD1-PDL1 Therapy. *PloS One* 10, e0139867.

Starzl, T.E., Lerner, R.A., Dixon, F.J., Groth, C.G., Brettschneider, L., and Terasaki, P.I. (1968). Schwartzman reaction after human renal homotransplantation. *N. Engl. J. Med.* 278, 642–648.

Stetson, C.A., and Demopoulos, R. (1958). Reactions of skin homografts with specific immune sera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 73, 687–692.

Suarez-Almazor, M.E., Kim, S.T., Abdel-Wahab, N., and Diab, A. (2017). Review: Immune-Related Adverse Events With Use of Checkpoint Inhibitors for Immunotherapy of Cancer. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 69, 687–699.

- Suzuki, K., Grigorova, I., Phan, T.G., Kelly, L.M., and Cyster, J.G. (2009). Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J. Exp. Med.* *206*, 1485–1493.
- Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H., and de Vries, J.E. (1998). Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* *188*, 1691–1703.
- Taubenheim, N., Tarlinton, D.M., Crawford, S., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2012). High rate of antibody secretion is not integral to plasma cell differentiation as revealed by XBP-1 deficiency. *J. Immunol.* *189*, 3328–3338.
- Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* *209*, 597–606.
- Tellier, J., Shi, W., Minnich, M., Liao, Y., Crawford, S., Smyth, G.K., Kallies, A., Busslinger, M., and Nutt, S.L. (2016). Blimp-1 controls plasma cell function through the regulation of immunoglobulin secretion and the unfolded protein response. *Nat. Immunol.* *17*, 323–330.
- Terasaki, P.I. (2012). A personal perspective: 100-year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation* *93*, 751–756.
- Terasaki, P.I., and Cai, J. (2008). Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* *86*, 377–383.
- Terasaki, P.I., Akiyama, T., McCLELLAND, J.D., and Cannon, J.A. (1962). Renal damage produced in vivo by homologous mouse antisera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *99*, 645–656.
- Terasaki, P.I., Ozawa, M., and Castro, R. (2007). Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am. J. Transplant.* *7*, 408–415.
- Thaunat, O., Field, A.-C., Dai, J., Louedec, L., Patey, N., Bloch, M.-F., Mandet, C., Belair, M.-F., Bruneval, P., Meilhac, O., et al. (2005). Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14723–14728.
- Thaunat, O., Patey, N., Caligiuri, G., Gautreau, C., Mamani-Matsuda, M., Mekki, Y., Dieu-Nosjean, M.-C., Eberl, G., Ecochard, R., Michel, J.-B., et al. (2010a). Chronic rejection triggers the development of an aggressive intragraft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J. Immunol.* *185*, 717–728.
- Thaunat, O., Graff-Dubois, S., Brouard, S., Gautreau, C., Varthaman, A., Fabien, N., Field, A.-C., Louedec, L., Dai, J., Joly, E., et al. (2010b). Immune Responses Elicited in Tertiary Lymphoid Tissues Display Distinctive Features. *PLoS ONE* *5*, e11398.
- Thaunat, O., Morelon, E., and Defrance, T. (2010c). Am“B”valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood* *116*, 515–521.
- Thaunat, O., Graff-Dubois, S., Fabien, N., Duthey, A., Attuil-Audenis, V., Nicoletti, A., Patey, N., and Morelon, E. (2012). A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int.* *81*, 207–219.

- Thaunat, O., Koenig, A., Leibler, C., and Grimbert, P. (2016). Effect of Immunosuppressive Drugs on Humoral Allosensitization after Kidney Transplant. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 27, 1890–1900.
- Thibaudin, D., Alamartine, E., de Filippis, J.P., Diab, N., Laurent, B., and Berthoux, F. (1998). Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: a randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13, 711–715.
- Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., and Glimcher, L.H. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J. Exp. Med.* 206, 2151–2159.
- Tonelli, M., Wiebe, N., Knoll, G., Bello, A., Browne, S., Jadhav, D., Klarenbach, S., and Gill, J. (2011). Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am. J. Transplant.* 11, 2093–2109.
- Uehara, S., Chase, C.M., Cornell, L.D., Madsen, J.C., Russell, P.S., and Colvin, R.B. (2007). Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis. *Am. J. Transplant.* 7, 57–65.
- Ueno, H., Banchereau, J., and Vinuesa, C.G. (2015). Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* 16, 142–152.
- Van Laethem, F., Baus, E., Smyth, L.A., Andris, F., Bex, F., Urbain, J., Kioussis, D., and Leo, O. (2001). Glucocorticoids Attenuate T Cell Receptor Signaling. *J. Exp. Med.* 193, 803–814.
- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.
- Victora, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592–605.
- Victora, G.D., Dominguez-Sola, D., Holmes, A.B., Deroubaix, S., Dalla-Favera, R., and Nussenzweig, M.C. (2012). Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood* 120, 2240–2248.
- Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Front. Immunol.* 5.
- Ville, S., Poirier, N., Branchereau, J., Charpy, V., Pengam, S., Nerrière-Daguin, V., Le Bas-Bernardet, S., Coulon, F., Mary, C., Chenouard, A., et al. (2016). Anti-CD28 Antibody and Belatacept Exert Differential Effects on Mechanisms of Renal Allograft Rejection. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*.
- Vincenti, F. (2012). Are calcineurin inhibitors-free regimens ready for prime time? *Kidney Int.* 82, 1054–1060.

- Vincenti, F., Kirkman, R., Light, S., Bumgardner, G., Pescovitz, M., Halloran, P., Neylan, J., Wilkinson, A., Ekberg, H., Gaston, R., et al. (1998). Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* *338*, 161–165.
- Vincenti, F., Rostaing, L., Grinyo, J., Rice, K., Steinberg, S., Gaithe, L., Moal, M.-C., Mondragon-Ramirez, G.A., Kothari, J., Polinsky, M.S., et al. (2016). Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* *374*, 333–343.
- Vinuesa, C.G., Linterman, M.A., Yu, D., and MacLennan, I.C.M. (2016). Follicular Helper T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 335–368.
- Walker, W.E., Nasr, I.W., Camirand, G., Tesar, B.M., Booth, C.J., and Goldstein, D.R. (2006). Absence of innate MyD88 signaling promotes inducible allograft acceptance. *J. Immunol.* *177*, 5307–5316.
- Wall, A.E., Veale, J.L., and Melcher, M.L. (2017). Advanced Donation Programs and Deceased Donor Initiated Chains - 2 Innovations in Kidney Paired Donation. Transplantation.
- Wehrli, N., Legler, D.F., Finke, D., Toellner, K.M., Loetscher, P., Baggiolini, M., MacLennan, I.C., and Acha-Orbea, H. (2001). Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* *31*, 609–616.
- Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E.C.B., and Sanz, I. (2007). A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* *178*, 6624–6633.
- Weill, J.-C., Weller, S., and Reynaud, C.-A. (2009). Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 267–285.
- Weisel, F., and Shlomchik, M. (2017). Memory B Cells of Mice and Humans. *Annu. Rev. Immunol.* *35*, 255–284.
- Wiebe, C., Gibson, I.W., Blydt-Hansen, T.D., Karpinski, M., Ho, J., Storsley, L.J., Goldberg, A., Birk, P.E., Rush, D.N., and Nickerson, P.W. (2012). Evolution and Clinical Pathologic Correlations of De Novo Donor-Specific HLA Antibody Post Kidney Transplant: Clinical Pathologic Correlations of De Novo DSA. *Am. J. Transplant.* *12*, 1157–1167.
- Wiebe, C., Pochinco, D., Blydt-Hansen, T.D., Ho, J., Birk, P.E., Karpinski, M., Goldberg, A., Storsley, L.J., Gibson, I.W., Rush, D.N., et al. (2013). Class II HLA epitope matching-A strategy to minimize de novo donor-specific antibody development and improve outcomes. *Am. J. Transplant.* *13*, 3114–3122.
- Wiebe, C., Gibson, I.W., Blydt-Hansen, T.D., Pochinco, D., Birk, P.E., Ho, J., Karpinski, M., Goldberg, A., Storsley, L., Rush, D.N., et al. (2015a). Rates and determinants of progression to graft failure in kidney allograft recipients with de novo donor-specific antibody. *Am. J. Transplant.* *15*, 2921–2930.
- Wiebe, C., Nevins, T.E., Robiner, W.N., Thomas, W., Matas, A.J., and Nickerson, P.W.

- (2015b). The Synergistic Effect of Class II HLA Epitope-Mismatch and Nonadherence on Acute Rejection and Graft Survival. *Am. J. Transplant.* *15*, 2197–2202.
- Williams, G.M., Hume, D.M., Hudson, R.P., Morris, P.J., Kano, K., and Milgrom, F. (1968). “Hyperacute” renal-homograft rejection in man. *N. Engl. J. Med.* *279*, 611–618.
- Williams, R.C., Opelz, G., McGarvey, C.J., Weil, E.J., and Chakkera, H.A. (2016). The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation* *100*, 1094–1102.
- Wolfe, R.A., Ashby, V.B., Milford, E.L., Ojo, A.O., Ettenger, R.E., Agodoa, L.Y., Held, P.J., and Port, F.K. (1999). Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N. Engl. J. Med.* *341*, 1725–1730.
- Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernández, A., Almeida, C., Oliveira, V.G., Faro, J., and Graca, L. (2011). Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J. Immunol.* *187*, 4553–4560.
- Worthington, J.E., Martin, S., Al-Husseini, D.M., Dyer, P.A., and Johnson, R.W.G. (2003). Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* *75*, 1034–1040.
- Wu, H., Chen, G., Wyburn, K.R., Yin, J., Bertolino, P., Eris, J.M., Alexander, S.I., Sharland, A.F., and Chadban, S.J. (2007). TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* *117*, 2847–2859.
- Xu, H., Li, X., Liu, D., Li, J., Zhang, X., Chen, X., Hou, S., Peng, L., Xu, C., Liu, W., et al. (2013). Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature* *496*, 523–527.
- Young, J.S., Chen, J., Miller, M.L., Vu, V., Tian, C., Moon, J.J., Alegre, M.-L., Sciammas, R., and Chong, A.S. (2016). Delayed CTLA4-Ig treatment reverses ongoing alloantibody responses and rescues allografts from acute rejection. *Am. J. Transplant.*
- Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N., et al. (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. *Immunity* *31*, 457–468.
- Yu, X., Tsibane, T., McGraw, P.A., House, F.S., Keefer, C.J., Hicar, M.D., Tumpey, T.M., Pappas, C., Perrone, L.A., Martinez, O., et al. (2008). Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature* *455*, 532–536.
- Yuan, F.F., Watson, N., Sullivan, J.S., Biffin, S., Moses, J., Geczy, A.F., and Chapman, J.R. (2004). Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. *Transplantation* *78*, 766–769.
- Zabel, F., Fettelschoss, A., Vogel, M., Johansen, P., Kündig, T.M., and Bachmann, M.F. (2017). Distinct T helper cell dependence of memory B-cell proliferation versus plasma cell differentiation. *Immunology* *150*, 329–342.
- Zhang, S., Readinger, J.A., DuBois, W., Janka-Junttila, M., Robinson, R., Pruitt, M.,

- Bliskovsky, V., Wu, J.Z., Sakakibara, K., Patel, J., et al. (2011). Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production. *Blood* *117*, 1228–1238.
- Zhang, Y., Meyer-Hermann, M., George, L.A., Figge, M.T., Khan, M., Goodall, M., Young, S.P., Reynolds, A., Falciani, F., Waisman, A., et al. (2013). Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback. *J. Exp. Med.* *210*, 457–464.
- Zhuang, Q., and Lakkis, F.G. (2015). Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney Int.* *87*, 712–718.
- Zuccarino-Catania, G.V., Sadanand, S., Weisel, F.J., Tomayko, M.M., Meng, H., Kleinstein, S.H., Good-Jacobson, K.L., and Shlomchik, M.J. (2014). CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. *Nat. Immunol.* *15*, 631–637.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Mécanismes des traitements immunosuppresseurs sur l'allo-immunisation après transplantation rénale (Revue)

ANNEXE 2 : Augmentation de fréquence des LB naïfs et transitionnels chez les patients transplantés rénaux après traitement par Belatacept (Article)

I. ANNEXE 1 : Mécanismes des traitements
immunosuppresseurs sur l'allo-immunisation après
transplantation rénale (Revue)

BRIEF REVIEW

www.jasn.org

Effect of Immunosuppressive Drugs on Humoral Allosensitization after Kidney Transplant

Olivier Thaumat,* Alice Koenig,* Claire Leibler,[†] and Philippe Grimbert[†]

*Service de Transplantation, Néphrologie et Immunologie Clinique, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, INSERM UMR1111, Université de Lyon, Lyon, France; and [†]Service de Néphrologie et Transplantation, Hôpital Henri Mondor, Centre de référence maladie rare Syndrome Néphrotique Idiopathique, Institut Francilien de recherche en Néphrologie et Transplantation, INSERM U955, Université Paris Est Créteil, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Creteil, France

ABSTRACT

The negative effect of donor-specific antibodies on the success of solid transplant is now clearly established. However, the lack of effective treatment to prevent the development of antibody-mediated lesions deepens the need for clinicians to focus on primary prevention of *de novo* humoral allosensitization. Among the factors associated with the risk of developing *de novo* donor-specific antibodies, therapeutic immunosuppression is the most obvious parameter in which improvement is possible. Beyond compliance and the overall depth of immunosuppression, it is likely that the nature of the drugs is also crucial. Here, we provide an overview of the molecular effect of the various immunosuppressive drugs on B cell biology. Clinical data related to the effect of these drugs on *de novo* humoral allosensitization are also examined, providing a platform from which clinicians can optimize immunosuppression for prevention of *de novo* donor-specific antibody generation at the individual level.

