



HAL
open science

Effet du Belatacept sur des centres germinatifs fonctionnels humains dans un modèle de souris immunodéficientes

Chloé Samson

► **To cite this version:**

Chloé Samson. Effet du Belatacept sur des centres germinatifs fonctionnels humains dans un modèle de souris immunodéficientes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2021. Français. NNT : 2021PA120052 . tel-04010473

HAL Id: tel-04010473

<https://theses.hal.science/tel-04010473v1>

Submitted on 1 Mar 2023

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

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

Thèse de doctorat
Université Paris-Est Créteil
Spécialité : Immunologie
Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

**Effet du belatacept sur des centres germinatifs
fonctionnels humains dans un modèle de souris
immunodéficientes**

Chloé SAMSON

Soutenue publiquement le 30 juin 2021

Jury :

Dr. Renaud SNANOUDJ	Rapporteur
Pr. Antoine DURRBACH	Rapporteur
Pr. Natacha BESSIS	Examineur
Dr. Flora ZAVALA	Examineur
Pr. José COHEN	Examineur
Pr. Philippe GRIMBERT	Directeur de thèse

IMRB : Institut Mondor de Recherche Biomédicale,
Inserm U955 – Équipe Cohen
Centre d'investigation Clinique Biothérapie
Hôpital Henri Mondor

Remerciements

Je tenais particulièrement à remercier toutes les personnes ayant participé à cette thèse, ainsi que toutes celles m'ayant soutenues durant ce doctorat.

Tout d'abord un grand merci à mon directeur de thèse Philippe Grimbert. C'était un plaisir de travailler avec toi, tu m'as fait confiance, tant d'un point de vue professionnel que personnel, en me laissant mener cette thèse avec une certaine liberté, ce qui a contribué à mon épanouissement scientifique.

Je remercie également mon chef d'équipe José Cohen. Tu m'as accueilli dans l'équipe alors que je n'étais encore qu'un bébé chercheur. De mon stage de licence 3, en passant par mon stage de master 2 et même durant ma thèse, tes commentaires et tes suggestions ont toujours été pertinentes et constructives. C'est un réel plaisir et surtout une véritable chance d'avoir réalisé ma thèse dans ton équipe.

Je remercie infiniment le Pr Antoine Durrbach et le Dr Renaud Snanoudj qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse, pour toutes leurs remarques et suggestions. Je remercie également le Pr Natacha Bessis et le Dr. Flora Zavala de participer à mon jury de thèse en tant examinatrices.

Je voulais particulièrement remercier Benoit Vingert. Je voulais te remercier d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse et surtout d'avoir continué à me donner des conseils et ton soutien même après la modification du jury final.

Merci à Caroline pour m'avoir encadrée durant tout mon master 2, mais également durant ma thèse. Pour toutes ces heures de chirurgie à l'animalerie à me supporter. Je tiens à remercier Allan, pour son immense savoir scientifique et sa disponibilité. Ainsi que Claire Leibler qui m'a fait découvrir le versant « lymphocyte B et transplantation ».

Je voulais avoir également avoir un petit mot pour Sina et Mathieu, qui m'ont fait aimer l'équipe 21 à mes débuts, en 2015, durant mon stage de licence 3.

Il est vrai que la thèse est un moment assez intense et plutôt stressant, mais je dois avouer que j'ai eu l'énorme chance de traverser cette épreuve auprès de ma partenaire

de thèse Audrey. Aller à l'animalerie ce n'est pas toujours la joie mais avec toi c'est clairement mieux que la pause-café. On vit presque dans la même ville mais clairement nous ne sommes pas sur le même fuseau horaire, toi qui bosses de nuit et moi qui suis plutôt du matin, ce n'était pas gagné pour se croiser, mais j'adore encore maintenant écouter tes audios (faits en pleine nuit) à 6h30 du matin avec ma tasse de café. On en a traversé des épreuves durant ces 4 années, tu es devenue la tata de ma fille et le père spirituel de mon fils et maintenant mamie Fé et toi vous avez une place énorme dans notre vie. Saches que la thèse a été beaucoup plus douce à tes côtés, alors merci !

Mention spéciale pour la deuxième Audrey du labo, aka Audrey CHIC. Merci à toi d'avoir été là pour moi et d'avoir géré comme jamais la table des matières. Personne ne connaît aussi bien que toi comment j'aime mon café. Les débats Koh Lanta jusqu'à pas d'heure les vendredis soir et les débriefs de tes nuits mouvementées vont me manquer.

Je voudrais également remercier nos italiens Fabio et Matteo pour leur bonne humeur et leur gentillesse. Matteo sache que nos discussions Pokemon (Mario et Zelda) me manquent. Pensée pour Anaïs, ma voisine de bureau qui revit depuis l'arrêt de ces discussions et avec qui j'ai passé de supers moments. Je te souhaite bon courage pour cette fin de thèse. Je voulais également remercier Oriane pour cette fabuleuse astuce pour ma liste des abréviations. Plus sérieusement, j'ai été très contente de faire cette formation expérimentation animale avec toi, car on a pu pas mal discuter et ça aurait été vraiment dommage de partir sans avoir eu le temps de te connaître.

Merci à notre Jéjé national, tes mots ont apaisé mes maux après les défaites, douloureuses, de Paris cette année.

Je voulais également remercier les personnes du « bureau du haut » : Benoît tu as subi, malgré toi, toutes ces discussions dont je tairais les détails, et tout ça dans la joie et la rigolade. Sylvain nouveau membre de l'équipe, qui a su très facilement trouver sa place et qui est déjà indispensable tant d'un point de vue professionnel que personnel. Claire merci à toi de m'avoir soutenue pour la conversion en 16/9 de mon poster pour le FOCIS, tu m'as évité de sombrer.

Je remercie également chaleureusement tous les autres membres de l'équipe, qui m'ont donné de nombreux conseils tout au long de ma thèse.

Maintenant, je vais passer de l'autre côté du « mur » et remercier la team podot. Je vais commencer par l'évidence en te remerciant toi Carole, tu m'as tellement aidé durant cette thèse, que ce soit d'un point de vue professionnel que personnel, tu as toujours été là pour moi. Je ne sais pas comment tu fais pour gérer comme ça sur tous les fronts et avec autant d'énergie, de gentillesse et de bienveillance. Merci d'avoir fait de ton bureau un refuge et un endroit accueillant pour Audrey et moi. En parlant du bureau, j'ai une pensée particulière pour Hamza, ça y est tu arrives au stade de décomposition finale de l'étudiant en thèse, j'aimerais te dire que ça ira mieux après, mais clairement après c'est le clinicat alors je ne voudrais pas te mentir. Petite dédicace à Antoine, le dernier membre du groupe « mcdo anonymes », qui avant de changer de bord et de basculer dans le sport et une alimentation saine et équilibrer était une chouette type. On ne peut pas parler de l'équipe 21 bis sans parler de toi Julie, tu es la personne la plus généreuse et dévouée que je ne connaisse, sans parler de ton talent pour les pâtisseries (et les gâteaux d'anniversaire).

Je voudrais également remercier mes amis, qui m'ont énormément soutenue et m'ont permis de souffler un peu. Merci à Gaëtan, aka tonton moto, de nous partager ta vie sentimentale digne d'une série américaine (ou de vidéo gag), durant nos nombreuses soirées Koh Lanta. La distance n'éloigne pas les vrais amis, Yanis tu en es la preuve, ton départ pour Nice, où tu as construit ta petite famille, n'a en rien altéré notre amitié. Acolyte du soir des attentats à ce road trip aux États-Unis, toujours dispo pour regarder des photos floues de boutons de varicelle, pour des diagnostics obscurs, merci tonton couscous. Merci à Christian – Bruno, plus connu sous le nom d'Apu, pour ta gentillesse et ta générosité (et merci pour les rolls et les samoussa aussi). Et pour Gregory, tu feras juste attention mais je crois que tu as fait tomber ton paquet de mouchoirs !

Je voulais également avoir une pensée pour Chloé et Anaïs, car depuis bientôt deux ans, il n'y a pas un jour sans message de votre part. Vous m'avez été d'un réel soutien pendant le confinement avec toutes les activités possibles pour occuper deux enfants en bas âge, mais également ces derniers mois, avec l'échéance de la thèse. Vous

m'avais permis de créer une parenthèse dans cette thèse, notamment avec les vacances au ski et les balades en bord de marne, alors merci.

Merci Julie, je ne vais pas m'étaler tu sais combien tu comptes pour moi et ça depuis des années et pour encore de nombreuses. La distance n'éloigne pas les vraies amies alors rassures toi ce n'est pas Méditerranée qui va nous séparer.

Edward et Kimia, ça fait 25 ans que je vous supporte (que vous me supportez) et même si cette année on n'a pas pu faire la 17^e édition de bookmas, on se rattrapera l'année prochaine. La table du 3^e rang (à droite) en SVT en terminale nous aura prouvé une chose (hormis le fait que vous n'aimiez clairement pas les SVT) c'est que quoi qu'il arrive, vous avez beau essayé, vous n'arrivez jamais à vous liguier contre moi.

Je tiens également à remercier ma famille, mes parents sans qui tout ça n'aurait pas été possible. Merci de m'avoir permis de grandir dans une famille si ouverte et tolérante. Merci à mon père de m'avoir donné sa sensibilité mais également son caractère de cochon. Je voudrais particulièrement remercier ma mère, pour tous ses sacrifices et pour tout cet amour qu'elle m'a donné, sans compter. Ces soirées à écouter les déclinaisons de latin, les dictés et les exposés. Merci d'avoir cru en moi et de ne jamais douter de mes choix.

Un merci à ma belle-famille, Sylvie pour toutes ces soupes champenoises et Noël pour les échanges Pokemon. Je suis chanceuse de vous avoir dans ma vie.

Un merci à mes sœurs d'avoir été là pour moi, pendant ses 4 années de thèse et tout au long de ma vie. Camille, sans qui mon enfance aurait été bien triste, mon modèle ma grande sœur. Roxane pour ta maturité et ta détermination. Lola pour ta générosité et ton amour.

Je voudrais particulièrement remercier mes grand-mères qui m'ont énormément apporté et tant appris.

Je voudrais finir avec mes essentiels : Jordan sans ton soutien je n'y serais jamais arrivé ; Yaëlle et Noam sans votre amour non plus.