J Am Soc Nephrol 27: 1890–1900, 2016. doi: 10.1681/ASN.2015070781

Antibody-mediated rejection (AMR) is widely recognized as the leading cause of late transplant failure and accounts for approximately two thirds of renal allograft losses.^{1,2} In 2003, AMR was added to the Banff classification for interpretation of renal allograft biopsy,³ sparking intense interest in the transplant community. Clinical studies over the last 10 years have established that antibodies generated *de novo* post-transplantation against donor-specific antigens (DSAs) are strongly associated and may be an important cause of allograft loss.^{1,4,5}

Experimental studies have shed light on the natural history of AMR.^{6,7} The sequence starts with the generation of antibodies directed against the graft. Although highly polymorphic mismatched

HLA molecules represent the most documented targets for DSAs, it is clear that DSAs can also be directed against other kinds of molecular targets, including polymorphic minor histocompatibility antigens and after a breakdown of B cell tolerance,⁸ nonpolymorphic auto-antigens.⁹ DSAs are massive proteins that are largely sequestered in the circulation.¹⁰ Binding of circulating DSAs to directly accessible graft endothelial cells can trigger the activation of a classic complement pathway, a central process in the pathophysiology of acute AMR (*i.e.*, AMR with acute graft dysfunction).¹¹ Complement activation by antibodies depends on the recruitment and activation of the component C1q. After antigen binding on cells, IgGs establish specific noncovalent interactions between

Fc segments, resulting in the formation of ordered antibody hexamers with exquisite ability to recruit and activate C1q.¹² The probability that a sufficient number of IgGs binds close enough to form such hexameric complexes is strongly influenced by antibody titer. In line with this idea is the fact that the ability of DSAs to bind C1q or C3d in a solid-phase assay correlates with their MFI.^{11,13} Another clue that DSA titer is an important factor in their ability to activate complement is in the study by Yell *et al.*¹⁴ which shows that most C1q binding DSAs can be converted into non-C1q binding DSAs when diluted. However, DSAs with similar MFI do not always activate the complement,¹¹ which indicates that, beyond the quantity, some qualitative features of antibodies also affect their ability to activate the complement. It is well known

A.K. and C.L. contributed equally to this work.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Dr. Olivier Thaumat, Service de Transplantation, Néphrologie et Immunologie Clinique, Hôpital Edouard Herriot, 5 Place d'Arsonval, 69003 Lyon, France, or Dr. Philippe Grimbert, Service de Néphrologie et de Transplantation, Hôpital Henri Mondor Hospital, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Creteil, France. Email: olivier.thaumat@chu-lyon.fr or philippe.grimbert@hmn.aphp.fr

Copyright © 2016 by the American Society of Nephrology

that IgG4 is much less effective than IgG1 and IgG3 in triggering the complement cascade. Strikingly, a recent study reported that DSA subclasses identify distinct phenotypes of kidney allograft AMR. In this study, IgG3 DSAs were associated with a shorter rejection time, increased microcirculation injury, and more C4d capillary deposition; in contrast, IgG4 correlated with later allograft injury.¹⁵

In contrast to acute AMR, activation of the classic complement pathway does not seem to be critical for the development of chronic AMR lesions. The first evidence supporting this concept was in the study by Colvin and coworkers,¹⁶ which transplanted immunodeficient RAG knockout mice with allogeneic heart. Colvin and coworkers¹⁶ observed that a passive transfer of noncomplement binding DSAs was sufficient enough to promote allograft vasculopathy. Innate immune cells, including neutrophils, macrophages, and NK cells, can bind to Fc fragments of antibodies and release lytic enzymes (a mechanism called antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity), which mediate smoldering endothelial cell damages. In turn, chronic vascular inflammation promotes the progressive development of typical vascular lesions (*i.e.*, transplant glomerulopathy, allograft vasculopathy, and lamination of the peritubular capillary basement membrane).

Current treatment protocols for AMR use permutations of a multi-pronged approach that include DSA removal with plasmapheresis, B or plasma cell depletion with anti-CD20 and proteasome inhibitors (PIs), respectively, and the blockade of antibody-mediated effector functions with intravenous Igs (IVIgs) or terminal complement pathway inhibitors.⁷ The 3-year graft survival rate with these protocols is <50%.¹⁷ Given the detrimental effect of DSAs on transplant survival and the lack of effective treatment to prevent the development of antibody-mediated lesions, the priority of clinicians in charge of recipients of solid organs should be primary prevention of DSA generation.

INCIDENCE AND RISK FACTORS FOR SENSITIZATION

The prevalence of *de novo* donor-specific antigens (dnDSAs) is generally between 5% and 10% at 1 year postrenal transplantation and slowly increases thereafter to 20% at 5 years.^{18–20} However, these percentages should be interpreted with caution. During the last 10 years, assays for the detection of anti-HLA antibodies have evolved from complement-dependent cytotoxicity to the highly sensitive microbead-based Luminex assay. Therefore, it is possible that DSAs identified in the post-transplant period could, in fact, be preformed DSAs that were not previously detected by the complement-dependent cytotoxicity assay. Furthermore, a negative pretransplant serum does not completely rule out the possibility that DSAs might be expressed in the context of B cell memory response. Indeed, using a novel HLA B Cell Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay, Lúcia *et al.*²¹ showed that, in 30% of patients, memory B cells could be detected in highly sensitized patients in the absence of corresponding anti-HLA antibodies in the circulation.

Risk factors for sensitization fall into two categories: either they increase graft immunogenicity or they increase the recipient immune system's ability to respond to allogeneic epitopes. Graft immunogenicity depends on both the quantity of allogeneic epitopes expressed by the graft (*i.e.*, the number of mismatched amino acid polymorphisms)²² and their nature.^{23,24} It is also possible that graft inflammation (either preexisting in extended criteria donors or secondary to ischemia-reperfusion injuries) could increase immunogenicity.²⁵ The ability of recipients' immune systems to respond to allogeneic epitopes is reflected in their pretransplant immunization status (*i.e.*, responses to previous challenges), acute cellular rejection episodes, and younger age, all of which have been consistently associated with increased risk of sensitization.^{19,26,27} Among the factors associated with post-transplant sensitization, therapeutic immunosuppression represents the most obvious modifiable risk factor. To optimize immunosuppressive strategies,

it is fundamental to take into account drug exposure evaluated by a pretransplant pharmacogenomics analysis and post-transplant pharmacokinetic monitoring. Indeed, the incidence of sensitization is dramatically increased in patients who are nonadherent.^{2,19} Moreover, strict monitoring of DSAs should be performed when clinical situations, such as infectious episodes, BK virus viremia,²¹ diarrhea, or cancer,²² lead to a reduction of immunosuppression. It is also noteworthy that death with a functional allograft is currently an important cause of graft loss. All recommendations regarding antirejection therapy must, therefore, take into account the related risk of overimmunosuppression and the benefit-to-risk ratio of all therapeutic decisions.²⁸ Finally, defining the best drug combination for primary prevention requires an understanding of B cell biology and the molecular mechanisms by which each drug interferes with dnDSA generation.

IMMUNE MECHANISMS UNDERLYING DSA GENERATION

DSAs are high-affinity IgGs directed against protein antigen. These characteristics imply that DSA generation results from a thymo-dependent B cell response. This type of humoral response, which develops within secondary lymphoid organs (spleen or lymph nodes), involves two distinct events that are separated both spatially and temporally²⁹ (Figure 1). B cell activation is initiated in the B cell area of secondary lymphoid organs by the binding of cognate antigen to surface B cell receptors (BCRs). This step is strengthened with the help of innate immune effectors. Macrophages of the subcapsular sinus capture lymph-borne antigens,³⁰ and the binding of these antigens to the surface Ig of the cognate B cells contributes to the establishment of the immunologic synapse between the B cells and the subcapsular sinus macrophages³⁰ (Figure 1, top panel). BCR crosslinking leads to the phosphorylation of immunoreceptor tyrosine-based activation motifs by the Src family kinase Lyn. This initiates the

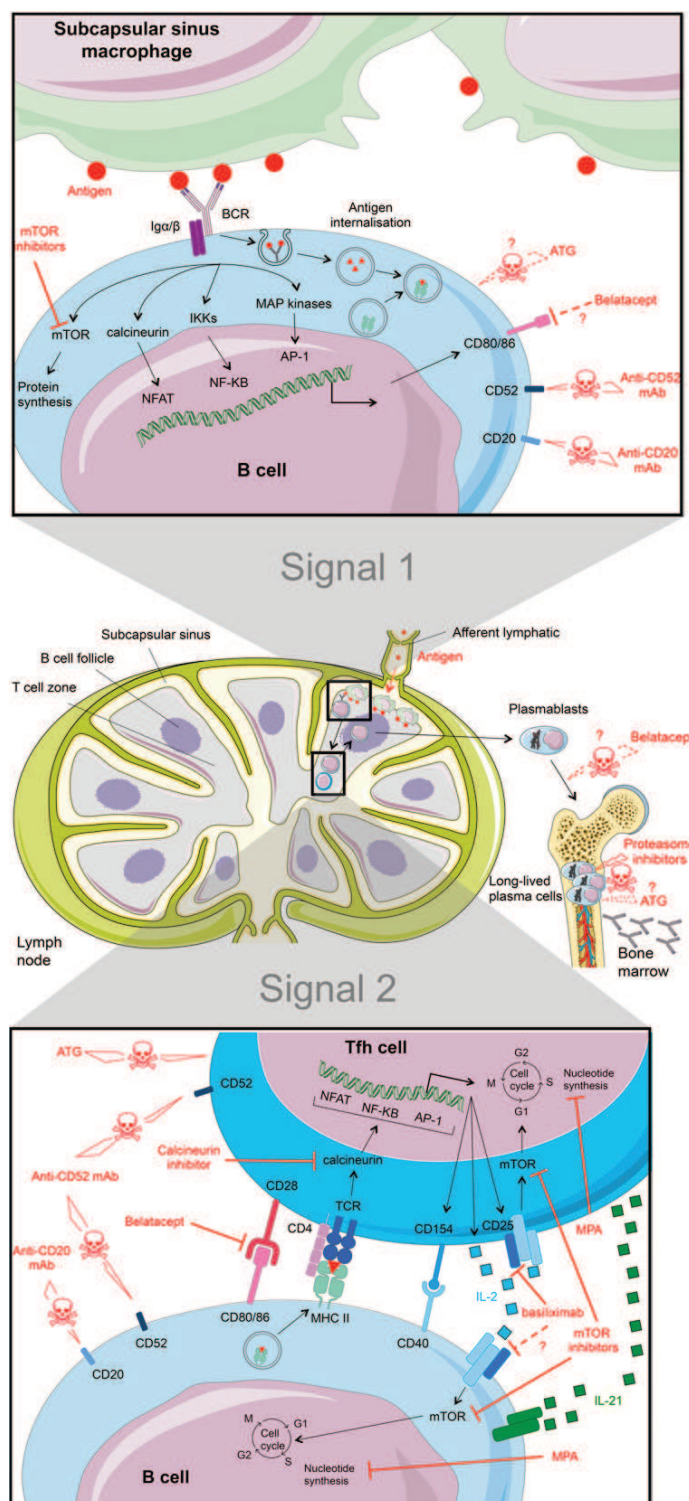


Figure 1. Key molecular steps of B cell activation and sites of action of immunosuppressive drugs. B cell activation is a two-step process. (Top panel) Binding of the cognate antigen to the surface Ig of B cells serves as the first signal of activation. BCR signaling drives the internalization of bound antigens (donor's HLA molecules) to endosomal compartments, where they are

formation of the signalosome, an assembly of intracellular signaling molecules that, together with adaptor molecules, are responsible for the coordinated regulation of downstream signaling pathways, including calcineurin and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways, and ultimately, modify the gene expression. Importantly, signaling BCR microclusters also associate with molecular motor dynein, which allows for the coordinated movement of antigen into the intracytoplasmic endosomal compartment of the B cell.^{29,31} Internalized antigen is processed and subsequently exposed on the B cell surface in association with MHC molecules.³² B cells that have received this first activation signal migrate toward the B zone-T zone boundary,³³ where they pair with a particular subset of cognate CD4⁺ T cells called T follicular helper (Tfh) cells³⁴ (Figure 1, bottom panel). This provides the second activation signal for B cells through cell surface costimulatory ligand interactions (especially CD40L) and directional cytokine production (in particular, IL-21).³⁴ The activated B cells enter the germinal center, where they proliferate. Their progenies go through repeated cycles of random somatic hypermutation of Ig variable regions driven by the enzyme activation-induced cytidine deaminase followed by selection of progressively higher-affinity mutants. Differentiation of some of these high-affinity mutants into plasma cells or memory B cells leads to the increased affinity of serum antibodies and the high affinity of the recall response.³⁵ Interestingly, recent evidence has shown that plasma cells and memory B cells generated by the germinal center reaction require additional helper signals from innate immune effectors, including eosinophils and basophils, to extend their lifespan in postgerminal center niches (summarized in ref. 36).

Recent data suggest that B cell functions are not restricted to the deleterious role of secreting dnDSAs.³⁷ In the inflammatory context, some B cell subsets have shown regulatory properties that rely on either secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10) and/or contact-dependent mechanisms. The

fine equilibrium between these two roles of B cells should also be taken into account when discussing immunosuppressive strategies.³⁸

Determining the actions of each immunosuppressive drug on B cell biology and their consequent effect on dnDSA production represents the first step in defining practical clinical immunosuppressive strategies.