Table des matières

REMERCIEMENTS	1
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	7
ABREVIATIONS	8
RESUME	10
INTRODUCTION.....	11
I. LES LYMPHOCYTES B	11
A. MATURATION ET DIFFERENCIATION DU LYMPHOCYTE B	12
1. <i>Ontogenèse et stades immatures dans la moelle osseuse (phase de pré centre germinatif).....</i>	12
1.1. Implication du récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BCR)	12
1.2. Stade pro-B	13
1.3. Stade pré-B	13
1.4. Stade B immature	14
2. <i>Les ligands et récepteurs du système BAFF/APRIL : implications dans la maturation du lymphocyte B.....</i>	16
2.1. Les récepteurs BAFF et APRIL	16
2.2. Importance particulière de BAFF-R.....	18
3. <i>Différenciation dans les organes lymphoïdes secondaires</i>	20
3.1. Maturation indépendante de l'antigène dans la rate	20
3.1.1. Lymphocyte B transitionnel	20
3.1.2. Lymphocyte B mature et naïf	21
3.1.3. Lymphocyte B de la zone marginale	22
3.2. Maturation dépendante de l'antigène (organes lymphoïdes secondaires).....	24
3.2.1. Formation du centre germinatif	25
3.2.2. Centroblastes/centrocytes	25
3.3. Rôle des Tfh dans l'établissement de la réponse humorale T dépendante	27
3.3.1. La genèse du Tfh et son rôle dans la mise en place du centre germinatif	27
3.3.2. Les fonctions du Tfh.....	30
3.3.3. Hypermutation somatique.....	33
3.3.4. Commutation isotypique	34
B. LES LYMPHOCYTES B MATURES (MAINTIEN DE LA MEMOIRE IMMUNITAIRE ET RAPPEL ANTIGENIQUE)	37
1. <i>Généralités sur les lymphocytes B matures</i>	37
1.1. Lymphocytes B mémoires	37
1.1.1. LB mémoires extra-folliculaires (indépendants du centre germinatif).....	38
1.1.2. LB mémoires (dépendants du centre germinatif).....	38
1.2. Plasmocytes	38
2. <i>Les fonctions des lymphocytes B matures</i>	40
2.1. Sécrétion d'anticorps.....	40
2.2. Cellules présentatrices d'antigènes	43
2.3. Sécrétion cytokinique	44
C. POPULATION B REGULATRICES	45
1. <i>Phénotypes et généralités des populations B régulatrices</i>	46
1.1. B transitionnels	46
1.2. B10	47
1.3. B de la zone marginale.....	47
1.4. Plasmablastes régulateurs	48
2. <i>Fonctions principales des populations B régulatrices</i>	49
2.1. Sécrétion d'IL10	49
2.2. Sécrétion TGFβ.....	49
2.3. Sécrétion d'EBI3.....	49
2.4. Sécrétion d'IL35	50
2.5. Adénosine et enzymes immunosuppressives	51
D. AUTRES VOIES D'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES B : LES TOLL LIKE RECEPTOR.....	52
1. <i>Rôle des TLR dans la réponse humorale T dépendante</i>	53
2. <i>Rôle des TLR dans la réponse humorale T indépendante</i>	53

II.	TRANSPLANTATION ET MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DU REJET.....	54
A.	GENERALITES	54
1.	<i>Les allo-antigènes</i>	54
1.1.	Les antigènes majeurs d'histocompatibilité	54
1.2.	Les antigènes mineurs d'histocompatibilité	55
1.3.	Le système ABO	56
1.4.	Les anticorps non HLA.....	57
2.	<i>Réponse innée</i>	57
3.	<i>Réponse adaptative</i>	58
3.1.	Rejet aigu à médiation cellulaire (TCMR, T Cell mediated rejection)	58
3.2.	Rejet aigu à médiation humorale (ABMR, antibody-mediated rejection)	58
4.	<i>Mécanismes à l'origine de la pathogénie des DSA</i>	59
4.1.	Anticorps et lésions endothéliales	59
4.2.	Activation du complément	60
4.3.	Toxicité endothéliale et mécanisme d'ADCC	62
5.	<i>Chronologie d'apparition des DSA</i>	62
5.1.	DSA historiques.....	62
5.2.	DSA de novo.....	63
B.	TRAITEMENTS IMMUNOSUPPESSEURS.....	64
1.	<i>Traitement d'induction</i>	64
1.1.	Anti-thymocytes (Thymoglobuline)	64
1.2.	Anti-CD25 (Basiliximab)	65
1.3.	Anti-CD52 (Alemtuzumab).....	65
2.	<i>Traitement d'entretien : immunosurveillance</i>	65
2.1.	Agents anti-prolifératifs	66
2.2.	Les anti-calcineurine	66
2.3.	Les inhibiteurs de signalisation	67
2.4.	Blocage des molécules de costimulation	68
2.4.1.	Blocage de la voie B7/CD28	68
2.4.2.	Inhibition de la voie CD40/CD40L	71
2.4.3.	Inhibition de PDL1-Ig.....	73
	PROBLEMATIQUE	74
	RÉSULTATS	76
	ARTICLE	78
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	106
A.	ORIGINALITE DU MODELE	107
B.	ACTION DU BELATACEPT SUR LES CG : CONSEQUENCES.....	110
C.	PERSPECTIVES	112
1.	<i>Etude des réponses mémoires</i>	112
1.1.	Réponse vaccinale.....	112
1.2.	La stratégie d'approche	113
2.	<i>Évaluations d'autres cibles thérapeutiques</i>	114
3.	<i>Modèle d'allogreffe</i>	115
	CONCLUSION.....	117
	BIBLIOGRAPHIE	118
	ANNEXES.....	138

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma simplifié du développement des lymphocytes B et structuration du récepteur pour l'antigène (BCR) au niveau de la MO.	15
Figure 2 : Schéma simplifié du système BAFF/APRIL et ses récepteurs	18
Figure 3: Schéma du processus précoce de collaboration LT / LB au niveau des OL IIaires.	29
Figure 4: Schéma montrant une collaboration LT / LB à double sens et les molécules impliquées	30
Figure 5 : Schéma représentant les principales molécules impliquées dans le contact entre lymphocyte Tfh et lymphocyte B au niveau du centre germinatif (GC).	33
Figure 6 : Acteurs et processus cellulaires impliqués dans la mise en place d'un centre germinatif et la naissance de cellules B matures.	35
Figure 7: schéma représentant les différents mécanismes de réparations pouvant être mis en place par le LB, après activation d'AID (adapté de <i>Abbas, Lichtman, and Pillai. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition</i>)	36
Figure 8 : Propriétés physiques et fonctionnelles des différents isotypes d'Immunoglobulines humaines.....	41
Figure 9 : Concentration des isotypes d'anticorps sécrétés contre un antigène au cours des réponses primaires et secondaires.	42
Figure 10 : Schéma représentant la fonction sécrétrice des LB dans la réponse Th1 et Th2	45
Figure 11 : Tableau récapitulatif des différentes populations B régulatrices, des phénotypes de ces populations chez l'homme et la souris, ainsi que leurs mécanismes d'action.	51
Figure 12 : Schéma simplifié de la voie classique du complément.	61
Figure 13 : Cibles théoriques des différentes classes des traitements immunosuppresseurs pour inhiber l'activation du lymphocyte T. (Halloran, 2004).	68
Figure 14 : Conséquences du Belatacept (CTLA4-Ig) sur les mécanismes de costimulation lors de la synapse immunologique.....	70

Abréviations

ABMR	antibody mediated rejection
Ac	anticorps
Ag	antigène
AID	Activation-induced cytidine deaminase
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ARNm	acide ribonucléique messager
ASC	antibody secreting cells
BAFF	B-cell activating factor
Bcl6	B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 6
BCMMA	B-cell maturation antigen
BCR	recepteur des cellules B
Blimp1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BLR1	récepteur de lymphome de Burkitt 1
BM	B mémoire
Breg	B régulateur
Btk	Bruton's tyrosine kinase
cABMR	chronic antibody mediated rejection
CFD	cellule folliculaire dendritique
CG	centre germinatif
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CNI	Calcineurin inhibitors
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CpG	Cytosine-phosphate-Guanine
CRD	domaines extracellulaires riches en cystéine
DAMPs	Damage Associated Molecular Pattern
DC	cellule dendritique
DSA	donnor-specific antibody
DZ	dark zone (zone sombre)
EAE	encéphalomyélite auto-immune expérimentale
Fc	Fragment cristallisable
FO I/II	folliculaire I/II
GALT	tissus lymphoïdes associés à l'intestin
HLA	human leukocyte antigen
ICOS/ICOSL	inducible costimulator (ligand)
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
ILC	innate lymphoid cell
IRF4	acteur 4 régulateur de l'interferon
JAK3/2	Janus kinase 3
LB	lymphocyte B
LB T1/2/3	lymphocyte B transitionnel 1/2/3
LPS	lipopolysaccharides
LT	lymphocyte T
LTc	lymphocyte T cytotoxique
LZ	light zone (zone claire)
MAC	complexe d'attaque membranaire du complément
mAc	mouse anticorps
MALT	tissus lymphoïdes associés aux muqueuses

MO	moelle osseuse
MPA	mycophenolic acid
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
OL II ^{aires}	organes lymphoïdes secondaires
PAX-5	paired box 5
PBMC	cellules mononuclées du sang
PC	plasmocyte
PD1/PD1L1	programmed cell death (ligand) 1
PLP	progéniteurs lymphoïdes très précoces
PMA	phorbol-12-myristate-13-acétate
PRR	Pattern recognition receptor
RAG1/2	Recombination activating gene 1/2
S1P1/S3P3	Sphingosine-1-phosphate
SYK	Tyrosine-proteine kinase
TACI	transmembrane activator and CAML interactor
TCR	recepteur des cellules T
Tfh	T folliculaire helper
TGF β	transforming growth factor beta
TH1/2/17	T helper 1/2/17
TIM-1+	T-cell immunoglobulin and mucin domain 1
TLR	Toll like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR2	tumor necrosis factor receptor 2
XBP-1	X box binding protein 1
ZM	zone marginale

Résumé

La réponse humorale, médiée par la synthèse d'anticorps dirigés contre les molécules HLA du donneur (DSA), est l'une des principales causes de perte du greffon en transplantation rénale. La compréhension des mécanismes physiopathologique impliqués au cours de ces phénomènes de rejet comme le développement d'outils thérapeutiques permettant de mieux les contrôler est donc un objectif primordial.

Parmi les agents immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale, Le belatacept, une protéine de fusion bloquant le signal 2 de costimulation des lymphocytes, a également montré sa capacité à prévenir de manière plus efficace la sécrétion de DSA par différents mécanismes associant une action directe sur les plasmablastes ainsi que sur la coopération entre lymphocytes B (LB) et lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Cette coopération cellulaire entre LB et TFH se produit au sein des centres germinatifs (GC), siège de la différenciation lymphocytaire B.

Au cours de cette thèse, nous avons souhaité étudier l'impact du Belatacept sur la formation et la maturation des CG humains. Dans le cadre de ce projet, nous avons mis en place un modèle expérimental innovant basé sur la constitution de CG humain dans un modèle de souris immunodéficientes. Nous avons pu démontrer que contrairement à d'autres agents immunosuppresseurs comme les inhibiteurs de la Calcineurine, le Belatacept inhibait la formation de ces CG.

Ces résultats ouvrent la voie à d'autres études et notamment celles permettant d'étudier d'autres molécules immunosuppressives afin de permettre un contrôle plus optimal des réponses humorales dans le domaine de la transplantation ainsi que dans celui des maladies auto-immunes.

Introduction

I. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont les cellules à l'origine de la production d'anticorps répondant à une stimulation antigénique hautement spécifique. Toutefois, le LB n'est pas seulement et simplement une cellule sécrétrice d'anticorps (Ac). D'autres fonctions lui sont attribuées, comme la fonction de cellule présentatrice d'antigène (Ag) et la capacité à moduler la réponse immunitaire par la sécrétion de différentes cytokines, ayant une action pro- ou anti-inflammatoire (en fonction du contexte et de la cytokine sécrétée). Les LB subissent différentes étapes de différenciation et de maturation, ayant lieu dans la moelle osseuse (MO), puis dans les organes lymphoïdes secondaires (OL II^{aires}). Chacune de ces étapes vont être abordées et développées au cours de ce chapitre, ainsi que les différents acteurs de cette différenciation, comme les lymphocytes T (LT) et plus particulièrement les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (Tfh pour *T follicular helper*). La collaboration Tfh/LB constitue la charnière centrale d'une maturation B optimale.

Le LB a un rôle clef dans la réponse immunitaire par son rôle essentiel dans la lutte contre différents pathogènes et la régulation de cette réponse. Dans un contexte pathologique, le LB peut être associé à des effets délétères. La connaissance des différentes étapes de maturation et de ses mécanismes d'actions, est indispensable afin de pouvoir contrôler ses réponses humorales.

Dans ce paragraphe, nous aborderons également les différents types de cellules B existantes en développant plus particulièrement les types cellulaires B au phénotype régulateur, ainsi que leurs différents modes d'action conduisant au contrôle de la réponse immune.

A. Maturation et différenciation du lymphocyte B

Les LB, tout comme les LT, font partie de l'immunité adaptative : immunité permettant de répondre à un pathogène, plus lentement que l'immunité innée mais de façon plus spécifique. La mise en place de cette immunité nécessite une maturation et une différenciation terminale des cellules y participant, que ce soit pour les LB ou les LT.

Nous nous intéresserons uniquement à l'ontogénèse B et aux différentes étapes clefs de la maturation de cette lignée. La production de cellules B matures est l'aboutissement d'un long processus de différenciation étant découpé en deux grandes étapes : la lymphopoïèse et l'immunopoïèse.

1. Ontogénèse et stades immatures dans la moelle osseuse (phase de pré centre germinatif)

La lymphopoïèse correspond aux étapes précoces de différenciation du LB. Ces étapes ont lieu, en amont, au niveau des tissus lymphoïdes fœtaux, pour ensuite se dérouler au niveau de la moelle osseuse (MO).

1.1. *Implication du récepteur pour l'antigène des lymphocytes B (BCR)*

L'ontogénèse du LB commence par la différenciation des cellules souches lymphoïdes, dans la MO. Les progéniteurs multipotents, (cellules souches multipotentes ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement) vont devenir des progéniteurs lymphocytaires très précoces (PLP). Les PLP expriment les enzymes RAG1 et RAG2 (*Recombination activating gene 1 ou 2*) nécessaires au réarrangement des chaînes lourdes (H) du BCR (*B-cell receptor*) des LB, récepteur permettant au LB de reconnaître l'antigène Ag. Malgré ce processus, les PLP, peuvent encore se différencier en lymphocytes B, T, NK ou cellules dendritiques (*Plonquet, 2013*).

Les souris déficientes en gènes RAG entraînent l'arrêt du développement des LB au stade de cellules pro B, s'accumulant dans la MO (*Mombaerts et al., 1992; Stein et al., 2017*). Les souris déficientes en RAG1 ont de petits organes lymphoïdes qui ne contiennent pas de lymphocytes B et T matures. L'arrêt de la différenciation des

cellules B et T se produit à un stade précoce et est en corrélation avec l'incapacité à effectuer la recombinaison V(D)J (mécanisme de recombinaison décrit ci-dessous). Les produits des gènes RAG1 et RAG2 sont nécessaires *in vivo* à cette recombinaison V(D)J (Oettinger et al., 1990).

1.2. Stade pro-B

Le réarrangement des chaînes lourdes (H) du BCR en intra-cytoplasmique, donne naissance aux premiers précurseurs exclusifs au lignage B. Il existe un stade pro-B précoce qui consiste à des réarrangements au niveau du locus IGH par la jonction d'un segment D_H avec un segment J_H. C'est durant ce stade qu'apparaît le marqueur caractéristique des LB : le CD19 (cluster de différenciation 19) (Plonquet, 2013).

Ce premier réarrangement donne lieu à un second réarrangement, sur un seul allèle, l'ajout d'un segment V_H aux précédents segments DJ_H réarrangés. Cette étape constitue le stade pro-B tardif (Hendriks and Middendorp, 2004).

1.3. Stade pré-B

La chaîne lourde formée, lors du stade précédent, s'associe à la pseudo-chaîne légère V_{préB}/λ5 pour former le pré-BCR. Ce complexe migre à la surface du futur LB entraînant la cellule au stade pré-B, ainsi que dans une phase d'expansion clonale. C'est également à ce stade que le marqueur CD20 apparaît à la surface des cellules B en devenir (Hendriks and Middendorp, 2004).

Tous les gènes codant pour les chaînes légères et les chaînes lourdes sont présents sous forme poly-allélique. Un premier réarrangement a lieu au niveau du premier chromosome, si celui-ci n'est pas concluant, un second réarrangement est possible au niveau du second chromosome. Dans le cas où aucun des réarrangements n'est productif alors la cellule rentrera en apoptose. Cette étape constitue la sélection positive des LB.

En revanche, si le premier réarrangement suffit, il est nécessaire d'arrêter tout autre réarrangement. Le mécanisme à l'origine de l'arrêt du processus de réarrangement, s'appelle l'exclusion allélique (pour la chaîne lourde) ou exclusion isotypique (pour la chaîne légère), et permet d'obtenir un seul type de chaîne légère et un seul type de chaîne lourde. Cette inhibition de tout réarrangement est possible par inactivation des deux protéines RAG1 et RAG2 responsables de la recombinaison VDJ. L'exclusion allélique est un mécanisme présent au niveau de l'expression du BCR mais également du TCR (*T-cell Receptor*) (*Vettermann and Schlissel, 2010*).

1.4. *Stade B immature*

La dernière étape de différenciation dans la MO est caractérisée par la production d'une chaîne légère classique, remplaçant la pseudo-chaîne légère et donnant naissance à une IgM (Immunoglobuline M) de surface conférant à la cellule sa spécificité de reconnaissance de l'Ag (*Plonquet, 2013*).

La liaison IgM membranaire/antigène induit un signal d'activation intracellulaire du LB, conduisant à la prolifération clonale de ces derniers, par des mitoses successives, ainsi qu'à la maturation des LB produisant des Ac très affins pour l'Ag.

Ce stade est marqué par un processus de sélection négative (même principe que la sélection négative des lymphocytes T dans le thymus) au cours duquel les LB acquerront la tolérance au soi et les cellules auto-réactives seront éliminées. (*Monroe et al., 2003; Weill and Reynaud, 2015*)

La tolérance immunitaire désigne la capacité du système immunitaire à ne pas réagir face à un Ag du soi ou à un Ag non-dangereux. On distingue : les Ag non immunogènes (ignorés par le système immunitaire), les Ag immunogènes (déclenchant une réponse immunitaire) et les Ag tolérogènes (déclenchant une réaction de tolérance). Les lymphocytes se déterminent entre ignorance, tolérance et activation en fonction de la nature de l'Ag et de la manière dont il est perçu par le système. La rupture de cette tolérance immunitaire est possible, entraînant ainsi une auto-immunité (anticorps ou lymphocytes auto-réactifs).

Les cellules stromales de la moelle osseuse sont capables d'exprimer à leur surface, *via* leur molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), des peptides du soi, permettant ainsi de tester la tolérance immunitaire du LB. Le LB immature possède plusieurs propriétés fonctionnelles :

- Il est capable de reconnaître le peptide qui lui est présenté avec une forte affinité, de ce fait il sera considéré comme délétère pour le soi (possibilité d'auto-immunité). Il recevra donc un signal de mort ;
- Il est capable de reconnaître le peptide qui lui est présenté, mais cette fois-ci avec une faible affinité. La cellule ne recevra pas de signal de mort et pourra poursuivre sa différenciation en migrant dans la rate ;
- La dernière possibilité est, que le lymphocyte B immature, n'interagisse pas du tout avec le CMH des cellules stromales. Dans ce cas, elles recevront également un signal de mort. (*Jamal et al., 2010*).

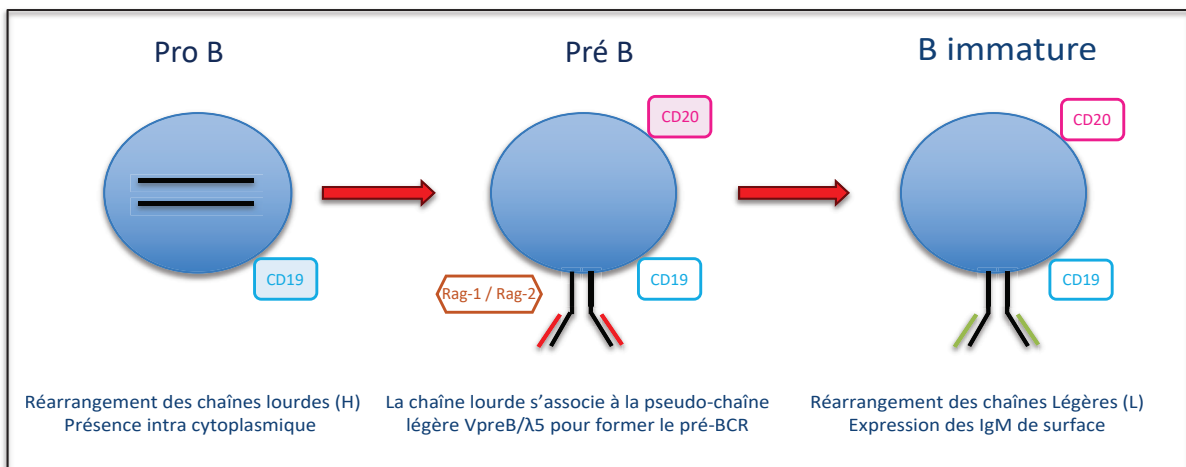


Figure 1 : Schéma simplifié du développement des lymphocytes B et structuration du récepteur pour l'antigène (BCR) au niveau de la MO.