EFFECT OF INDUCTION THERAPY ON DNDSA GENERATION

Rabbit antithymocyte globulin (ATG) is a mixture of polyclonal IgGs recovered from the sera of rabbits immunized with human thymocytes. The binding of antibodies to recipient's T lymphocytes results in complement- and/or antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity and an interaction with T cell surface antigens, possibly resulting in apoptosis or anergy (Figure 1). Interestingly, because certain epitopes are shared between T and B cells and because pediatric thymi also contain CD20⁺ B cells and CD138⁺ plasma cells, ATG contain IgGs directed against these latter subsets.³⁹ As a result, *in vitro* studies have shown that ATG induces apoptosis of naive, activated B cells and bone marrow resident plasma cells at clinically relevant concentrations (1–100 ng/ml).³⁹ However, the importance of ATG-induced plasma and/or B cell depletion *in vivo* has not been clearly shown.⁴⁰

An alternative to ATG as a depleting agent for induction is alemtuzumab, a humanized mAb directed against CD52, which is a protein widely distributed on the surface of lymphocytes and monocytes (but with an unknown function). Alemtuzumab induces rapid and profound B (and T) lymphocyte depletion⁴¹ (Figure 1). A recent study showed that, after this initial depletion, B cells repopulate the peripheral blood from 6 weeks

onward and exceed baseline levels after 6 months.⁴² Moreover, the composition of B cell subsets is altered compared with that found pretransplant; the levels of naïve and transitional B cells increase, whereas the absolute number of memory B cells decreases significantly.⁴² Interestingly, in organ transplantation, the composition of the B cell compartment is repeatedly identified as an important determinant for graft outcome.^{43,44} Heidt *et al.*⁴² suggested that lymphocyte depletion with alemtuzumab may skew the B cell compartment toward a protolerogenic profile. This hypothesis has been further strengthened by another work that showed that a significant expansion of regulatory-type B cells (defined as CD19⁺CD5⁺CD1d^{high}) is associated with superior graft function and that this pattern is more common after alemtuzumab induction.⁴⁵ However, although this hypothesis is interesting, it has been challenged by recent conflicting reports from two independent groups showing that alemtuzumab-induced B cell depletion/reconstitution is associated with a higher incidence of AMR compared with induction with ATG.^{46,47}

Basiliximab is a chimeric mouse-human nondepleting mAb targeting the α -chain (CD25) of the IL-2 receptor (Figure 1). Basiliximab was developed for induction therapy on the basis of the concept that it would block IL-2 binding, thereby inhibiting T cell proliferation. Interestingly, activated B cells also express CD25,⁴⁸ and IL-2 has a crucial role in driving the differentiation of activated B cells toward plasma cells *in vitro*.⁴⁸

In practice, ATG should be preferred in sensitized patients without DSAs, because two randomized clinical trials showed beneficial short-term effects on acute rejection, graft function, and survival (however, the relationship between induction immunosuppression,

dnDSAs, and AMR was not specifically addressed).^{49,50} In a more recent trial, Brokhof *et al.*⁵¹ reported in a cohort of 114 moderately sensitized recipients of deceased donor renal transplants that induction with ATG is associated with a reduction in the occurrence of dnDSAs and AMR compared with basiliximab. However, it should be noted that, in this study, (1) the difference became statistically different only at 3 years, (2) only a few patients assigned to basiliximab had a follow-up at 36 months, and (3) the patients who received ATG also received more plasmapheresis and IVIg than the patients who received rituximab. Finally, if ATG should be considered as the first-line induction therapy in previously sensitized patients, no data are available concerning a potential benefit of this induction strategy in non-sensitized recipients.

EFFECT OF MAINTENANCE IMMUNOSUPPRESSION ON DNDSA GENERATION

Corticosteroids

Corticosteroids are the oldest immune response-modifying drugs. Their mechanism of action is diverse and includes interference with intracellular transcription factors and signaling pathways of several surface receptors, including the T cell antigen receptor⁵² and downstream kinases.⁵³

High doses of corticosteroids (>1 mg/kg), used for induction therapy in transplantation, also induce lymphocyte apoptosis (including B cells)^{46,54} and can prevent *in vitro* differentiation of B cells into plasma cells.⁵⁵ High concentrations of corticosteroids are also likely to interfere with Fc γ -receptor signaling, including the inhibitory Fc γ -RIIb, which acts as a key negative modulator of B cell function and controls bone marrow plasma cell apoptosis.⁵⁶ The effect of a

processed. Selected peptides are then loaded onto recipient MHC class 2 molecules and presented on the B cell surface. (Bottom panel) B cells interact with cognate Tfh cells that provide the second costimulation signal for the completion of B cell activation. Therapies with proven efficiency are shown as red lines. Putative mechanisms of action are dashed red lines with question marks. TCR, T cell receptor.

standard maintenance dose of corticosteroid therapy on human B cells was studied in a seminal *in vitro* study by Cupps *et al.*⁵⁷ in the mid-1980s. Early events in B cell activation, such as anti-IgM-induced B cell activation and proliferation, are profoundly suppressed by corticosteroids.⁵⁷ To be effective, the corticosteroids have to be present in the culture during the first 24 hours, suggesting a drug-induced modulation of an early event.⁵⁷

Over the last decades, several attempts have been made to develop steroid-sparing strategies to avoid their important deleterious side effects. No increased risk in sensitization has been reported in patients without corticosteroids in a prospective single-center study on kidney transplantation⁵⁸ and two retrospective studies on liver transplantation.^{59,60} These encouraging results are also supported by the conclusions in the work by Delgado *et al.*,⁶¹ which randomized 37 recipients of kidney transplants with ATG induction, tacrolimus, and mycophenolic acid (MPA) for corticosteroid withdrawal 1 week post-transplantation. Delgado *et al.*⁶¹ did not observe any difference in dnDSA incidence at 5 years. However, because early steroid withdrawal is associated with a higher incidence of subclinical rejection and chronic graft injury in recipients with high immunologic risk, such as blacks,⁶² a steroid-sparing strategy should only be considered in selected recipients with low immunologic risk.

Calcineurin Inhibitors

It has been known since the mid-1990s that, similar to what happens in T cells, the engagement of BCR activates NFAT through a calcineurin-dependent pathway in B lymphocytes (Figure 1). The importance of this pathway for T cell-dependent humoral responses has been studied in mice, in which calcineurin was deleted specifically in B cells.⁶³ These mice had larger germinal centers, reduced plasma cell development, and lower antigen-specific antibody titers, indicating a block in plasma cell differentiation.⁶³ Although interesting, these experimental results cannot be directly translated into patients,

because calcineurin inhibitors (CNIs), in contrast with genetic deletion, do not completely suppress calcineurin activity in lymphocytes.⁶⁴ In fact, when Heidt *et al.*⁶⁵ tested the effect of CNIs in T and B cell cocultures, they observed that, whereas cyclosporin A (CsA) and tacrolimus were both capable of inhibiting Ig production when B cells were cultured with T cells that were not preactivated, they failed to do so when preactivated T cells were used to stimulate B cells. These results indicate that CNIs affect the humoral immune response of patients with transplants by interfering with T helper signals and not by targeting B cells directly.⁶⁵ This hypothesis is supported by the study by Struijk *et al.*,⁶⁶ which showed that patients with renal transplants who were stable on prednisolone plus CsA failed to develop antibodies against T cell-dependent model antigens but responded normally to T cell-independent antigens.

Some studies have reported that the use of CsA is associated with an increased risk of dnDSAs compared with tacrolimus,^{59,67} but this difference is not always found.⁵ The effect of the nature of CNIs (CsA or tacrolimus) on dnDSA occurrence is made difficult to assess because of the specific pharmacokinetic features of each molecule (including variance of oral bioavailability, action on enterohepatic circulation of MPA observed with CsA, and genetic polymorphisms of tacrolimus), which are likely to modify drug exposure. Finally, beyond the nature of the CNI, compliance¹⁹ and trough levels⁵⁹ have been established as the most important risk factors for sensitization of patients on CNI.

mTOR Inhibitors

Immunosuppressive drugs targeting the mTOR signaling pathway have been developed to avoid or reduce CNI-associated toxicity. Sirolimus and everolimus engage FK binding proteins, forming a complex that inhibits mTOR. This inhibition prevents the translation of mRNA-encoding proteins needed to enter the cell cycle⁶⁸ (thus reducing T cell proliferation) and cytokine production^{40,69} (Figure 1). Interestingly,

engagement of the BCR activates PI3K, which beyond activation of NF- κ B-dependent transcription, also initiates a distinct signaling pathway involving the Akt and mTOR serine/threonine kinases.⁷⁰

Surprisingly little is known about the functions of the mTOR complexes in B cells. Homozygous knockin mice for hypomorphic mTOR showed decreased ability to produce antibodies.⁶⁹ To determine whether these effects were caused by a direct mTOR blockade in the B cells or only reflected T cell deficiency, the same group examined the humoral responses in mTOR conditional B cell knockout mice.⁷¹ Mice with mTOR deleted in their B cell lineage produced fewer splenic germinal centers and also, exhibited a decrease in switched high-affinity antibody responses in contrast to their wild-type littermates.⁷¹ The fact that mTOR inhibitors are able to prevent the *in vitro* production of Ig with equal efficiency when human B cells are cultured with preactivated or not preactivated T cells further shows that mTOR inhibitors, in contrast with CNIs, have a direct effect on B cells.^{65,72} This concept is also validated by the results of a recent study that compared the effects of CNI and mTOR inhibitors on B cells from healthy volunteers. Only sirolimus was able to inhibit the proliferation of B cells and their differentiation into plasma cells. Interestingly, the effect of sirolimus seemed more pronounced on the CD19⁺CD27⁺ memory subset.⁷³

Several clinical studies have reported successful conversion to an mTOR inhibitor-based regimen.^{74–77} Although several of them showed a significant improvement in renal function after conversion to a CNI-free regimen, long-term data on the humoral response are limited. In the ZEUS Trial,⁷⁴ recipients of kidney transplants on CsA-based immunosuppression were randomized at 4 months post-transplantation to be either maintained on the same regimen or converted to everolimus-based immunosuppression. In a retrospective analysis of a subset of patients, Liefeldt *et al.*⁷⁸ reported that 23% of those receiving everolimus had developed dnDSAs compared with only

11% of those who were receiving CsA. This difference was, however, only observed when steroid withdrawal was allowed. In contrast, the 4-year report of the CONCEPT Trial⁷⁹ did not find significant difference in dnDSA incidence between patients switched to sirolimus at 3 months and the CsA controls (12% versus 21%; $P=0.24$). In line with these last reassuring results, a case-control study evaluating the effect of late conversion from CNi to everolimus (median of 22 months post-transplantation) also fails to show increased dnDSA incidence.⁸⁰ Finally, the question of whether mTOR inhibitors favor dnDSA emergence is still controversial. Available data suggest that conversion to mTOR inhibitors after complete CNi withdrawal is a potential risk factor, especially if it is made before the end of the first year and/or associated with steroid withdrawal.

Belatacept

Belatacept is a human fusion protein combining the extracellular portion of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4), which has been mutated to confer greater binding avidity to CD80 and CD86, and the constant region fragment of human IgG1. The CTLA4 binds surface costimulatory ligands (CD80 and CD86) of antigen-presenting cells, thus preventing their interaction with CD28 and thereby, blocking T cell activation⁸¹ (Figure 1).

The efficiency of belatacept in preventing dnDSA generation is generally attributed to its effect on T_H cells.⁸² B cells are, indeed, known to lack CD28, which has expression that is specifically repressed by the B cell master regulator gene *Pax-5*.⁸³ However, several experimental studies have shown the role of reverse signaling of CD80/CD86 in CTLA4-mediated coinhibition.⁸⁴ CTLA4-Ig binds to CD80/CD86 molecules on dendritic cells and promotes the induction of the immunomodulatory enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase^{85,86} and the tolerogenic molecule HLA-G.⁸⁷ Experimental data suggest that reverse signaling of CD80/CD86 also exists in B cells.^{88,89} It is, therefore, tempting to speculate that, when belatacept binds to CD80/CD86, it directly

influences the B cell fate. This mechanism could account for the recent observation that the frequency and absolute number of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells (a subset that has previously been associated with operational tolerance^{43,44}) are increased in patients on belatacept compared with controls on CNIs.⁹⁰

Most of the clinical data where belatacept was used come from two multinational phase 3 studies: the BENEFIT Trial and the BENEFIT-EXT Trial. The BENEFIT Trial studied patients who received a kidney from a living donor or a standard criteria deceased donor. The BENEFIT-EXT Trial, however, studied patients who received a kidney from an extended criteria deceased donor. In both studies, patients received corticosteroids and basiliximab for induction therapy intraoperatively and MPA and tapering doses of the steroid postoperatively. Results from these trials indicate that belatacept may have a paradoxical effect on T versus B cell-mediated alloimmune response. The BENEFIT Trial revealed surprisingly low rates (5%–6%) of dnDSA formation at 3 years, whereas the incidence of acute T cell-mediated rejection was markedly increased.⁹¹ Schwarz *et al.*⁹² performed a retrospective patient match analysis of 14 patients on belatacept originally enrolled in the phase 2 multicenter trial. Fifty-six patients treated with CsA were matched according to age at transplantation, first transplant/retransplant, and donor type. None of the patients treated with belatacept had DSAs ≥ 10 years post-transplantation compared with 38.5% of tested subjects treated with CsA ($P=0.05$).⁹² Although extremely promising, these results need to be confirmed through additional experimentation. It should also be remembered that part of the effect could be related to the fact that, in contrast with all other immunosuppressive drugs, belatacept is given intravenously monthly in an outpatient clinic, which could limit noncompliance, a major risk factor for dnDSA generation.^{2,19}

Purine Inhibitors

After signal 1 (BCR engagement) and signal 2 (provided by cognate T_H cells), B cells undergo massive proliferation,

which is crucial for the expansion of the rare antigen-specific clones and therefore, the development of humoral response. Azathioprine and mycophenolate mofetil (MPA) both block cell division by inhibiting DNA synthesis through two distinct mechanisms (Figure 1). Azathioprine is a prodrug for 6-mercaptopurine; its metabolites block purine synthesis enzymes and impede later steps of DNA synthesis by being incorporated into newly synthesized DNA. In contrast, MPA only acts as a selective inhibitor of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, a key enzyme in the *de novo* synthesis of purine. Therefore, MPA does not incorporate false purine analogs into DNA.

Adding MPA to primary human B cells stimulated *in vitro* with IL-21, anti-CD40, and anti-IgM or CpG-B inhibits B cell proliferation and the generation of antibody-producing plasma cells.⁹³ Similar findings have been reported in the T/B coculture model.^{65,72} As expected, however, the drug has no effect on terminally differentiated plasma cells,⁹³ suggesting that it can only prevent (but not cure) AMR.

Some clinical studies suggest that MPA might perform better than azathioprine in preventing dnDSA formation. For instance, two retrospective studies in kidney transplantation^{5,26} have reported that azathioprine is more frequently used than MPA among patients who develop dnDSAs. However, this difference, which was not observed in liver transplantation,⁵⁹ could also be explained by the dosage (or the nature) of other concomitant medications. In a study designed to determine the effect of immunosuppression on both naïve and memory humoral responses, Struijk *et al.*⁶⁶ reported that recipients of kidneys on prednisone combined with either CsA, MPA, or everolimus all generated significantly fewer antibodies during primary humoral responses compared with healthy controls. In contrast, when patients were tested for memory responses against the tetanus toxin, only patients on prednisone plus MPA showed impaired secondary humoral responses, suggesting that MPA could be of special interest in preventing

the rise of DSA titers in presensitized recipients.⁶⁶

In Clinical Practice

A maintenance immunosuppression strategy should be defined according to the level of the pretransplant sensitization status. A conventional strategy using CNI plus MPA and avoiding minimization in the absence of specific clinical indications should be chosen in sensitized recipients. In recipients with low immunologic risk, belatacept can now be considered as a promising alternative strategy in association with MPA and steroids. Regarding the other CNI-sparing strategies, mTOR inhibitors with MPA should not be considered as the first choice in either highly or moderately sensitized recipients. In recipients with low immunologic risk, the effect of both mTOR inhibitors (with or without low-dose CNI) as steroid-sparing strategies has to be clearly defined by additional analysis.