2. Les ligands et récepteurs du système BAFF/APRIL : implications dans la maturation du lymphocyte B

L'un des changements de paradigme les plus importants dans la biologie des lymphocytes B au cours des vingt dernières années a été la réalisation que la simple expression du BCR à la surface des LB est importante mais pas suffisante pour la survie et la maturation de ces derniers. En effet, un facteur important et même critique pour le développement, la maturation et la survie des LB a émergé : le facteur BAFF (*B-cell activating factor*) (Schneider et al., 1999). Un autre ligand induisant la prolifération a également été identifié comme un stimulateur de croissance cellulaire dans diverses lignées cellulaires cancéreuses : APRIL (*A proliferation-inducing ligand*, également connu sous le nom de TNFSF13A) (Hahne et al., 1998).

BAFF et APRIL sont produits sous forme de protéines transmembranaires de type II, comme de nombreux ligands de la famille TNF (*tumor necrosis factor*), puis sont clivés protéolytiquement au niveau d'un site de furine protéase et libérés sous une forme soluble (Nardelli et al., 2001). Le BAFF peut rester sous forme membranaire, bien que le BAFF soluble soit nécessaire pour l'homéostasie des lymphocytes B (Bossen et al., 2011). En revanche, APRIL est clivé dans le site de l'appareil de Golgi avant sa libération et n'existe normalement que sous forme soluble, une fois à l'extérieur de la cellule d'origine (López-Fraga et al., 2001). Cependant, il existe des exceptions à cela, comme la synthèse d'APRIL-d, une isoforme maligne d'APRIL qui n'a pas de site de clivage de la furine et reste liée à la membrane sur les précurseurs des cellules leucémiques (Maia et al., 2011).

2.1. Les récepteurs BAFF et APRIL

BAFF et APRIL partagent deux récepteurs : TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*, également connu sous le nom de TNFRSF13B) et BCMA (*B-cell maturation antigen*, connu sous le nom de TNFRSF17). APRIL se lie fortement à BCMA et modérément à TACI, tandis que BAFF se lie faiblement à BCMA et fortement à TACI (Day et al., 2005). De plus, BAFF se lie fortement au BAFF-R (*B-cell activating factor-Receptor* ou TNFRSF13C) (Day et al., 2005).

Ces trois récepteurs principaux, BAFF-R, TACI et BCMA ont des profils d'expression distincts basés sur les stades de développement des cellules B, liés à leurs fonctions distinctes (figure 2). L'expression de BAFF-R est absente sur les précurseurs des cellules B dans la MO, mais elle est acquise sur les cellules B immatures lors de l'acquisition d'un BCR fonctionnel (Mihalcik et al., 2010).

TACI a différentes fonctions en servant d'une part de récepteur leurre inhibant la survie des LB médiée par BAFF et APRIL et l'activation du facteur de transcription NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (Hoffmann et al., 2015) tout en déclenchant, d'autre part, la recombinaison de commutation de classe d'immunoglobulines (He et al., 2010). TACI est exprimé par les cellules B activées, les LB de la zone marginale (ZM), les LB mémoires commutés et les plasmocytes. (Mantchev et al., 2007; Tsuji et al., 2011). TACI est nécessaire pour les réponses de type II et de type I indépendantes des LT (Ozcan et al., 2009), pour la régulation négative du nombre de LB (Seshasayee et al., 2003) et du nombre de Tfh (Ou et al., 2012).

Différent de BAFFR et TACI, BCMA est régulé à la hausse dans les cellules B activées et exprimé de façon constitutive par les plasmocytes à longue durée de vie soutenant leur survie (O'Connor et al., 2004).

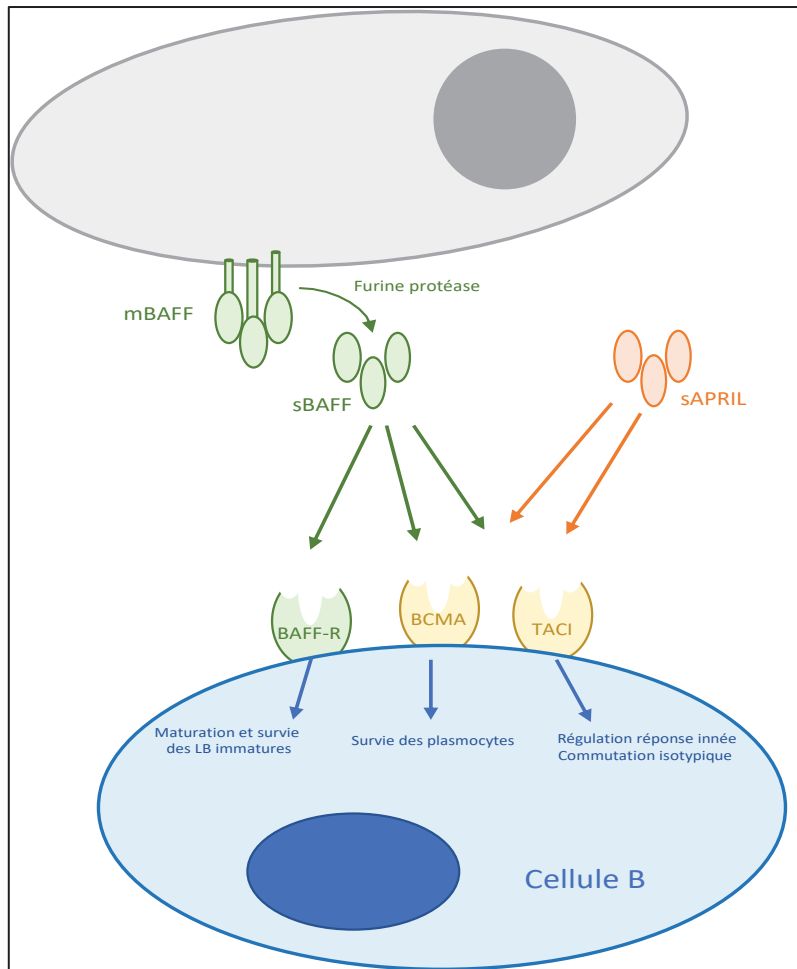


Figure 2 : Schéma simplifié du système BAFF/APRIL et ses récepteurs

2.2. Importance particulière de BAFF-R

Le récepteur de BAFF (BAFF-R) est codé par le gène TNFRSF13C (situé sur le chromosome 13 chez l'homme) et est l'un des principaux récepteurs anti-apoptotique dans les cellules B.

Structurellement, BAFF-R est un représentant atypique de la superfamille des récepteurs au TNF. Les membres de cette famille sont généralement caractérisés par plusieurs domaines extracellulaires riches en cystéine (CRD), qui servent à la liaison avec le ligand, ainsi qu'à l'assemblage des monomères du récepteurs en dimères, trimères ou multimères (Naismith and Sprang, 1998). Contrairement à la plupart des

autres membres de la famille TNF-R, BAFF-R ne contient qu'un CRD partiel, qui sert à la liaison du ligand ainsi qu'à l'auto-assemblage (*Pieper et al., 2014*).

L'expression de BAFF-R, durant l'ontogénie B, commence lorsque les cellules B immatures se développent en cellules B transitionnelles (*Mihalcik et al., 2010*). Ces dernières reçoivent des signaux de survie dépendants de BAFF-R pour les sauver de la mort cellulaire prématurée (*Naismith and Sprang, 1998; Ng et al., 2004*). Au niveau protéique, le BAFF-R est exprimé à la surface de tous les sous-ensembles de cellules B périphériques humains à l'exception des plasmocytes et des centroblastes (situés dans la zone sombre des centres germinatifs). Son expression est régulée à la hausse après l'expression du BCR en réponse à la signalisation tonique de ce dernier, ce qui améliore l'expression de BAFF-R par les LB immatures et transitionnels (*Rowland et al., 2010*).

Bien que l'induction de l'expression de BAFF-R semble dépendre de l'expression des récepteurs fonctionnels des lymphocytes B, elle peut être maintenue chez la souris après l'ablation de SYK (Tyrosine-proteine kinase), un élément clef de la signalisation BCR (*Hobeika et al., 2015*), ainsi que dans les cellules qui ont été déplétées en Ig- α (CD79A), un composant essentiel du BCR (*Levit-Zerdoun et al., 2016*). Entraînant dans les deux cas la survie des LB, mais avec une signalisation du BCR altérée.

Une délétion homozygote dans l'exon 2 de son gène, conduit à un blocage presque complet du développement des cellules B au stade des cellules B immatures/transitionnelles. L'immunodéficiences qui en résulte est caractérisée par une lymphopénie B, une agammaglobulinémie (déficit dans la synthèse des Ig) et une altération des réponses immunitaires humorales. Cependant, à la différence des mutations affectant les composants de la voie couplés à la signalisation du BCR, les cellules B déficientes en BAFF-R peuvent toujours se développer en plasmocytes sécrétant des IgA. Par conséquent, le déficit en BAFF-R chez l'homme est caractérisé par très peu de cellules B circulantes, de très faibles concentrations sériques d'IgM et d'IgG mais des niveaux d'IgA normaux ou élevés (*Smulski and Eibel, 2018*).

3. Différenciation dans les organes lymphoïdes secondaires

L'immunopoïèse correspond aux étapes finales de différenciation du LB. Ces étapes ont lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires (OL II^{aires}).

Les LB vont pouvoir suivre deux voies différentes : une voie indépendante de l'Ag, permettant la génération d'une réponse rapide et peu spécifique ; et une voie dépendante de l'Ag nécessitant de passer par le centre germinatif (CG) et par différentes étapes de maturation supplémentaires, pour *in fine* former des LB matures avec une haute affinité pour l'Ag et sécrétant des Ac très spécifiques.

3.1. *Maturation indépendante de l'antigène dans la rate*

La rate est anatomiquement composée de 2 tissus distincts. La pulpe rouge lieu de destruction des globules rouges âgés, car le premier rôle de cet organe est un rôle de filtration. La pulpe blanche est, quant à elle, le siège des fonctions immunitaires (immunopoïèse) de la rate, de même que celles des ganglions. Elle intervient dans l'immunité humorale et dans l'immunité cellulaire.

3.1.1. Lymphocyte B transitionnel

Une fois que le LB en maturation acquiert un BCR fonctionnel, il va devenir un LB transitionnel et va migrer de la MO à la rate (pulpe blanche). Le LB transitionnel est un acteur essentiel au maintien de la tolérance périphérique, en supprimant certaines actions effectrices des LT, notamment par le biais de la sécrétion d'IL10 (interleukine 10) (*Bouaziz et al., 2008; Mauri and Bosma, 2012*). Les fonctions régulatrices des différents sous-types de LB, dont celles des LB transitionnels, seront développées plus tardivement dans ce manuscrit.

Chez la souris, les LB transitionnels sont caractérisés par l'apparition à leur surface de l'immunoglobuline IgD et du récepteur CD21, molécule faisant partie du complexe CD19/CD21/CD81. Ce dernier a un rôle important dans la réponse humorale innée. Les LB transitionnels sont divisés en plusieurs sous-types : les LB transitionnels 1 (T1),

correspondant aux cellules provenant de la MO, exprimant à leur surface IgM^{high} CD21^{neg} et IgD^{neg}. Les LB T1 se différencient rapidement, dans la rate, en LB transitionnels 2 (T2) IgM^{high} CD21^{high} et IgD^{high}. Le récepteur CD23 (récepteur de faible affinité aux IgE) est également présent sur les T2, ce qui n'était pas le cas au stade T1 (*Carsetti et al., 2004*). Il existe un troisième sous-type de LB transitionnels, les T3, qui sont des cellules anergiques avec une expression faible des IgM de surface (*Allman et al., 2001*). Chez l'homme, la provenance, la localisation et le réel stade de différenciation des LB T3 sont très peu décrits (*Chung et al., 2003*). Pour certains, ces cellules sont considérées comme des LB transitionnels tardifs avec un phénotype mixte, entre le LB T2 et le LB mature. Pour autant, aucune étude fonctionnelle n'a pu mettre en évidence la différenciation des LB T2 en LB T3.

Le marqueur CD93 peut également être utilisé dans la caractérisation des LB transitionnels, car c'est une molécule seulement exprimée par les cellules B de la MO, ainsi que par les cellules immatures transitionnelles de la rate (*Allman et al., 2001*)

Chez l'homme, les LB transitionnels sont caractérisés grâce aux marqueurs CD24 et CD38 plus fortement exprimé que chez les LB matures (*Sims et al., 2005*). Dans le sang, les LB transitionnels co-expriment à leur surface IgM et IgD et sont CD24^{high} CD38^{high}. (*Carsetti et al., 2004*). Ils expriment également les marqueurs CD21, CD23 et la L-sélectine (sélectine leucocytaire : molécule ayant différents rôles, notamment dans les reconnaissances intercellulaires et les phénomènes d'adhérence).

Chez l'homme, lorsque l'on souhaite étudier les populations de LB transitionnels, au niveau de la rate, il est admis d'utiliser les mêmes marqueurs qu'utilisés classiquement chez la souris, tels que l'IgM, le CD21, le CD24 et le CD23 (*Benitez et al., 2014; Palanichamy et al., 2009*).

3.1.2. Lymphocyte B mature et naïf

Les LB transitionnels vont ensuite évoluer en cellules matures appelées cellules folliculaires ou naïves. Il existe 2 sous-types de cellules B naïves : les FO I (folliculaire

I) qui sont IgD^{high} IgM^{low} et, les FO II exprimant fortement l'IgD et l'IgM. (*Cariappa et al., 2007*).

La population FO I nécessite un signal via son BCR médié par la protéine Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), ce qui n'est pas le cas pour les cellules FO II, qui sont Btk indépendantes. Cette observation a permis de montrer que les FO I dériveraient des cellules T2 grâce à une sélection positive par l'Ag et un signal transduit du BCR via Btk. A l'inverse, les FO II se développeraient à partir des LB transitionnels qui n'auraient pas rencontré d'Ag du soi et n'auraient reçu aucun signal via le BCR. Les FO II garderaient une plasticité leur permettant de se différencier en FO I selon certains signaux. (*Pillai and Cariappa, 2009*).

3.1.3. Lymphocyte B de la zone marginale

Comme mentionné précédemment, la rate est divisée en deux compartiments distincts, la pulpe rouge et la pulpe blanche. La frontière séparant les deux pulpes est appelée la zone marginale (ZM), dans cette zone résident des lymphocytes B possédant un phénotype et des caractéristiques fonctionnelles spécifiques (appelés LB de la ZM) ainsi que des macrophages exclusifs à cette zone. Il existe deux types de macrophages dans la ZM : les macrophages métallophiliques, ayant pour fonction de détoxifier le sang de molécules exogènes et les macrophages de la ZM, participant à la récupération des Ag, ainsi qu'à leur présentation aux LB de la ZM. La ZM peut également accueillir transitoirement d'autres cellules immunitaires, comme des cellules dendritiques (DC), des LT et ou même des LB mémoires, mais seulement sous certaines conditions d'activation. Cette localisation spatiale de la ZM, lui confère la particularité de recevoir une partie du flux artériel splénique, qui lui apporte à la fois les Ag et les cellules immunocompétentes (*Plonquet, 2013*).

La migration de la ZM vers le follicule (et du follicule vers la ZM) est donc tout à fait possible. Elle se fait par l'expression ou non de certaines molécules. En effet, quand le LB exprime à sa surface les récepteurs S1P1 et S1P3 (Sphingosine-1-phosphate), il reçoit un signal le maintenant dans la ZM. Une fois que la cellule n'exprime plus ces 2 récepteurs, elle va naturellement être attirée par le gradient de CXCL13 (chimiokine

à motif C-X-C), ce qui va les faire migrer vers le follicule. Lorsqu'elle exprimera de nouveau S1P1 et S1P3, elle retournera dans la ZM (*Cinamon et al., 2008*).

Les LB de la ZM sont des cellules participant à la réponse immune précoce. Ils ont la particularité d'exprimer fortement les récepteurs au complément (CD21 et CD35), ce qui leur permet de fixer des Ag opsonisés (*Ferguson et al., 2004; Gray et al., 1984*). Un Ag opsonisé est un Ag qui a été reconnu et lié par une opsonine (Ac ou facteur C3b du complément). Ce sont également des cellules sécrétrices d'Ac, (ASC pour *Antibody secreting cells*) mais répondant à des *stimuli* indépendants des LT. En effet, les LB de la ZM peuvent produire et sécréter, de façon très rapide, des IgM en cas de stimulation par des bactéries encapsulées. Ces LB de la ZM migrent en seulement quelques heures dans la pulpe rouge, où elles peuvent directement sécréter leurs Ig dans le flux sanguin. Une réponse massive est obtenue en moins de 48 h (*Plonquet, 2013; Weller et al., 2005*).

Les LB de la ZM seraient les principales cellules sécrétrices d'IgM naturelles sériques chez l'homme. Parmi ces dernières, il a été mis en évidence que certaines étaient à potentiel auto-réactif. Différents travaux expérimentaux suggéreraient que la ZM serait un lieu de sauvetage pour les LB faiblement auto-réactifs. Ceux qui ne seraient pas entrés dans la voie de différenciation conventionnelle du CG et, qui seraient normalement orientés vers la mort cellulaire (*Martin and Kearney, 2002*).

Les LB de la ZM peuvent diversifier leurs récepteurs, via différents mécanismes :

- Grâce à des cellules dites « helper » comme les neutrophiles ou les ILC (Innate Lymphoid cell) (*Hillion et al., 2019; Puga et al., 2011*).
- Via la migration des LB issus du centre germinatif (CG) dans la ZM.

Les LB de la ZM sont caractérisés phénotypiquement par les marqueurs IgM^{high} IgD^{low} CD21^{high} CD23^{low} CD1d^{high} chez la souris (*Martin and Kearney, 2002*), et par CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺ IgM⁺ chez l'homme. Les LB de la ZM se différencient grâce à leur BCR et la voie NOTCH. S'il n'y a pas d'activation de voie NOTCH chez le LB en développement, ce dernier s'orientera vers une différenciation en LB folliculaire. Une mutation de la voie NOTCH2, par une activation ou la levée d'une inhibition, a pour

conséquence l'augmentation de la fréquence de lymphome et également l'augmentation du nombre de LB de la ZM. (*Saito et al., 2003*).

L'absence ou le déficit en LB de la ZM est caractérisé par une susceptibilité accrue aux bactéries encapsulées, ce qui est le cas pour les individus splénectomisés ou les jeunes enfants (la ZM se met en place qu'après l'âge de deux ans) (*Plonquet, 2013*). Après splénectomie, il y a donc disparition de la population de LB de la ZM, car la rate est le lieu essentiel à leur développement (*Zouali and Richard, 2011*). Néanmoins, il a été mis en évidence que, certains LB de la ZM, pouvaient être présents dans la circulation sanguine. Ces LB seraient caractérisés par la présence, à la surface des cellules CD19+, des deux marqueurs CD27 et IgD.

3.2. *Maturation dépendante de l'antigène (organes lymphoïdes secondaires)*

L'une des règles fondamentales de l'immunité adaptative, est que des lymphocytes naïfs spécifiques de l'Ag ne peuvent être activés en présence de l'Ag seul. Les cellules T naïves ont besoin de signaux de co-stimulation de la part des cellules présentatrices de l'antigène spécialisées (1^{er} signal d'activation), et les cellules B naïves ont besoin dans le cas d'une réponse B thymo-dépendante, des signaux de co-stimulation provenant des LT.

La sécrétion d'Ac par les LB, suite à une stimulation par des protéines antigéniques, nécessite une coopération des cellules T auxiliaires. Les cellules B deviennent des cibles pour les LT lorsqu'elles présentent, via son CMH-II, l'Ag préalablement internalisé (*Lanzavecchia, 1985; Plonquet, 2013; Rock et al., 1984*). Les LT qui reconnaissent le complexe CMH-peptide sur le LB, vont d'une part recevoir leur second signal d'activation et d'autre part fournir aux LB les co-signaux nécessaires à sa prolifération et à sa différenciation. Ce phénomène est appelé reconnaissance croisée. Cela implique qu'avant que la cellule B ne produise des Ac spécifiques d'un pathogène donné, des LT CD4+ spécifiques du même pathogène doivent d'abord être activés. (*McHeyzer-Williams et al., 2001*)

La nécessité d'avoir une reconnaissance croisée de l'Ag reconnu par les cellules B et les cellules T a des conséquences pour la régulation de la réponse humorale. La première implication de ce mécanisme concerne le maintien de la tolérance au soi. En effet, les LT auto-réactifs ne peuvent pas stimuler les LB spécifiques d'auto-Ag. Cette absence de co-stimulation participe au contrôle des LB auto-réactifs (*Lindhout et al., 1997*).

3.2.1. Formation du centre germinatif

Le centre germinatif se forme environ 9 à 30 jours après la rencontre antigénique, avec un pic entre 9 et 14 jours (*Zotos and Tarlinton, 2012*). Cette structure est nécessaire au développement du lymphocyte B en rendant son récepteur plus affiné à un Ag donné. C'est au niveau du centre germinatif que la différenciation terminale, en LB mémoire ou plasmocyte, a lieu.

Le centre germinatif est composé de deux zones distinctes. La zone claire (LZ pour *light zone*) et la zone sombre (DZ pour *dark zone*). Cette caractérisation anatomique a été faite en 1885 par Flemming, il a mis en évidence que la zone sombre était un lieu de prolifération intense des cellules B appelées centroblastes et, que la LZ était le lieu de la sélection par l'Ag, les lymphocytes B y sont appelés centrocytes. On retrouve également, en plus des lymphocytes B, d'autres cellules dans la LZ : les cellules dendritiques folliculaires (CFD) et les Tfh. Ces cellules vont être nécessaires à la maturation correcte des LB.