Maintenance immunosuppression should also be adapted to the results of clinical, pharmacologic, and immunologic monitoring. DSA monitoring should be performed at least once between 3 and 12 months after transplantation. An evaluation of DSAs should also be performed when a change of immunosuppressive regimen is considered and when nonadherence or graft rejection is suspected.⁹⁴ Detection of a significant level of dnDSAs should prompt verification of drug compliance, and pharmacokinetic analyses should be performed to ensure that drug exposure is within therapeutic ranges (in particular, in patients with therapeutic minimization).

THE EFFECT OF B OR PLASMA CELL-TARGETED THERAPY ON DSAS

Data on the effect of B or plasma cell-targeted therapy on the prevention *de novo* humoral allosensitization after kidney transplantation are scarce. These drugs have, indeed, mainly been used in the context of desensitization protocols or AMR treatment (two situations that are beyond

the scope of this review, because DSAs are present before drug administration). Another problem to determine their effect is the fact that these drugs were mostly used in combination with plasma exchanges and/or IVIg.⁹⁵

Rituximab is a chimeric depleting antibody directed against the B cell surface molecule CD20 that is not found on mature plasma cells (Figure 1). Thus, rituximab should not affect serum antibody titers directly. However, some studies have reported that prolonged B cell depletion with rituximab (in association with IVIg) could lead to a decrease in DSA titers in patients diagnosed with chronic AMR.^{96,97} A recent study also found significantly less HLA antibody rebound in patients treated with rituximab compared with a control cohort desensitized and transplanted without rituximab.⁹⁸ Compared with controls, patients treated with rituximab had a significantly greater mean reduction in DSA MFI but a similar rate of DSA persistence.⁹⁸ Some patients sensitized to HLA antigens do not have antibody present in serum before transplantation.^{21,97} Such patients are at risk for an anamnestic response resulting from a proinflammatory response to the trauma of transplant surgery. Elimination of HLA-specific memory B cells with rituximab in these patients successfully abrogated anamnestic response.⁹⁹ Regarding prevention of dnDSA generation with rituximab, a Japanese group has recently reported that dnDSA incidence is significantly lower in ABO-incompatible renal transplantations induced with rituximab.¹⁰⁰ Incidence of chronic AMR was also significantly reduced in the group of ABO-incompatible recipients who received induction therapy with rituximab or splenectomy compared with a control group of ABO-compatible recipients (without rituximab nor splenectomy). However, this beneficial effect of rituximab should be carefully interpreted, because it was not observed in a randomized, double-blind trial of rituximab induction for ABO-compatible renal transplantations.¹⁰¹

PIs deplete plasma cells in human transplant recipients and animal models

(Figure 1). In the context of AMR, PI seems to reduce the titers of immunodominant DSAs by 50%, especially in early AMR.¹⁰² A similar but transient reduction rate has also been observed for preformed anti-HLA antibodies in a prospective trial of PI-based desensitization.¹⁰³ Interestingly, Woodle *et al.*¹⁰³ also reported a low rate of dnDSA formation (12.5%) in patients who were desensitized.

CONCLUSION

The prevention of dnDSA generation is critical to the success of modern renal transplant practice. The depth of immunosuppression together with the nature of the drugs used play an important role in the success of the transplant. The data provided by clinical trials regarding the effect of therapeutic immunosuppression on the risk of developing dnDSAs are still limited, relatively recent, and considerably varied. This because of the rapid evolution of methods used to detect anti-HLA antibodies as well as the heterogeneity of monitoring and follow-up across centers. Nevertheless, these data together with the basic advances in our understanding of B cell biology provide a platform from which clinicians in charge of patients with transplants can now design immunosuppressive strategies tailored to the specific immunologic risk of each recipient.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

1. Einecke G, Sis B, Reeve J, Mengel M, Campbell PM, Hidalgo LG, Kaplan B, Halloran PF: Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant* 9: 2520–2531, 2009
2. Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, Hidalgo LG, Famulski K, Matas A, Halloran PF: Understanding the causes of kidney transplant failure: The dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant* 12: 388–399, 2012

3. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns J-P, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsicker L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nicleleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3: 708–714, 2003
4. Terasaki PI, Cai J: Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: From association to causation. *Transplantation* 86: 377–383, 2008
5. Terasaki PI, Ozawa M: Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: A prospective trial. *Am J Transplant* 4: 438–443, 2004
6. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, Colvin RB: Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* 8: 1662–1672, 2008
7. Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, Sicard A, Rabeyrin M, Morelon E, Dubois V, Thauinat O: Recent advances in renal transplantation: Antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Rep* 7: 51, 2015
8. Thauinat O, Graff-Dubois S, Fabien N, Duthéy A, Attuili-Audenis V, Nicoletti A, Patey N, Morelon E: A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int* 81: 207–219, 2012
9. Li L, Wadia P, Chen R, Kambham N, Naesens M, Sigdel TK, Miklos DB, Sarwal MM, Butte AJ: Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and “antibodyome” measures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 4148–4153, 2009
10. Olszewski WL, Engeset A, Lukasiewicz H: Immunoglobulins, complement and lysozyme in leg lymph of normal men. *Scand J Clin Lab Invest* 37: 669–674, 1977
11. Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, Scoazec JY, Bachelet T, Lepreux S, Visentin J, Merville P, Frémeaux-Bacchi V, Morelon E, Taupin J-L, Dubois V, Thauinat O: Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol* 26: 457–467, 2015
12. Diebold CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, Voorhorst M, Ugurlar D, Rosati S, Heck AJR, van de Winkel JGJ, Wilson IA, Koster AJ, Taylor RP, Saphire EO, Burton DR, Schuurman J, Gros P, Parren PWHI: Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science* 343: 1260–1263, 2014
13. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen J-P, Mooney N, Suberbielle C, Frémeaux-Bacchi V, Méjean A, Desgrandchamps F, Anglicheau D, Nochy D, Charron D, Empana J-P, Delahousse M, Legendre C, Glotz D, Hill GS, Zeevi A, Jouven X: Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med* 369: 1215–1226, 2013
14. Yell M, Muth BL, Kaufman DB, Djamali A, Ellis TM: C1q binding activity of de novo donor-specific HLA antibodies in renal transplant recipients with and without antibody-mediated rejection. *Transplantation* 99: 1151–1155, 2015
15. Lefaucheur C, Viglietti D, Bentlejewski C, Duong van Huyen JP, Vernerey D, Aubert O, Verine J, Jouven X, Legendre C, Glotz D, Loupy A, Zeevi A: IgG donor-specific anti-human HLA antibody subclasses and kidney allograft antibody-mediated injury. *J Am Soc Nephrol* 27: 293–304, 2016
16. Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB: Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant* 10: 510–517, 2010
17. Gupta G, Abu Jawdeh BG, Racusen LC, Bhasin B, Arend LJ, Trollinger B, Kraus E, Rabb H, Zachary AA, Montgomery RA, Alachkar N: Late antibody-mediated rejection in renal allografts: Outcome after conventional and novel therapies. *Transplantation* 97: 1240–1246, 2014
18. Everly MJ, Rebellato LM, Haisch CE, Ozawa M, Parker K, Briley KP, Catrou PG, Bolin P, Kendrick WT, Kendrick SA, Harland RC, Terasaki PI: Incidence and impact of de novo donor-specific alloantibody in primary renal allografts. *Transplantation* 95: 410–417, 2013
19. Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, Goldberg A, Birk PE, Rush DN, Nickerson PW: Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant* 12: 1157–1167, 2012
20. Rebellato LM, Everly MJ, Haisch CE, Ozawa M, Briley KP, Parker K, Catrou PG, Bolin P, Kendrick WT, Kendrick SA, Harland RC: A report of the epidemiology of de novo donor-specific anti-HLA antibodies (DSA) in “low-risk” renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2011: 337–340, 2011
21. Lúcia M, Luque S, Crespo E, Melilli E, Cruzado JM, Martorell J, Jarque M, Gil-Vernet S, Manonelles A, Grinyó JM, Bestard O: Preformed circulating HLA-specific memory B cells predict high risk of humoral rejection in kidney transplantation. *Kidney Int* 88: 874–887, 2015
22. Duquesnoy RJ: HLA epitope based matching for transplantation. *Transpl Immunol* 31: 1–6, 2014
23. Kosmoliaptis V, Chaudhry AN, Sharples LD, Halsall DJ, Dafforn TR, Bradley JA, Taylor CJ: Predicting HLA class I alloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 88: 791–798, 2009
24. Kosmoliaptis V, Sharples LD, Chaudhry AN, Halsall DJ, Bradley JA, Taylor CJ: Predicting HLA class II alloantigen immunogenicity from the number and physiochemical properties of amino acid polymorphisms. *Transplantation* 91: 183–190, 2011
25. Fuquay R, Renner B, Kulik L, McCullough JW, Amura C, Strassheim D, Pelanda R, Torres R, Thurman JM: Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *J Am Soc Nephrol* 24: 1063–1072, 2013
26. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, Dantal J, Giral M, Blanco G, Cantarovich D, Karam G, Follea G, Souillou JP, Bignon JD: Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 16: 2804–2812, 2005
27. Chemouny J-M, Suberbielle C, Rabant M, Zuber J, Alyanakian M-A, Lebreton X, Carmagnat M, Pinheiro N, Loupy A, Van Huyen J-P, Timsit M-O, Charron D, Legendre C, Anglicheau D: De novo donor-specific human leukocyte antigen antibodies in nonsensitized kidney transplant recipients after T cell-mediated rejection. *Transplantation* 99: 965–972, 2015
28. Thauinat O: Finding the safe place between the hammer and the anvil: Sounding the depth of therapeutic immunosuppression. *Kidney Int* 88: 1226–1228, 2015
29. Thauinat O, Granja AG, Barral P, Filby A, Montaner B, Collinson L, Martinez-Martin N, Harwood NE, Bruckbauer A, Batista FD: Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity. *Science* 335: 475–479, 2012
30. Harwood NE, Batista FD: Early events in B cell activation. *Annu Rev Immunol* 28: 185–210, 2010
31. Schnyder T, Castello A, Feest C, Harwood NE, Oellerich T, Urlaub H, Engelke M, Wienands J, Bruckbauer A, Batista FD: B cell receptor-mediated antigen gathering requires ubiquitin ligase Cbl and adaptors Grb2 and Dok-3 to recruit dynein to the signaling microcluster. *Immunity* 34: 905–918, 2011
32. Lanzavecchia A: Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314: 537–539, 1985
33. Okada T, Miller MJ, Parker I, Krummel MF, Neighbors M, Hartley SB, O’Garra A, Cahalan MD, Cyster JG: Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol* 3: e150, 2005

34. Crotty S: A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 15: 185–189, 2015
35. Victora GD: SnapShot: The germinal center reaction. *Cell* 159: 700–700.e1, 2014
36. Cerutti A, Puga I, Cols M: New helping friends for B cells. *Eur J Immunol* 42: 1956–1968, 2012
37. Stolp J, Turka LA, Wood KJ: B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 10: 389–397, 2014
38. Thauvat O, Morelon E, Defrance T: Am⁺B⁺valent: Anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. *Blood* 116: 515–521, 2010
39. Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, Bozorgzadeh A, Sanz I, Briggs BJ: Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* 79: 1507–1515, 2005
40. Morelon E, Lefrançois N, Besson C, Prévautel J, Brunet M, Touraine J-L, Badet L, Touraine-Moulin F, Thauvat O, Malcus C: Preferential increase in memory and regulatory subsets during T-lymphocyte immune reconstitution after Thymoglobulin induction therapy with maintenance sirolimus vs cyclosporine. *Transpl Immunol* 23: 53–58, 2010
41. Lee F, Luevano M, Veys P, Yong K, Madrigal A, Shaw BE, Saudemont A: The effects of CAMPATH-1H on cell viability do not correlate to the CD52 density on the cell surface. *PLoS One* 9: e103254, 2014
42. 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* 12: 1784–1792, 2012
43. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miquieu 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, Gerstmayr B, Bourcier R, Sharif A, Krajewska M, Lord G, Roberts I, Goldman M, Wood KJ, Newell K, Seyfert-Margolis V, Warrens AN, Janssen U, Volk H-D, Souillou J-P, Hernandez-Fuentes MP, Lechler RI: Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 120: 1848–1861, 2010
44. 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, Souillou J-P, 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* 78: 503–513, 2010
45. Cherukuri A, Salama AD, Carter C, Smalle N, McCurtin R, Hewitt EW, Hernandez-Fuentes M, Clark B, Baker RJ: An analysis of lymphocyte phenotype after steroid avoidance with either alemtuzumab or basiliximab induction in renal transplantation. *Am J Transplant* 12: 919–931, 2012
46. Todeschini M, Cortinovis M, Perico N, Poli F, Innocente A, Cavinato RA, Gotti E, Ruggerenti P, Gaspari F, Noris M, Remuzzi G, Casiraghi F: In kidney transplant patients, alemtuzumab but not basiliximab/low-dose rabbit anti-thymocyte globulin induces B cell depletion and regeneration, which associates with a high incidence of de novo donor-specific anti-HLA antibody development. *J Immunol* 191: 2818–2828, 2013
47. Noureldeen T, Albekioni Z, Machado L, Muddana N, Marcus RJ, Hussain SM, Sureshkumar KK: Alemtuzumab induction and antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplant Proc* 46: 3405–3407, 2014
48. Le Gallou S, Caron G, Delalay C, Rossille D, Tarte K, Fest T: IL-2 requirement for human plasma cell generation: Coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *J Immunol* 189: 161–173, 2012
49. Thibaudin D, Alamartine E, de Filippis JP, Diab N, Laurent B, Berthoux F: Advantage of antithymocyte globulin induction in sensitized kidney recipients: A randomized prospective study comparing induction with and without antithymocyte globulin. *Nephrol Dial Transplant* 13: 711–715, 1998
50. Noël C, Abramowicz D, Durand D, Mourad G, Lang P, Kessler M, Charpentier B, Touchard G, Berthoux F, Merville P, Ouali N, Squifflet J-P, Bayle F, Wissing KM, Hazzan M: Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 20: 1385–1392, 2009
51. Brokhof MM, Sollinger HW, Hager DR, Muth BL, Pirsch JD, Fernandez LA, Bellingham JM, Mezrich JD, Foley DP, D'Alessandro AM, Odorico JS, Mohamed MA, Vidyasagar V, Ellis TM, Kaufman DB, Djamali A: Antithymocyte globulin is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation* 97: 612–617, 2014
52. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O: Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193: 803–814, 2001
53. Löwenberg M, Tuynman J, Bilderbeek J, Gaber T, Buttgerit F, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D: Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn. *Blood* 106: 1703–1710, 2005
54. Lill-Elghanian D, Schwartz K, King L, Fraker P: Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 763–770, 2002
55. Haneda M, Owaki M, Kuzuya T, Iwasaki K, Miwa Y, Kobayashi T: Comparative analysis of drug action on B-cell proliferation and differentiation for mycophenolic acid, everolimus, and prednisolone. *Transplantation* 97: 405–412, 2014
56. Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KGC: FcγRIIb controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nat Immunol* 8: 419–429, 2007
57. Cupps TR, Gerrard TL, Falkoff RJ, Whalen G, Fauci AS: Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Clin Invest* 75: 754–761, 1985
58. Lachmann N, Terasaki PI, Schönemann C: Donor-specific HLA antibodies in chronic renal allograft rejection: A prospective trial with a four-year follow-up. *Clin Transpl* 2006: 171–199, 2006
59. Kaneku H, O'Leary JG, Banuelos N, Jennings LW, Susskind BM, Klintmalm GB, Terasaki PI: De novo donor-specific HLA antibodies decrease patient and graft survival in liver transplant recipients. *Am J Transplant* 13: 1541–1548, 2013
60. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Muscare F, Lavayssière L, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Guitard J, Dörr G, Suc B, Duffas JP, Alric L, Bureau C, Danjoux M, Guilbeau-Frugier C, Blancher A, Rostaing L, Kamar N: Prevalence, incidence and risk factors for donor-specific anti-HLA antibodies in maintenance liver transplant patients. *Am J Transplant* 14: 867–875, 2014
61. Delgado JC, Fuller A, Ozawa M, Smith L, Terasaki PI, Shihab FS, Eckels DD: No occurrence of de novo HLA antibodies in patients with early corticosteroid withdrawal in a 5-year prospective randomized study. *Transplantation* 87: 546–548, 2009
62. Anil Kumar MS, Irfan Saeed M, Ranganna K, Malat G, Sustento-Reodica N, Kumar AMS, Meyers WC: Comparison of four different immunosuppression protocols without long-term steroid therapy in kidney recipients monitored by surveillance biopsy: Five-year outcomes. *Transpl Immunol* 20: 32–42, 2008
63. Winslow MM, Gallo EM, Neilson JR, Crabtree GR: The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity* 24: 141–152, 2006
64. Jørgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N: Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol* 57: 93–98, 2003
65. Heidt S, Roelen DL, Eijssink C, Eikmans M, van Kooten C, Claas FHJ, Mulder A: Calcineurin inhibitors affect B cell antibody responses indirectly by interfering with T

- cell help. *Clin Exp Immunol* 159: 199–207, 2010
66. Struijk GH, Minnee RC, Koch SD, Zwinderman AH, van Donselaar-van der Pant KAMI, Idu MM, ten Berge IJM, Bemelman FJ: Maintenance immunosuppressive therapy with everolimus preserves humoral immune responses. *Kidney Int* 78: 934–940, 2010
 67. Huang Y, Ramon D, Luan FL, Sung R, Samaniego M: Incidences of preformed and de novo donor-specific HLA antibodies and their clinicohistological correlates in the early course of kidney transplantation. *Clin Transpl* 2012: 247–256, 2012
 68. Kahan BD, Chang JY, Sehgal SN: Preclinical evaluation of a new potent immunosuppressive agent, rapamycin. *Transplantation* 52: 185–191, 1991
 69. Zhang S, Readinger JA, DuBois W, Janka-Junttila M, Robinson R, Pruitt M, Bliskovsky V, Wu JZ, Sakakibara K, Patel J, Parent CA, Tessarollo L, Schwartzberg PL, Mock BA: Constitutive reductions in mTOR alter cell size, immune cell development, and antibody production. *Blood* 117: 1228–1238, 2011
 70. Limon JJ, Fruman DA: Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front Immunol* 3: 228, 2012
 71. Zhang S, Pruitt M, Tran D, Du Bois W, Zhang K, Patel R, Hoover S, Simpson RM, Simmons J, Gary J, Snapper CM, Casellas R, Mock BA: B cell-specific deficiencies in mTOR limit humoral immune responses. *J Immunol* 191: 1692–1703, 2013
 72. Matz M, Lehnert M, Lorkowski C, Fabritius K, Unterwalder N, Doueiri S, Weber UA, Mashreghi M-F, Neumayer H-H, Budde K: Effects of sotrastaurin, mycophenolic acid and everolimus on human B-lymphocyte function and activation. *Transpl Int* 25: 1106–1116, 2012
 73. Traitanon O, Mathew JM, La Monica G, Xu L, Mas V, Gallon L: Differential effects of tacrolimus versus sirolimus on the proliferation, activation and differentiation of human B cells. *PLoS One* 10: e0129658, 2015
 74. Budde K, Becker T, Arns W, Sommerer C, Reinke P, Eisenberger U, Kramer S, Fischer W, Gschaidmeier H, Pietruck F; ZEUS Study Investigators: Everolimus-based, calcineurin-inhibitor-free regimen in recipients of de-novo kidney transplants: An open-label, randomised, controlled trial. *Lancet* 377: 837–847, 2011
 75. Lebranchu Y, Thierry A, Toupance O, Westeel PF, Etienne I, Thervet E, Moulin B, Frouget T, Le Meur Y, Glotz D, Heng A-E, Onno C, Buchler M, Girardot-Seguin S, Hurault de Ligny B: Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: Concept study. *Am J Transplant* 9: 1115–1123, 2009
 76. Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L, Shidban H, Waid TH, Preston D, Kalil RN, Pearson TC: Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: A randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int* 79: 897–907, 2011
 77. Guba M, Pratschke J, Hugo C, Krämer BK, Nohr-Westphal C, Brockmann J, Andrassy J, Reinke P, Pressmar K, Hakenberg O, Fischereder M, Pascher A, Illner W-D, Banas B, Jauch K-W; SMART-Study Group: Renal function, efficacy, and safety of sirolimus and mycophenolate mofetil after short-term calcineurin inhibitor-based quadruple therapy in de novo renal transplant patients: One-year analysis of a randomized multicenter trial. *Transplantation* 90: 175–183, 2010
 78. Liefeldt L, Brakemeier S, Glander P, Waiser J, Lachmann N, Schönemann C, Zukunft B, Illigens P, Schmidt D, Wu K, Rudolph B, Neumayer H-H, Budde K: Donor-specific HLA antibodies in a cohort comparing everolimus with cyclosporine after kidney transplantation. *Am J Transplant* 12: 1192–1198, 2012
 79. Lebranchu Y, Thierry A, Thervet E, Büchler M, Etienne I, Westeel PF, Hurault de Ligny B, Moulin B, Rérolle JP, Frouget T, Girardot-Seguin S, Toupance O: Efficacy and safety of early cyclosporine conversion to sirolimus with continued MMF-four-year results of the Postconcept study. *Am J Transplant* 11: 1665–1675, 2011
 80. Kamar N, Del Bello A, Congy-Jolivet N, Guilbeau-Frugier C, Cardeau-Desangles I, Fort M, Esposito L, Guitard J, Gamé X, Rostaing L: Incidence of donor-specific antibodies in kidney transplant patients following conversion to an everolimus-based calcineurin inhibitor-free regimen. *Clin Transplant* 27: 455–462, 2013
 81. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanco G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B; Belatacept Study Group: Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 353: 770–781, 2005
 82. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, Hong JJ, Farris AB 3rd, Iwakoshi NN, Villinger F, Kirk AD, Knechtle SJ: Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 14: 59–69, 2014
 83. Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M: Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 24: 269–281, 2006
 84. Chen L: Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 336–347, 2004
 85. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P: CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3: 1097–1101, 2002
 86. Munn DH, Sharma MD, Mellor AL: Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 172: 4100–4110, 2004
 87. Bahri R, Naji A, Menier C, Charpentier B, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Durrbach A: Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: Implication in human renal transplant acceptance. *J Immunol* 183: 7054–7062, 2009
 88. Rau FC, Dieter J, Luo Z, Priest SO, Baumgarth N: B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion. *J Immunol* 183: 7661–7671, 2009
 89. Kin NW, Sanders VM: CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. *J Immunol* 179: 1516–1523, 2007
 90. Leibler C, Maignon M, Pilon C, Montespan F, Bigot J, Lang P, Carosella ED, Cohen J, Rouas-Freiss N, Grimbirt P, Menier C: Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naïve and transitional B cells. *Am J Transplant* 14: 1173–1182, 2014
 91. Vincenti F, Tedesco Silva H, Busque S, O'Connell P, Friedewald J, Cibrik D, Budde K, Yoshida A, Cohnsey S, Weimar W, Kim YS, Lawendy N, Lan S-P, Kudlacz E, Krishnaswami S, Chan G: Randomized phase 2b trial of tofacitinib (CP-690,550) in de novo kidney transplant patients: Efficacy, renal function and safety at 1 year. *Am J Transplant* 12: 2446–2456, 2012
 92. Schwarz C, Mayerhoffer S, Berlakovich GA, Steininger R, Soliman T, Watschinger B, Böhmig GA, Eskandary F, König F, Mühlbacher F, Wekerle T: Long-term outcome of belatacept therapy in de novo kidney transplant recipients - a case-match analysis. *Transpl Int* 28: 820–827, 2015
 93. Karnell JL, Karnell FG 3rd, Stephens GL, Rajan B, Morehouse C, Li Y, Swerdlow B, Wilson M, Goldbach-Mansky R, Groves C, Coyle AJ, Herbst R, Ettinger R: Mycophenolic acid differentially impacts B cell function depending on the stage of differentiation. *J Immunol* 187: 3603–3612, 2011
 94. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, Reed EF, Bray RA, Campbell P, Chapman JR, Coates PT, Colvin RB, Cozzi E, Doxiadis IIN, Fuggle SV, Gill J, Glotz D, Lachmann N, Mohanakumar T, Suciu-Foca N, Sumitran-Holgersson S, Tanabe K, Taylor CJ, Tyan DB, Webster A, Zeevi A, Opelz G: Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA

- antibodies in transplantation. *Transplantation* 95: 19–47, 2013
95. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai C-H, Peng A, Villicana R, Jordan SC: Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med* 359: 242–251, 2008
 96. Clatworthy MR: B-cell regulation and its application to transplantation. *Transpl Int* 27: 117–128, 2014
 97. Fehr T, Rüsi B, Fischer A, Hopfer H, Wüthrich RP, Gaspert A: Rituximab and intravenous immunoglobulin treatment of chronic antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplantation* 87: 1837–1841, 2009
 98. Jackson AM, Kraus ES, Orandi BJ, Segev DL, Montgomery RA, Zachary AA: A closer look at rituximab induction on HLA antibody rebound following HLA-incompatible kidney transplantation. *Kidney Int* 87: 409–416, 2015
 99. Zachary AA, Lucas DP, Montgomery RA, Leffell MS: Rituximab prevents an anamnestic response in patients with cryptic sensitization to HLA. *Transplantation* 95: 701–704, 2013
 100. Kohei N, Hirai T, Omoto K, Ishida H, Tanabe K: Chronic antibody-mediated rejection is reduced by targeting B-cell immunity during an introductory period. *Am J Transplant* 12: 469–476, 2012
 101. Tydén G, Ekberg H, Tufveson G, Mjörnstedt L: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of single dose rituximab as induction in renal transplantation: A 3-year follow-up. *Transplantation* 94: e21–e22, 2012
 102. Walsh RC, Alloway RR, Gimita AL, Woodle ES: Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int* 81: 1067–1074, 2012
 103. Woodle ES, Shields AR, Ejaz NS, Sadaka B, Gimita A, Walsh RC, Alloway RR, Brailey P, Cardi MA, Abu Jawdeh BG, Roy-Chaudhury P, Govil A, Mogilishetty G: Prospective iterative trial of proteasome inhibitor-based desensitization. *Am J Transplant* 15: 101–118, 2015

II. ANNEXE 2 : Augmentation de fréquence des LB naïfs et transitionnels chez les patients transplantés rénaux après traitement par Belatacept (Article)

Brief Communication

Kidney Transplant Recipients Treated With Belatacept Exhibit Increased Naïve and Transitional B Cells

C. Leibler^{1,2}, M. Matignon^{1,2}, C. Pilon²,
F. Montespan^{3,4}, J. Bigot², P. Lang^{1,2},
E. D. Carosella^{3,4}, J. Cohen², N. Rouas-Freiss^{3,4},
P. Grimbert^{1,2,*} and C. Menier^{3,4}

¹Nephrology and Transplantation Department, CHU Henri Mondor, APHP, Créteil, France

²Unité Inserm U955, équipe 21 and CIC Biothérapies 504, CHU Henri Mondor, APHP, Paris XII University, Créteil, France

³CEA, IMETI, Service de Recherches en Hématologie (SRHI), Paris, France

⁴UMR_E5, Université Paris-Diderot-Paris-7, Institut Universitaire d'Hématologie (IUH), Hôpital Saint-Louis, Paris, France

*Corresponding author: Philippe Grimbert, philippe.grimbert@hmn.aphp.fr

Present address: CEA Saclay DSV/Institut de biologie et de technologies de Saclay (iBiTec-S)/SIMOPRO/LCV, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.

Marie Matignon and Caroline Pilon contributed equally to this work.

Catherine Menier and Philippe Grimbert contributed equally to this work.