3.2.2. Centroblastes/centrocytes

Peu de jours après le contact avec l'Ag, une croissance exponentielle de cellules B dans le centre des follicules est observée (phase proliférative). Ces cellules commencent à se développer en grandes cellules avec un cytoplasme abondant, ce sont les blastes B primaires. Ces blastes primaires vont pousser, les petites cellules au repos, vers la ZM des follicules.

Quelques jours plus tard, les blastes s'accumulent dans la région basale du follicule (DZ). Les blastes (centroblastes) se divisent en moyenne une fois toutes les 7 heures ; néanmoins, leur nombre n'augmente pas puisqu'ils se transforment immédiatement en petites cellules avec un noyau globulaire (centrocyte) et quittent la DZ pour migrer dans la seconde zone du centre germinatif la LZ.

Le passage de centroblastes à centrocytes est plutôt considéré comme une alternance de deux états transitoires que, réellement, deux étapes de différenciation distinctes (Allen et al., 2007; Victora et al., 2010). Il est possible de distinguer les deux, par la variation d'expression de différents marqueurs de surface. Les centroblastes sont CXCR4^{high} CD83^{low} CD86^{low} alors que les centrocytes sont CXCR4^{low} CD83^{high} CD86^{high} (Allen et al., 2007; Victora et al., 2010).

Au niveau de la LZ, une interaction de forte affinité entre le centrocyte et une CFD présentatrice de l'Ag est nécessaire pour la survie du précurseur B (Manser, 2004). Cette CFD va permettre de piéger l'Ag, afin d'exposer ses sites antigéniques et de pouvoir être reconnu par le LB. Le LB va ensuite pouvoir tester son affinité pour l'Ag, en l'internalisant et en le présentant aux Tfh.

Les cellules Tfh fournissent aux centrocytes un signal de survie supplémentaire. Si la cellule B ne reçoit pas les signaux de survie nécessaires, notamment par un manque d'affinité avec l'Ag, celle-ci, au niveau de la frontière entre la LZ et la DZ, rentre en apoptose. Les centrocytes sont naturellement programmés pour mourir, à moins qu'ils ne reçoivent ces signaux de survie. Ils expriment constitutivement des protéines pro-apoptotiques, comme FAS (APO-1 ou CD95 ; famille du récepteur du TNF) et Bax (Bcl-2-associated X), et très peu de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Plonquet, 2013).

Les centrocytes sélectionnés retournent alors dans la DZ et entrent dans une nouvelle phase de division sous forme de centroblastes. Les mutations ponctuelles peuvent accroître l'affinité des Ig de surface pour l'Ag. Par exemple, la substitution d'un seul acide aminé peut augmenter l'affinité d'un facteur 10. Ce mécanisme sert donc à sélectionner les cellules B produisant les Ac ayant la meilleure affinité pour l'Ag concerné (Lindhout et al., 1997).

Les migrations des cellules B de la DZ à la LZ sont possibles grâce à une expression différente des récepteurs aux chimiokines. Les cellules exprimant CXCR4 vont pouvoir être sensibles à la chimiokine CXCL12 sécrétée par les cellules stromales réticulaires présentes dans la DZ (*Bannard et al., 2013*). En revanche, les cellules possédant à leur surface CXCR5, vont plutôt être sensible à CXCL13 produite par les FDC de la LZ (*Allen et al., 2004; MacLennan, 1994*).

3.3. *Rôle des Tfh dans l'établissement de la réponse humorale T dépendante*

La différenciation et la survie du LB dépendent étroitement de l'établissement d'une collaboration stable et intense entre lymphocytes Tfh et LB.

Avant que le CG ne se forment, un processus d'activation et de différenciation B est nécessaire, mais pas seulement. En effet, le Tfh doit également recevoir plusieurs signaux avant de pouvoir exercer son rôle essentiel dans la sélection des clones B ultra spécifiques.

3.3.1. *La genèse du Tfh et son rôle dans la mise en place du centre germinatif*

Au niveau des OL II^{aires}, lors d'arrivée d'une protéine antigénique les cellules dendritiques conventionnelles vont le reconnaître et l'internaliser afin d'exprimer un peptide antigénique à sa surface via ses molécules du CMHII. Le lymphocyte CD4⁺ naïf arrive dans les OL II^{aires} grâce à l'expression de CCR7, le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, attirant grâce à son gradient le LT dans la zone T de cet organe (figure 3).

Une fois dans la zone T, le LT naïf va pouvoir reconnaître le peptide exprimé sur le CMHII de la CPA, grâce à son TCR. Cette liaison entre DC et LT, va entraîner l'activation de ce dernier et la diminution de l'expression de CCR7 à sa surface. Ce phénomène se contrebalance par une augmentation de l'expression de CXCR5, également appelé CD185 ou récepteur de lymphome de Burkitt 1 (BLR1) (*Haynes et*

al., 2007) récepteur de la chimiokine CXCL13, responsable de la migration dans la zone B. Le LT va donc migrer de la zone T aux abords du follicule (figure 3).

AU même moment, au niveau du follicule, le LB rencontre également l'Ag. Si l'Ag est de faible poids moléculaire il va pouvoir rentrer directement dans le follicule via des conduits. En revanche, si l'Ag est de haut poids moléculaire, il sera emmené dans le follicule, soit par des macrophages s'il se situe au niveau du sinus subcapsulaire, soit par des DC s'il est au niveau de la medulla. Le LB naïf arrive dans le follicule grâce à l'expression de CXCR5, il y reconnaît l'Ag grâce à son BCR. Le LB internalise la protéine Ag et, comme la DC, exprime à la surface de son CMHII le même peptide antigénique. Ce mécanisme entraîne l'activation du LB et la diminution d'expression à sa surface de CXCR5 pour exprimer CCR7. Inversement au LT, le LB va migrer du follicule vers la zone T (figure 3).

Le LT auxiliaire va pouvoir reconnaître l'Ag, grâce à son TCR, présenté par le LB via son CMH. Ce mécanisme consiste le premier signal de co-stimulation. D'autres molécules rentrent en compte dans cette liaison - qui seront listées et détaillées plus loin dans le manuscrit - composant le second signal de co-stimulation (figure 3). Lorsque le signal entre LT auxiliaire et LB est assez fort, principalement grâce à la liaison CD40/CD40L, ces cellules vont pouvoir former le focus extra-folliculaire. C'est à ce niveau que le LB peut, ou non, se différencier en plasmocytes à courte durée de vie.

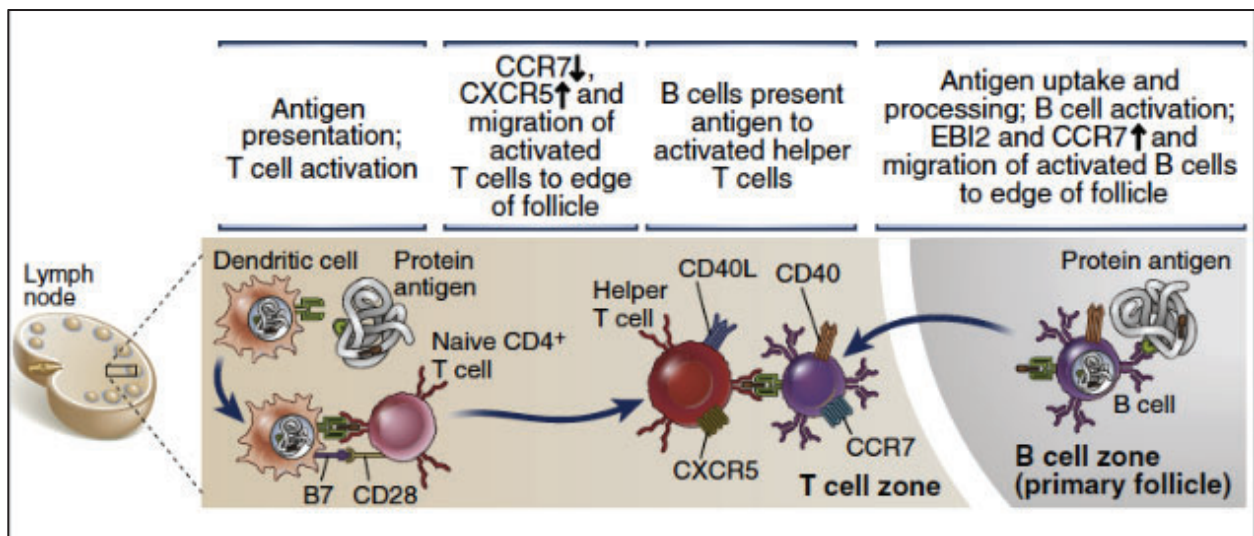


Figure 3: Schéma du processus précoce de collaboration LT / LB au niveau des OL Iliaires.

Représentant les activations parallèles du LT auxiliaire au niveau de la zone T d'une part et, du LB au niveau du follicule d'autre part. Ces deux activations mènent à la présentation antigénique du LB au LT activé (adapté de Abbas, Lichtman, and Pillai. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition)

Le LB en se liant au Tfh via la liaison ICOS/ICOSL, va entraîner un signal intracellulaire à l'intérieur du LT, consistant à induire l'expression du facteur de transcription Bcl6 (B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 6), longtemps considéré comme spécifique de la lignée B, s'avère être l'un des acteurs principaux de la différenciation Tfh (Nurieva *et al.*, 2009). Une fois ce facteur exprimé dans le LT auxiliaire ce dernier va se différencier en Tfh et migrer au niveau du CG (figure 4).

Les Tfh sont donc caractérisés par la forte expression de PD1 (*programmed cell death 1* ou CD279) et ICOS (*inducible costimulator* ou CD278), mais également CD40L ou encore OX40 (ou CD134). Ces molécules sont impliquées dans la synapse immunologique formée avec le LB. Les Tfh, par leur interaction avec les LB vont permettre leur survie, prolifération et différenciation (Fazilleau *et al.*, 2009).

Le Tfh exprime différentes molécules de surface, permettant de s'amarrer au LB, mais il est également capable de sécréter différentes cytokines nécessaires à la génération de LB du CG, notamment l'IL 21. Cette cytokine, une fois sécréter, va se lier à son récepteur (IL21R) présent à la surface du LB, ce qui va entraîner l'expression de Bcl6, cette fois-ci dans le LB. Ce phénomène va entraîner la différenciation du LB en LB du CG, et sa migration à cet endroit (figure 4).