Phase III clinical studies have shown that kidney transplant (KT) recipients treated with the costimulation blocker Belatacept exhibited a better renal allograft function and lower donor-specific anti-HLA immunization when compared to recipients treated with calcineurin inhibitors (CNI). We analyzed B cell phenotype in KT recipients treated with Belatacept and stable renal function (N = 13). Results were compared to those observed in stable patients treated with CNI (N = 12), or with chronic antibody-mediated rejection (N = 5). Both transcriptional profile and phenotypic characterization of peripheral B cells were performed by real-time polymerase chain reaction and flow cytometry, respectively. In Belatacept group, the frequency and absolute number of transitional B cells as defined by both phenotypes: CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} and CD19⁺IgD^{hi}CD38^{hi}CD27⁺, as well as naïve B cells were significantly higher compared with CNI group. B cell activating factor (BAFF) and BAFF receptor mRNA levels were significantly lower in Belatacept group than in CNI group. These results show for the first time that Belatacept influences B cell compartment by favoring the occurrence of transitional B cells with potential regulatory properties, as described in operational tolerant patients. This role may explain the lower

alloimmunization rate observed in Belatacept-treated patients.

Keywords: BAFF, BAFF-R, Belatacept, CTLA-4-Ig, kidney transplantation, transitional B cells

Abbreviations: APRIL, A proliferating inducing ligand; BAFF, B cell activating factor; BAFF-R, BAFF receptor; BANK1, B cell scaffold protein ankyrin repeats 1; BCMA, B cell maturation protein; CNI, calcineurin inhibitors; CR, chronic antibody-mediated rejection; DC, dendritic cells; DSA, donor-specific alloantibodies; KT, kidney transplant; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR; sHLA-G, soluble HLA-G; TACI, transmembrane activator and CAML interactor

Received 13 November 2013, revised 05 February 2014 and accepted for publication 24 February 2014

Introduction

Extensive studies carried out in the recent years have clearly highlighted the importance of humoral immunity as a major component of the alloimmune response in the field of solid organ transplantation. Actually, the production of donor-specific alloantibodies (DSA) after transplantation is clearly involved in both acute and chronic graft injury, and graft lost (1–3). By contrast, recent data have also suggested that B cells could play a role in operational tolerance. Indeed, a B cell signature has been identified in two distinct cohorts of tolerant kidney transplant (KT) recipients (4,5). Such signature includes an increase in naïve and transitional B cells with potential regulatory properties, when compared to KT recipients with stable graft function or with biopsy-proven chronic rejection. Thus and as previously established in the field of cellular alloimmune response, the belief is currently emerging that the outcome of allograft response–rejection or tolerance after transplantation could be in part determined by the balance between DSA-producing to tolerogenic B cells. In this context, monitoring B cell phenotype could be of importance to both analyze and better predict the characteristics of the humoral alloimmune response. Moreover, the influence of immunosuppressive drugs on the B cell compartment should now be taken into account in order to define the most protective strategy against B cell-mediated injury.

Leibler et al

Belatacept, a first-in-class selective costimulation blocker, inhibits the interaction between CD80/CD86 and CD28 preventing T cell activation. This drug is currently designed in solid organ transplantation to provide effective immunosuppression while avoiding both the renal and nonrenal toxicities associated with calcineurin inhibitors (CNI). Belatacept was approved by the US Food and Drug Administration in June 2011 based on the 3-year results of two open-label, randomized, multicenter Phase III trials. These studies compared a more or less intensive regimen of Belatacept to cyclosporine in patients receiving a KT from either living or standard criteria deceased donors (BENEFIT) or extended-criteria deceased donors (BENEFIT-EXT) (6,7). The 3-year results demonstrated comparable patient and graft survival between Belatacept and cyclosporine with better renal function despite higher rates and grades of early (within 6 months) T cell-mediated acute rejection (8,9). However, acute rejection in patients receiving Belatacept was not typically associated with DSA (9,10). In contrast, cyclosporine was more frequently associated with the development of DSA (7).

Taking also into account that the engagement of CD28 on plasma cells (11) with CD80/CD86 induces antibody secretion (12,13), we therefore hypothesized that Belatacept influences B cell compartment. We report here the first B cell phenotype analysis in KT recipients who had stable renal function treated with Belatacept as maintained immunosuppression.

Materials and Methods

Patients and study design

The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. All participating patients gave written informed consent. A total of 30 first KT recipients were included for this study. Detailed clinical data are presented in Table 1. Blood samples were obtained from patients with the following status at the time of blood collection:

- (1) First kidney recipients with stable graft function treated with Belatacept (Bristol-Myers Squibb [BMS] Company, New York, NY), mycophenolate mofetil and steroids ($n = 13$; Belatacept). We picked out patients from Phases II ($n = 1$) and III ($n = 10$) clinical studies cohorts (BMS) and local cohort treated after full market approval ($n = 2$). These patients have had stable renal function (GFR) as estimated by MDRD formula, nonsignificant proteinuria and no acute rejection within the year before inclusion. Four patients have presented an acute T cell-mediated rejection episode, all were treated with high doses of steroids alone and none was classified as resistant (resistant if the estimated GFR level did not return to within 15% of the baseline within 2 weeks after initiation of antirejection treatment). Time between acute rejection and blood collection was 45 (23–110) months. Nineteen samples were analyzed from the 13 patients. Time between transplantation and sample analysis ranged between 12 and 113 months.
- (2) First kidney recipients with stable graft function treated with CNI, mycophenolate mofetil and/or steroids (CNI; $n = 12$). Patients were selected from our database and closely matched to Belatacept patients on the basis of date of transplantation, age, number of HLA mismatches, sensitization status at the time of renal transplant, donor

type and age, induction and maintenance immunosuppressive treatment. All patients have had stable renal function, nonsignificant proteinuria and no acute rejection within the year before inclusion. Two patients have an acute T cell-mediated rejection episode both 1 month after transplantation. Both episodes were sensitive to high dose of steroids. Blood samples were collected 67 and 84 months after acute T cell-mediated rejection episode. Fourteen samples were analyzed from the 12 patients.

- (3) First KT recipients with chronic antibody-mediated rejection (CR; $n = 5$). All CR were biopsy proven and presented histological evidences of chronic tissue injury (i.e. allograft glomerulopathy (cg) and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy (ci+ct) and/or fibrous intimal thickening in arteries (cv) associated with the presence of C4d and DSA) (14). DSA were not detected in two patients. We chose patients closest to the stables treated with Belatacept or CNI on the basis of date of kidney transplantation, age, donor type and age and immunosuppressive regimen. Patients treated with Rituximab within 1 year before blood collections were excluded. Time between diagnosis of CR and sampling for the studies ranged from 1 to 8 months. Three patients from the five included were treated for at least one episode of acute antibody-mediated rejection, respectively, 4, 3 and 2 years before the diagnosis of CR. Treatment included in all patients plasmapheresis, intravenous immunoglobulins and high doses of steroids, and Rituximab in two.

Cell isolation and flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation. Total B cells from freshly isolated PBMC were purified by negative selection using the B cell isolation kit II for magnetic cell separation (MACS system; Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). PBMC and purified B cells were stained according to standard protocols using the following mAbs purchased from Beckman-Coulter (Villepinte, France), unless otherwise specified: CD3-ECD, CD19-ECD or CD19-PECy5, CD138-PE, CD24-FITC (BD Pharmingen [Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France]), CD38-ECD, CD27-PE, IgD-FITC, CD5-FITC (EXBIO Praha, a.s. Vestec, Czech Republic), CD1d-PE (BD Pharmingen) alongside isotype-matched controls. CD45-FITC, -PE, -ECD and -PECy5 were used to perform fluorescence signal compensation. Cells (2×10^5 to 4×10^5) were analyzed using EPICS™ XL4 flow cytometer (Beckman-Coulter). CD4-FITC, CD127-PE and CD25-PECy5 were used to stain T cells.

Messenger RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction

Messenger RNA was extracted from 5×10^6 PBMC using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions for nine patients from the Belatacept group and nine from the CNI group. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Qiagen). Total RNA was reverse transcribed to complementary DNA using reverse transcription reagents (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using commercially available primer and probe sets (Applied Biosystems, Foster City, CA): HPRT: Hs99999909_m1, CD19: Hs00174333_m1, CD32a: Hs00234969_m1, CD32b: Hs00269610_m1, BANK1: Hs00215678_m1, BAFF-R: Hs00606874_g1, BAFF: Hs00198106_m1, APRIL: Hs00601664_g1, TACI: Hs00963364_m1, BCMA: Hs03045080_m1. We used $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method to figure out relative expression of RNAs between a sample and a reference. All samples were tested in duplicates in 96-well plates with the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems). HPRT and CD19 were used as endogenous controls to normalize RNA amounts.

Statistics

Quantitative variables are presented as means (SD) and medians with range (min-max) values, according to the distribution of the variable concerned. Qualitative values are expressed as percentages. Stable KT groups were

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

Table 1: Clinical characteristics

Variables	Stable graft function		p-Value ¹	Chronic antibody-mediated rejection (CR)
	Belatacept	CNI		
Patients, N	13	12		5
Samples,				
Early analysis, N	13	12	—	5
Delay from renal transplant, months, mean (SD) ²	64 ± 25	71 ± 27	0.49	149 ± 126
Late analysis, N	7	2	—	0
Delay from renal transplant, months, mean (SD)	87 ± 4	90 ± 1	0.30	—
At the time of transplantation				
Sex (male/female), N	10/3	11/1	0.59	2/3
Recipient age, years, mean (SD)	50 ± 15	51 ± 17	0.89	46 ± 20
Donor age, years, mean (SD)	55 ± 14	56 ± 13	0.84	56 ± 24
Living/deceased donor, N	0/13	2/10	0.48	0/5
Donor-specific alloantibodies, N	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)
HLA mismatches, mean (SD)	3.4 ± 1	2.9 ± 1	0.27	2.4 ± 1.6
Cold ischemia time, min, mean (SD)	1291 ± 543	1138 ± 339	0.45	1149 ± 141
Cause of end-stage kidney disease, N (%)				
Glomerulonephritis	6 (46)	4 (33)	0.23	0
Chronic interstitial nephropathy	3 (23)	2 (17)		1 (20)
Unknown nephropathy	2 (15)	0 (0)		2 (40)
Other	2 (15)	6 (50)		2 (40)
Viral infectious disease, N (%)				
CMV viremia	3 (25)	2 (17)	1.00	1 (20)
BK viruria	6 (50)	2 (17)	0.19	1 (20)
Immunosuppression, N (%)				
Induction	13 (100)	11 (92)	1.00	2 (40)
Thymoglobulin	1 (8)	0 (0)	—	1 (50)
Belatacept	12 (100)	0 (0)	—	0
Calcineurin inhibitors	0 (0)	12 (100)	—	4 (80)
Mycophenolate mofetil	13 (100)	11 (92)	1.00	3 (60)
Steroids	13 (100)	9 (75)	0.22	4 (80)
Rejection,				
Acute T cell-mediated rejection, N (%)	4 (33)	2 (17)	0.64	0
Delay from transplant, months, median (min-max)	2.5 (2–47)	1 (1–1)	—	—
Acute antibody-mediated rejection, N (%)	0 (0)	0 (0)	—	2 (40)
Delay from transplant, months, median (min-max)	—	—	—	80 (62–98)
Chronic antibody-mediated rejection	0 (0)	0 (0)	—	5 (100)
Delay from transplant, months, median (min-max)	—	—	—	104 (58–368)
End of follow-up				
Time from transplant, months, median (min-max)	86 (9–127)	84 (27–136)	0.95	105 (89–384)
eGFR mL/min/1.73 m ² , mean (SD)	57.18 ± 16.31	63.93 ± 17.43	0.34	32.05 ± 7.8
Proteinuria, g/day, median (min-max)	0.13 (0.03–0.51)	0.12 (0.07–0.80)	0.86	0.75 (0.25–1.61)
Donor-specific alloantibodies, N (%)	1 (8)	2 (17)	1.00	4 (80)
Number, median (min-max)	0 (0–1)	0 (0–5)	—	1 (0–2)
MFI, median (min-max)	2459	2159 (1437–6136)	—	3934 (743–19734)

CMV, cytomegalovirus; CNI, calcineurin inhibitors; eGFR, estimated GFR; MFI, mean fluorescence intensity.

¹p-Value between the two stable groups.

²Standard deviation.

compared at the time of inclusion. Quantitative variables were compared with unpaired t-test or Mann–Whitney, depending on the distribution of the variable concerned. Qualitative variables were compared with Fisher test or chi-square test.

Biological data were analyzed with the nonparametric Mann–Whitney test (flow cytometry and qPCR data). To compare early and late B cell phenotype, we used paired t-test. A p-value < 0.05 was considered as significant. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

Belatacept patients display higher proportion of transitional B cells than CNI patients

The total lymphocyte, CD3⁺ T and CD19⁺ B cells counts were assessed in the peripheral blood of patients from the three groups: Belatacept or CNI-treated patients with stable graft function and CR patients. The total lymphocyte count was not significantly different between the three groups

Leibler et al

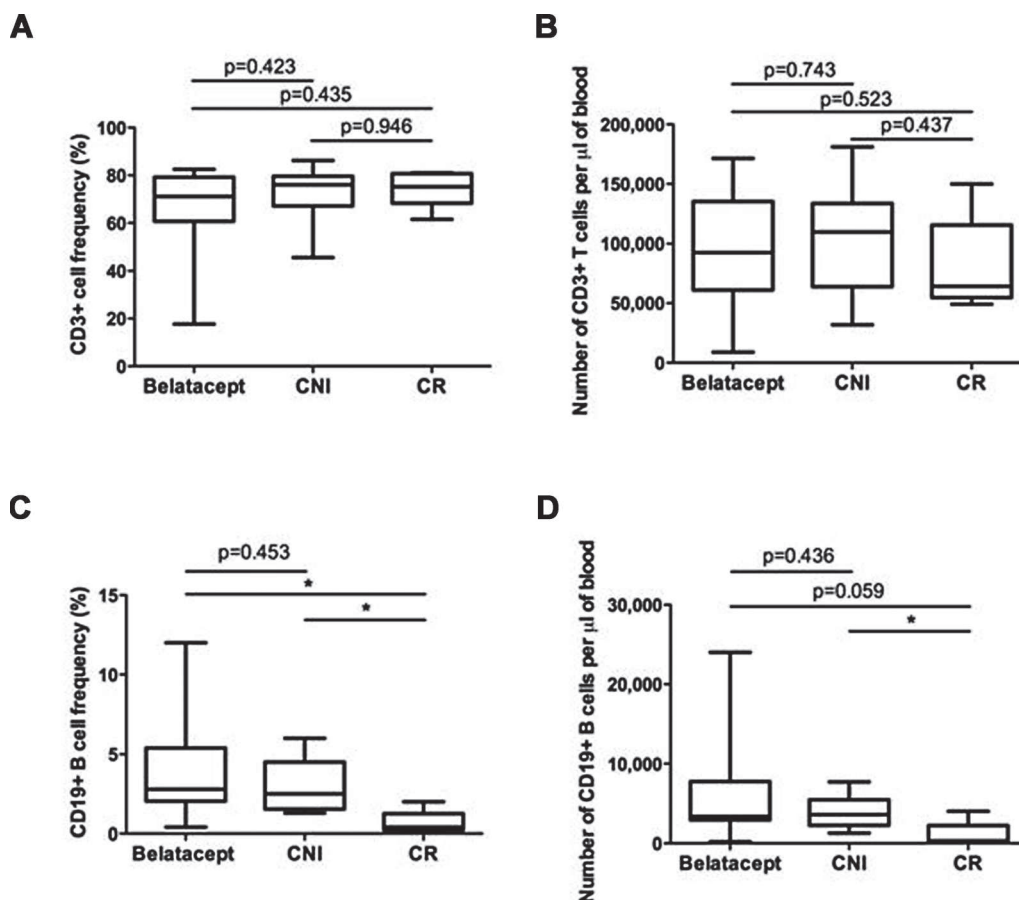


Figure 1: Absolute number of (A) lymphocytes and of (B) CD3⁺ T cells, (C) percentage and (D) absolute number of CD19⁺ B cells in the peripheral blood of patients from the three groups: Belatacept- or CNI-treated patients with stable graft function and CR patients. The absolute number of cells was determined by multiplying the respective percentages obtained by flow cytometry by absolute lymphocyte counts from clinical laboratory reports. The only difference observed is the number of CD19⁺ B cells (frequency, absolute number) between patients with stable graft function and CR (nonparametric Mann–Whitney test, two-tailed p-values, *p < 0.05). CNI, calcineurin inhibitors; CR, chronic antibody-mediated rejection.

(Figure 1A). The absolute number of CD3⁺ T cells in the PBMC of the three groups was also similar (Figure 1B). While the frequency of CD19⁺ B cells did not differ between the Belatacept and CNI groups (2.9 [0.2–12] % vs. 2.4 [1.3–6] %), it was significantly higher when both were compared to the CR group (0.5 [0.1–2.0] %, p = 0.011 and p = 0.011, respectively) (Figure 1C). Accordingly, the absolute number of B cells was higher in the Belatacept and CNI groups compared with the CR group (3.38 [2.00–24.000] and 3.59 [1.26–7.7] vs. 0.360 [0.08–4.00]; p = 0.036 and p = 0.012, respectively) (Figure 1D).

To identify peripheral B cell developmental stages among the CD19⁺ B cells by flow cytometry, we used the Bm1–Bm5 classification based on the expression of CD27, CD38 and IgD (Figure 2), and thresholds of expression of CD24/CD38 (Figure 3). Analysis of B cell subsets was performed on purified B cells from stable Belatacept- and CNI-treated patients. CR patients were not analyzed. Actually, these

patients exhibited a small amount of B-lymphocytes (0.5% of PBMC, even after B-lymphocyte enrichment number of the different subclasses of B cells remains under the threshold required for analysis. Using the CD27/IgD classification (15), we did not observe any significant difference in the percentage of CD19⁺ B cells displaying a memory phenotype (CD27⁺) or a naïve phenotype (CD27[−]) between the Belatacept and CNI groups (Figure 2A). However, mean frequencies of CD27⁺ and of unswitched CD27⁺IgD⁺ subset memory B cells were slightly lower in the Belatacept group compared with the CNI group (22.5 [6.92–78] % and 7.5 [2.7–34] % vs. 33.35 [11–71.5] % and 11 [3–41.5] %, respectively) (Figure 2A). Consequently, the proportion of CD27[−] (IgD⁺) naïve B cells was increased in the Belatacept group (Figure 2A).

The analysis of memory B cell populations according to the Bm classification (16) showed that the Belatacept group had a significantly lower number of late Bm5 cells, which

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

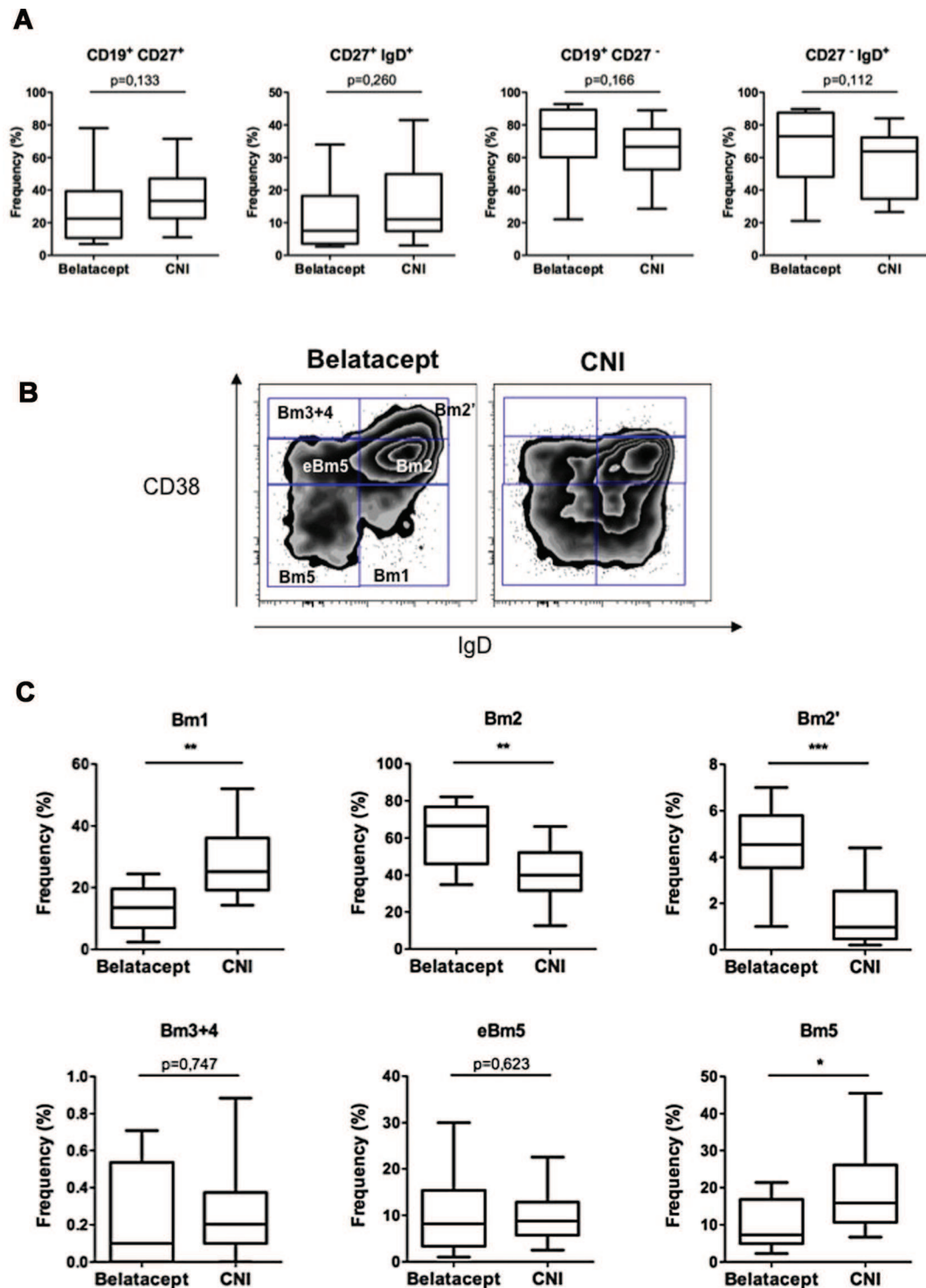


Figure 2: Phenotype of circulating CD19⁺ B cell subsets in Belatacept- and CNI-treated patients (N = 13 and 12, respectively) according to expression levels of CD27, IgD and CD38. (A) Percentage of CD19⁺CD27⁺ memory B cells (total and CD27⁺IgD⁺ unswitched memory) in both groups. (B) Representative dot plots of B cells using the Bm1–Bm5 classification. Gating strategy is shown. (C) Frequency (%) of the different Bm cell subsets within CD19⁺ B cells in the two groups. Belatacept group had significantly more Bm2' cells (IgD⁺CD38^{hi}), corresponding essentially to transitional B cells and naïve Bm2 cells (IgD⁺CD38^{int}). Belatacept patients presented significantly less Bm1 cells (IgD⁺CD38⁻) and late Bm5 cells (Bm5, IgD⁻CD38⁻, CD27⁺ switched memory B cells). All statistics: Mann–Whitney test, two-tailed p-values; *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0001. CNI, calcineurin inhibitors.

Leibler et al

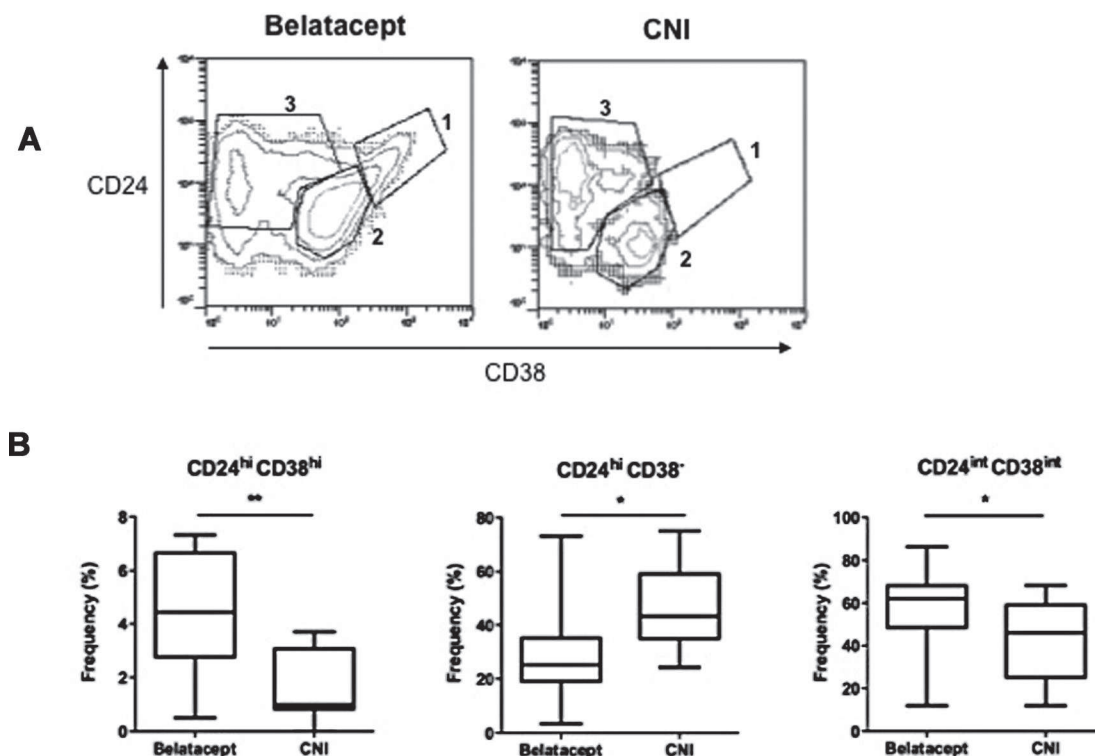


Figure 3: Phenotype of circulating CD19⁺ B cell subsets in Belatacept- and CNI-treated (N = 13 and 12, respectively) patients according to expression levels of CD24 and CD38. (A) Representative dot plots of B cells in one Belatacept and one CNI patient according to the expression levels of CD24 and CD38. The gate number one corresponds to immature B cells including the transitional cell subset that expresses high levels of CD24 and CD38. The gate number two corresponds to CD24^{int}CD38^{int} cells, which are primarily mature B cells and the gate three to CD24^{hi}CD38⁻ cells, which are primarily memory B cells. (B) Frequency (%) of these three different B cell subsets in studied groups. Belatacept patients had significantly higher proportion of transitional B cells ($p = 0.003$) and significantly lower proportion of memory B cells ($p = 0.01$) than CNI patients. The increased proportion of mature B cells in Belatacept patients is at the limit of statistical significance ($p = 0.0495$). Statistics: Mann-Whitney test, two-tailed p-values; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. CNI, calcineurin inhibitors.

are CD27⁺ switched memory cells, than the CNI group (7.3 [2.9–21.4] % vs. 15.9 [6.7–45.5] %; $p = 0.02$) (Figure 2C). Both Belatacept and CNI groups displayed similar numbers of early Bm5 cells (also switched memory B cells). As previously described for peripheral blood (16), there were virtually no Bm3+4 cells. The Bm1 virgin naïve IgD⁺ cells were significantly decreased in the Belatacept group compared with the CNI group (7 [2.4–24.5] % vs. 25.3 [14.3–52] %; $p = 0.0015$). By contrast, activated naïve Bm2 cells were significantly increased in the Belatacept group compared with the CNI group (66.5 [34.7–82.2] % vs. 40 [12.6–66.2] %; $p = 0.004$). This result is consistent with the increasing trend of CD27⁻ cells and particularly of CD27⁻IgD⁺ naïve B cells, in the Belatacept group. Altogether Belatacept patients display a lower number of memory B cells and, consequently, a higher proportion of B cells having a naïve phenotype, than CNI patients.