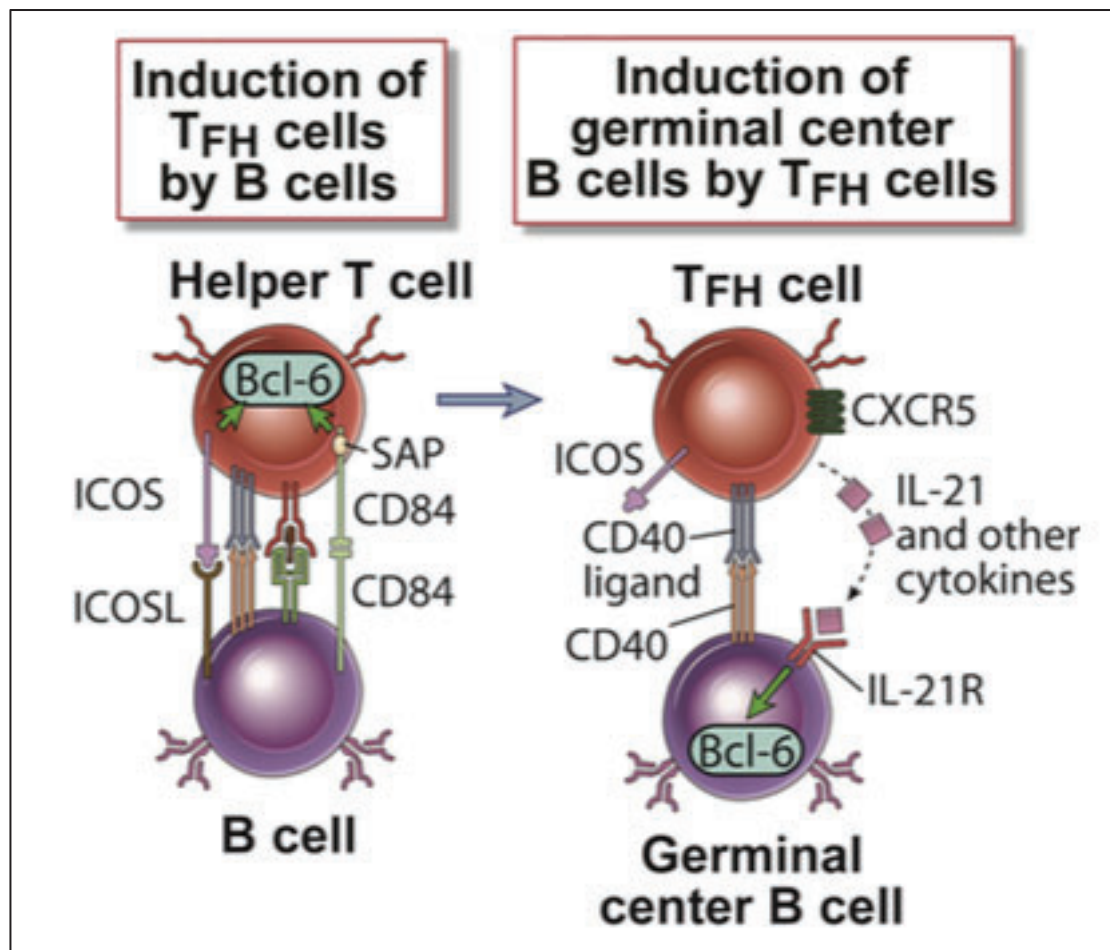


Figure 4: Schéma montrant une collaboration LT / LB à double sens et les molécules impliquées (adapté de Abbas, Lichtman, and Pillai. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition)

3.3.2. Les fonctions du Tfh

La fonction principale du Tfh est la mise en place et le maintien d'un CG fonctionnel, en permettant aux LB de se différencier en LB mémoires ou plasmocytes.

La sécrétion cytokiniques – notamment l'IL21, l'IL17 et l'IL4 - est un des moyens de communication intercellulaire utilisé par les Tfh pour interagir avec les LB (Crotty, 2011).

Le second mode d'interaction entre les Tfh et les LB est le contact intercellulaire direct. En effet, les molécules de co-stimulation (CD40/CD40L, PD1/PDL1 et ICOS/ICOSL) jouent un rôle essentiel dans la formation de CG fonctionnels par le déclenchement de signaux de survie et de prolifération chez les LB au sein du CG.

Rôle des molécules de costimulation dans la réponse humorale T-dépendante :

La coopération Tfh/ LB permettant de sélectionner des clones B de haute affinité a lieu au niveau de la LZ du CG. En effet, les clones B présentant le mieux l'Ag au Tfh seront sélectionnés. Cette coopération entre ces deux cellules se fait grâce à l'interaction entre différentes molécules exprimées à leur surface (figure 5) :

CD40/CD40L

L'interaction entre les molécules CD40L (à la surface du lymphocyte Tfh) et CD40 (à la surface du LB) est nécessaire à la formation des centres germinatifs. Cette interaction permet l'induction de la prolifération B (*Bolduc et al., 2010; Kurosaki et al., 2015; Lindhout et al., 1997*).

L'interaction CD40/CD40L et l'activation via le BCR sont impliquées dans l'induction de c-myc, molécule impliquée dans la maintenance et la survie des LB dans le centre germinatif. Un déficit en CD40L (aussi appelé CD154) entraîne un syndrome d'hyper IgM, bloquant les LB dans un stade de maturation précaire. (*Banchereau et al., 1994*)

ICOS/ICOSL

La molécule ICOS (*Inducible T-cell Costimulator*) est exprimée à la surface du Tfh et se lie à son ligand, qui est ICOSL (*Inducible T-cell Costimulator ligand*), lui-même exprimé à la surface du LB de façon constitutive. La liaison d'ICOSL des LB avec son récepteur ICOS, permet la différenciation de ces derniers en plasmocytes (*Inamine et al., 2005; Liu et al., 2015*). En effet, cette molécule permet de mettre en place entre LB et Tfh, une coopération essentielle dans les processus de différenciation et de maturation du LB. Cette interaction, entre ICOS et ICOSL, joue un rôle dans la sélection positive des clones B de haute affinité (*Hutloff et al., 1999*).

PD1/PDL1

La molécule PD1 (*Programmed death 1*) est elle aussi exprimée à la surface du lymphocytes Tfh et se lie à différents ligands, tels que PDL1 (*Programmed death-ligand 1*) et PDL2 (*Programmed death-ligand 2*). PDL1 est exprimé à la surface du LB et permet d'accentuer la coopération active de ce dernier avec les Tfh. L'absence de cette liaison (PD1/PDL1) altère considérablement la formation de plasmocytes à longue durée de vie (*Good-Jacobson et al., 2010; Suan et al., 2017*), par la diminution de la survie des cellules B du CG, mais également la maturation d'affinité, la sélection et la différenciation de ces LB (*Good-Jacobson et al., 2010*).

CD28/B7

Après le premier signal d'activation, la molécule CD28 exprimée à la surface du LT va interagir avec les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et sera responsable de la délivrance du second signal entraînant une réponse immunologique complète et soutenue. Cette liaison aura pour conséquence une accumulation intracellulaire de facteurs de transcription comme AP-1, ou NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*), une production d'interleukine 2 (IL2) et de différents interférons (IFN), conduisant à une augmentation des divisions cellulaires et à la prolifération lymphocytaire.

Rôle de l'IL21

L'IL21, sécrétée par les Tfh, est la principale cytokine responsable de la différenciation en plasmocytes (*Suan et al., 2017*). Cette cytokine permet une prolifération accrue des LB mais, également, le phénomène de commutation isotypique. Cette cytokine est impliquée dans l'induction de l'expression de Bcl6 par les LB. C'est Bcl6 qui va permettre l'orientation des LB dans la voie dépendante du CG. En effet, s'il n'y a pas de signal via l'IL21, et seulement par la liaison CD40/CD40L, le LB entrera dans une phase de différenciation extra-folliculaire, indépendante du CG. (*Kurosaki et al., 2015*). L'absence d'IL21 conduit à une nette dégradation de l'immunité B et des CG (*Zotos et al., 2010*).

L'IL21, en synergie avec le signal médié par le CD40/CD40L, induit une augmentation de l'expression de Blimp-1 chez les LB (facteur de transcription fortement exprimé par les plasmocytes). L'IL21 seule peut induire une légère augmentation de Blimp-1, via l'activation d'IRF4 (acteur 4 régulateur de l'interferon), ce qui n'est, en revanche, pas le cas pour le CD40L (Ding et al., 2013). Cette induction montre de nouveau le rôle accru qu'ont ces deux molécules dans le processus de différenciation et de maturation des LB.

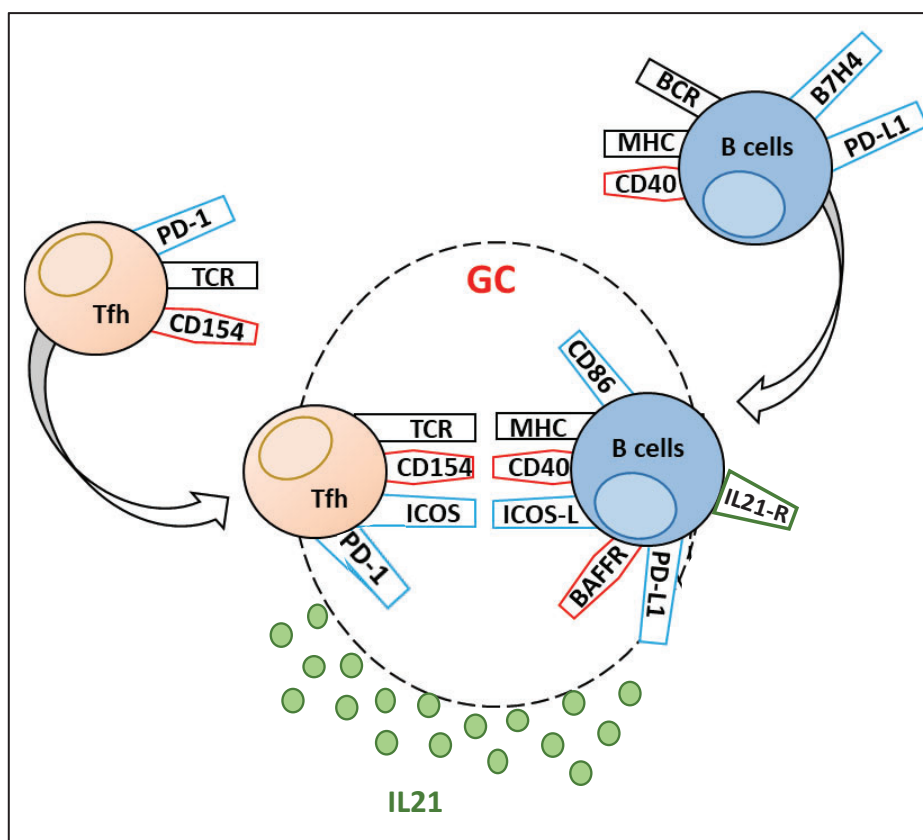


Figure 5 : Schéma représentant les principales molécules impliquées dans le contact entre lymphocyte Tfh et lymphocyte B au niveau du centre germinatif (GC).