The proportion of Bm2' cells, which are mainly CD27⁻ transitional B cells (17,18), was significantly higher in the Belatacept group than in the CNI group (4.5 [1–7] % vs. 0.98 [0.2–4.4] %; $p = 0.0009$) (Figure 2C). To confirm that this B

cell subset was enriched in the Belatacept group, we analyzed expression levels of CD24 and CD38 since transitional B cells can also be identified by their high expression levels of both these markers (17,18). We indeed observed higher numbers of CD24^{hi}CD38^{hi} immature B cells in the Belatacept group than in the CNI group (4.45 [0.5–7.3] % vs. 1 [0–3.7] %; $p = 0.003$) (Figure 3). In accordance with above results, CD24^{hi}CD38⁻ cells, which are primarily memory B cells, were less frequent in the Belatacept group (25.3 [3.37–73] % vs. 43.4 [24.2–75] %; $p = 0.01$). The proportion of CD24^{int}CD38^{int}, comprising primarily mature B cells, was increased in the Belatacept group when compared to the CNI group (62 [12–86.3] % vs. 46 [12–68.1] %; $p = 0.049$), although the difference reached the limit of statistical significance. This is likely to be related to the increase in transitional B cells and decrease of the memory B cells.

Belatacept patients maintain higher proportion of transitional B cells along KT

We performed a late B cell phenotype in seven patients treated with Belatacept and in two patients treated with

B Cell Phenotype in Belatacept-Treated KT Patients

stable KT recipients remained stable within almost 6 years posttransplant.

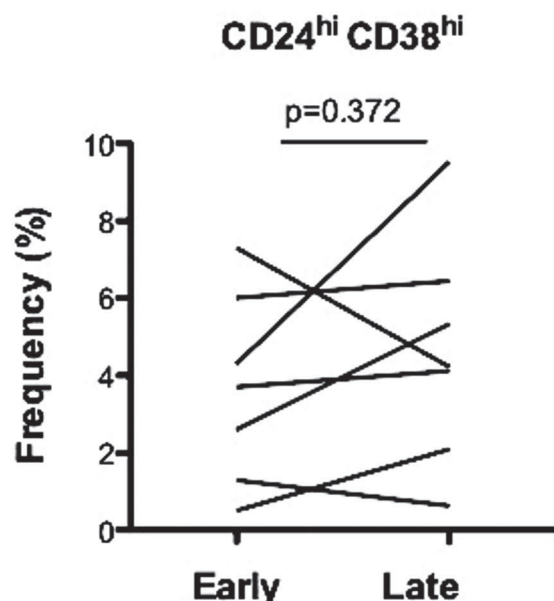


Figure 4: Evolution over time of the CD24^{hi} and CD38^{hi} compartment (transitional B cells) in Belatacept-treated patients (N=7). Late blood samples were collected 20.80 ± 0.79 months after the initial one. The proportion of naïve transitional B cells (CD24^{hi} CD38^{hi}) was similar in both time points (p = 0.37). Statistics: paired t-test, two-tailed; p-values.

CNI. Late blood samples were collected 20.80 ± 0.79 months after the initial one. The proportion of naïve transitional B cells (CD24^{hi} CD38^{hi}) was similar in both time points (N=7; p=0.37) (Figure 4). In CNI patients, lower proportion of naïve transitional B cells was stable (N=2; data not shown). B cell phenotype observed in

Belatacept patients show lower levels of BAFF and BAFF-R transcripts than CNI patients

We next analyzed the transcript levels of molecules involved in inhibitory B cell profiles (CD32 isoforms and the B cell scaffold protein ankyrin repeats 1 [BANK1]) and in B cell survival and differentiation (the A proliferating inducing ligand [APRIL], the B cell activating factor [BAFF] and its receptors: BAFF receptor [BAFF-R], the transmembrane activator and CAML interactor [TACI] and the B cell maturation protein [BCMA]) in the PBMC from Belatacept and CNI patients. The transcript levels of both CD32a and CD32b isoforms and BANK1 were comparable in both patient groups. APRIL, TACI and BCMA transcripts were also expressed at similar levels in both groups. By contrast, we observed a significant difference in the quantity of BAFF and BAFF-R transcripts. The Belatacept group displayed significantly less BAFF and BAFF-R transcripts than the CNI group (0.59 [0.11] vs. 0.96 [0.12] and 4.53 [0.39] vs. 6.21 [0.74], respectively) (Figure 5).

Discussion

Here we report for the first time the analysis of peripheral B cell compartment in renal transplant patients treated with Belatacept. The present study was prompted by the observation that KT patients enrolled in Phase III clinical studies have lower incidence of DSA upon Belatacept (CTLA-4-Ig) treatment compared with CNI. Since a B cell signature has been described in operationally tolerant renal transplant recipients (4,5), we analyzed whether B cell compartment was modified by Belatacept. We showed that Belatacept patients have a higher number of naïve and

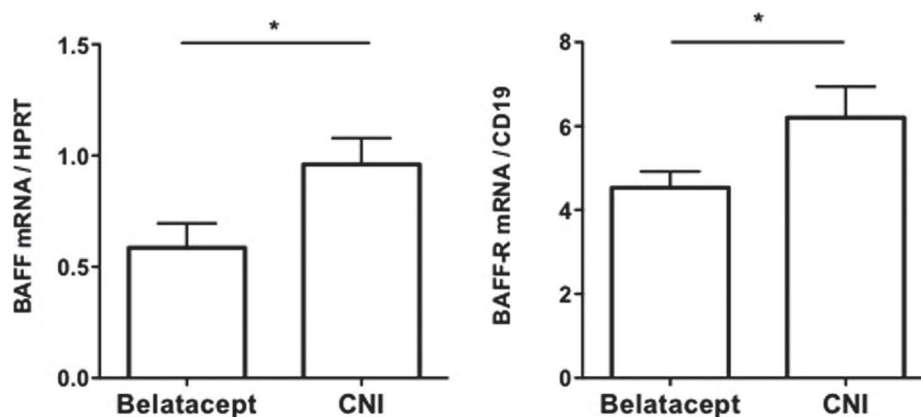


Figure 5: Comparison of the transcript levels of BAFF and BAFF-R in PBMC from the Belatacept and CNI groups. The amounts of BAFF mRNA and of its receptor BAFF-R were reported to the HPRT gene and to the CD19 gene, respectively. The Belatacept patients (N=9) had lower transcript levels of BAFF and BAFF-R than the CNI patients (N=9). Statistics: Mann-Whitney test, two-tailed p-values; *p < 0.05. BAFF, B cell activating factor; BAFF-R, BAFF receptor; CNI, calcineurin inhibitors; PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

transitional B cells. Moreover, we showed that such B cell signature is maintained over time with same proportion of naïve transitional B cells.

In our study, patients from the Belatacept, CNI and CR groups had similar count of both total lymphocytes and T cells. While both the frequency and absolute number of B cells were comparable between the Belatacept and CNI groups, they were significantly lower by comparing these two groups with the CR group. These results contrast with previous findings showing a similar number and frequency of B cells in patients with stable renal function when compared to patients with chronic rejection. The only significant difference was the higher number of B cells in drug-free tolerant recipients (5,19). Our results may be related to the limited number of analyzed patients, rather than to the immunosuppression strategy, which was not modified within the previous 12 months. However, our results reinforce the recent concept of the association between graft acceptance and the predominance of B cells with tolerogenic phenotype.

Our observation of increased number of naïve B cells in Belatacept patients was described by other groups in long-term immunosuppressive drug-free tolerant KT patients (4) and in alemtuzumab-treated KT patients (20). In line with this result, immature B cells, namely the CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells, was increased in Belatacept patients compared to CNI patients. This B cell subset was shown as exhibiting regulatory capability through IL-10 release (21) and interestingly was also found in operational tolerant KT patients (4). The development of naïve and/or transitional B cells with regulatory functions has been hypothesized as being involved in graft tolerance induction and/or maintenance in such KT patients (4).

Since CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells have regulatory capacity (21), we analyzed the transcript levels of molecules involved in regulatory B cell profiles and in B cell maturation and activation (19). Unlike operational tolerant KT patients, expression of BANK1 transcripts, which negatively regulates CD40-mediated AKT activation and which has been described as a leader gene in these patients, was not significantly different in both Belatacept and CNI groups. Two isoforms of the low-affinity Fcγ receptor CD32 are expressed on B cell surface: while CD32b mediates an inhibitory signal upon co-ligation with the B cell receptor, CD32a, transduces an activating signal. Although decreased CD32a/CD32b ratio was described for tolerant patients, it was similar between both our groups. Interestingly, we observed a decrease in BAFF and BAFF-R transcripts in patients from the Belatacept group when compared to patients treated with CNI. BAFF has emerged as a critical factor for B cell survival and differentiation. BAFF exerts these actions by binding to BAFF-R with a high affinity, and to TACI and BCMA with a low affinity. While BAFF is predominantly produced by innate immune cells, BAFF-R expression begins at the late transitional stage and

is present on all mature B cells. BAFF-R signaling was demonstrated to determine transitional B cell maturation and the subsequent survival of mature B cells (22,23). Our observation of reduced BAFF and BAFF-R transcripts are in accordance with our B cell phenotypic analysis and other studies reporting an association of high levels of BAFF with abnormal renal function and HLA immunization or a local humoral alloimmune response in kidney transplantation (24–26). Levels of BAFF transcripts were also increased in rejected allografts (27). In line with our results, elevated BAFF-R transcripts were also associated with long-term graft dysfunction, as described in a previous study measuring BAFF-R levels in a cohort of 143 kidney recipients with stable graft function at enrollment for more than 6 years (28).

The rationale for the use of Belatacept in organ transplantation is primarily focused on its ability to block CD80/86–CD28 mediated T cell activation and its potential activity on other immune cells such as B cells was initially thought to be mainly mediated by an alteration of the T cell/B cell cooperation. Our results suggest that Belatacept could also act directly on B cells. Mechanisms by which Belatacept could influence B cell compartment remain however to be determined. First, Belatacept could act directly on B cells through CD28–CD80/CD86 costimulation blockade. CD28 expression in B cells is repressed by the transcription factor Pax5 and de-repressed during differentiation to plasma cells. The role of CD28 in humoral immune responses has been predominantly attributed to helper T cell costimulation and germinal center formation in lymphoid organs (29,30). An intrinsic B cell role for CD28 has been identified in controlling the differentiation or function of plasma cells beyond germinal center formation (11). Recently, it has been shown that sustained antibody responses depend on the function of CD28, which selectively supports the survival of bone marrow–resident nonproliferating plasma cells, the long-lived plasma cells (13). Second, Belatacept could act indirectly through the induction of the tolerogenic HLA-G molecule. Indeed, it has been demonstrated that dendritic cells (DC) generated *in vitro* in presence of Belatacept released soluble HLA-G (sHLA-G) in response to allostimulation; these Belatacept-treated DC acting as tolerogenic antigen-presenting cells. In addition, renal transplant patients receiving Belatacept exhibited increased levels of plasma HLA-G than those receiving CNI. This sHLA-G secretion by DC during an allogeneic challenge was thus suggested as an explanation to the better graft acceptance observed in Belatacept treated renal transplant patients (31). Another study on a large cohort of renal transplant patients showed an inverse association between plasma sHLA-G and the presence of anti-HLA alloantibodies (32). Finally, we demonstrated that sHLA-G inhibits the proliferation and differentiation of B cells through binding to the ILT2 receptor expressed to their cell surface (33). Through these direct/indirect mechanisms, we hypothesize that the Belatacept may affect the B cell maturation process and promote the

maintenance of transitional B cells, which could help explain the weak anti-HLA alloimmunization.

In conclusion, present data showed that KT recipients treated with Belatacept exhibited a B cell phenotype that shares similarity to that observed in operational tolerant patients, suggesting that costimulation blocker may, at least partially, create an environment that limits anti-donor-specific B cell alloimmune response. Whether the B cell pattern observed predicts further occurrence or not of DSA and antibody-mediated events remains to be established.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Bristol-Myers Squibb France and the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives.

Disclosure

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

References

- Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 348–357.
- Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010; 363: 1451–1462.
- Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665–673.
- 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.
- 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.
- Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 547–557.
- Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 535–546.
- Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, et al. Three-year outcomes from BENEFIT-EXT: A phase III study of belatacept versus cyclosporine in recipients of extended criteria donor kidneys. *Am J Transplant* 2012; 12: 630–639.
- Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; 12: 210–217.
- Larsen CP, Grinyo J, Medina-Pestana J, et al. Belatacept-based regimens versus a cyclosporine A-based regimen in kidney transplant recipients: 2-year results from the BENEFIT and BENEFIT-EXT studies. *Transplantation* 2010; 90: 1528–1535.
- Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* 2006; 24: 269–281.
- Njau MN, Kim JH, Chappell CP, et al. CD28-B7 interaction modulates short- and long-lived plasma cell function. *J Immunol* 2012; 189: 2758–2767.
- Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, et al. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J Exp Med* 2011; 208: 1435–1446.
- Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010; 10: 464–471.
- Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+ IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 1998; 188: 1679–1689.
- Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *J Immunol* 2001; 167: 3610–3618.
- Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004; 197: 179–191.
- Sims GP, Ettinger R, Shiota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005; 105: 4390–4398.
- 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.
- 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.
- Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, 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.
- Chhabra M, Conlon TM, Saeb-Parsy K, Pettigrew GJ. BAFF and associated TNF superfamily members in renal transplantation: An end to BlySful ignorance. *Transplantation* 2013; 96: 853–859.
- Tussiwand R, Rauch M, Fluck LA, Rolink AG. BAFF-R expression correlates with positive selection of immature B cells. *Eur J Immunol* 2012; 42: 206–216.
- Thaunat O, Field AC, Dai J, et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: Evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14723–14728.
- Xu H, He X, Liu Q, et al. Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2009; 41: 1552–1556.
- Zarkhin V, Li L, Sarwal M. "To B or not to B?" B-cells and graft rejection. *Transplantation* 2008; 85: 1705–1714.
- Thaunat O, Patey N, Gautreau C, et al. B cell survival in intra-graft tertiary lymphoid organs after rituximab therapy. *Transplantation* 2008; 85: 1648–1653.
- Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, et al. BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *Am J Transplant* 2012; 12: 2754–2762.

Leibler et al

29. Ferguson SE, Han S, Kelsoe G, Thompson CB. CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 1996; 156: 4576–4581.
30. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261: 609–612.
31. Bahri R, Naji A, Menier C, et al. Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: Implication in human renal transplant acceptance. *J Immunol* 2009; 183: 7054–7062.
32. Qiu J, Terasaki PI, Miller J, Mizutani K, Cai J, Carosella ED. Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance. *Am J Transplant* 2006; 6: 2152–2156.
33. Naji A, Menier C, Maki G, Carosella ED, Rouas-Freiss N. Neoplastic B-cell growth is impaired by HLA-G/ILT2 interaction. *Leukemia* 2012; 26: 1889–1892.