MHC: Major histocompatibility complex; CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4; BCR: B cells receptor; TCR: T cells receptor; ICOS: inducible T cells costimulatory; ICOS-L: ICOS ligand; PD-1: program death ligand; PD-L: PD-1 ligand; IL21: interleukine 21; (adapté de (Leibler et al., 2019a))

3.3.3. Hypermutation somatique

L'hypermutation somatique est un phénomène permettant de rendre le LB plus spécifique et augmente son affinité avec l'Ag. Ce phénomène n'a lieu que dans le CG,

au niveau de la DZ, grâce à l'enzyme AID (Activation-induced cytidine désaminase). Cette enzyme permet d'effectuer des mutations ponctuelles au niveau des domaines variables de l'immunoglobuline (Kohli *et al.*, 2009). Ce phénomène conduira à la sécrétion par les LB d'immunoglobulines de très haute affinité.

3.3.4. Commutation isotypique

Cette étape est responsable de la maturation finale des Ig. Effectivement, la commutation isotypique ou commutation de classe, comme son nom l'indique, permet de changer l'isotype des Ig produites par le LB. Cette modification a lieu, au niveau de la chaîne lourde de l'Ig, sur laquelle se forme des cassures double-brin de l'ADN. Ce mécanisme, étant très dangereux et pouvant être très délétère pour la cellule, est hautement contrôlé.

La commutation isotypique permet la synthèse par les cellules B de différents types d'Ig. Ce dernier est déterminé par les cytokines, que les Tfh sécrètent dans les régions folliculaires, avec lesquelles le LB rentre en contact. L'IL4 va orienter une commutation de classe vers les IgG1 et les IgE, l'IFN γ va lui axer vers les IgG2A, alors que le TGF β (transforming growth factor beta) permet la synthèse d'IgA (Reinhardt *et al.*, 2009).

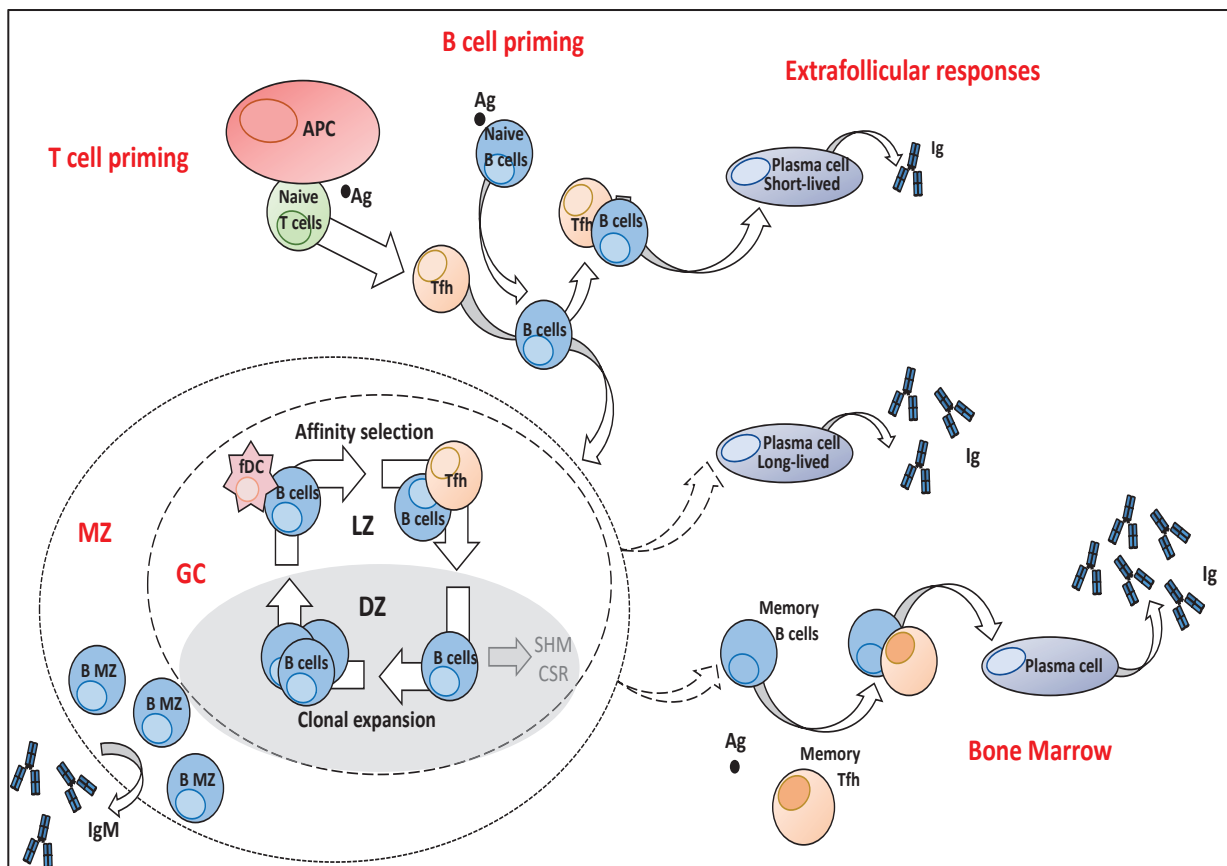


Figure 6 : Acteurs et processus cellulaires impliqués dans la mise en place d'un centre germinatif et la naissance de cellules B matures.

En bref, la reconnaissance de l'antigène active les cellules B et les cellules Tfh. En fonction de l'affinité de l'interaction des cellules Tfh / B, cette activation peut générer une réponse extra-folliculaire produisant une Ig de faible affinité, ou alors, cette activation conduit à la formation d'un centre germinatif. À la fin des processus du centre germinatif, 2 types d'effecteurs vont émerger : les LB mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie. Ig: Immunoglobuline Ag: antigène; APC: antigène-présentant cells; DZ: Dark Zone; GC: germinal center; LZ: light zone; Tfh: T follicular helper cells; B MZ: B cells marginal zone; SHM: Somatic hypermutation; CSR: class-switch recombination (adapté de Leibler et al., 2019).

Le rôle d'AID :

AID, comme mentionné précédemment, est une enzyme désaminase permettant de remplacer une cytidine (base de l'ADN) en une base uracile (base normalement présente dans l'ARN), entraînant ainsi des mutations ponctuelles. L'activation d'AID se fait lorsque le LB et le Tfh se lient par leur liaison CD40/CD40L au niveau de la LZ. Cette liaison a lieu afin de tester les différents clones B et leur forte affinité pour l'Ag.

Ces mutations vont créer des mésappariements de base au niveau des domaines variables gènes codant pour les immunoglobulines, activant ainsi différents mécanismes de réparation au sein de la cellule B.

Le premier mécanisme pouvant être activé est le « mismatch repair », consistant à remplacer la paire de base erronée par une autre de façon aléatoire. Ce mécanisme entraîne donc des mutations ponctuelles, à la base du phénomène d'hypermutations somatiques, conduisant à une sécrétion d'Ig de très forte affinité pour son Ag (figure 7).

Un autre mécanisme de réparation peut être mis en place après l'action d'AID. Il s'agit du mécanisme de « base excision repair », qui consiste, non plus à retirer une paire de base, mais un morceau de séquence entier. Ce mécanisme est à la base du switch isotypique (figure 7). En effet, une fois AID activé par la liaison CD40/CD40L entre le LB et le Tfh, un signal de coupure va être envoyé, afin de transformer l'Ig de base (IgM) en une autre Ig (G, E ou A).

Un déficit en AID conduit à un phénotype à prédominance IgM, connu sous le nom de d'immunodéficience hyper IgM de type 2, car les mécanismes d'hypermutations somatiques et de commutation de classe des Ig ne peuvent avoir lieu.

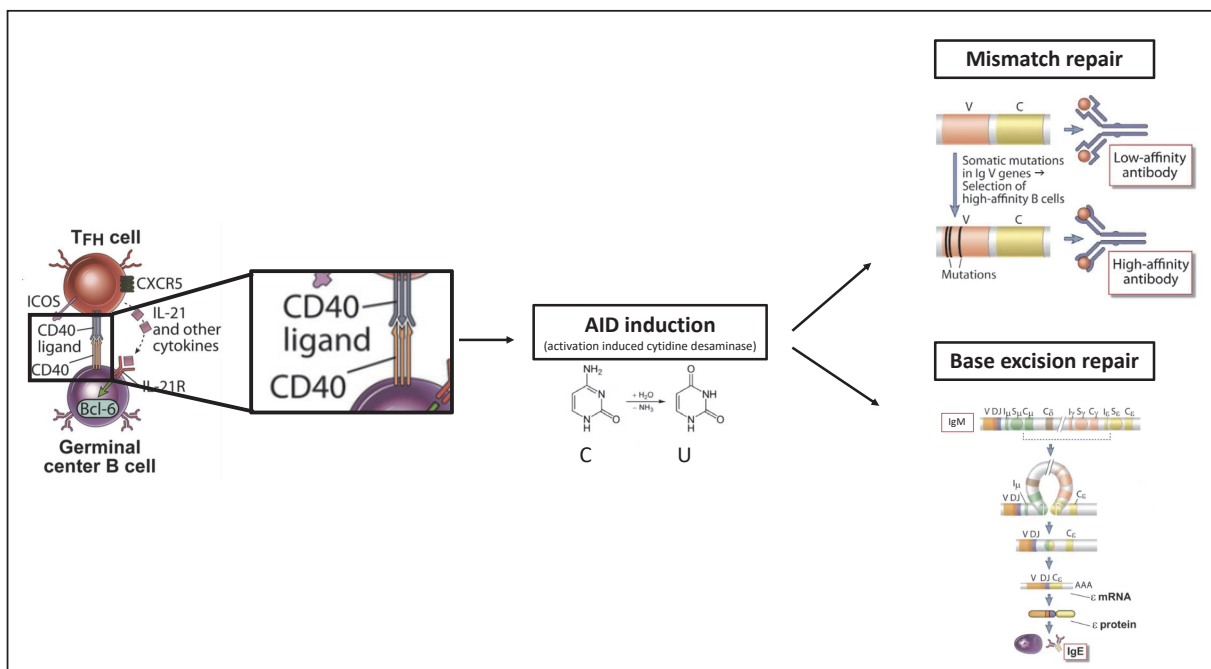


Figure 7: schéma représentant les différents mécanismes de réparations pouvant être mis en place par le LB, après activation d'AID (adapté de Abbas, Lichtman, and Pillai. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition)

B. Les lymphocytes B matures (maintien de la mémoire immunitaire et rappel antigénique)

Deux populations vont naître de cette maturation du LB dans le CG. Les LB mémoires (BM) qui sont des cellules très affines pour leur Ag et les plasmocytes (PC) cellules sécrétrices d'Ac. Ces derniers sont considérés comme ayant atteint le stade ultime de maturation B. Les cellules mémoires vont rester dans les OL II^{aires}, tandis que les ASC vont rejoindre la MO (Plonquet, 2013).

1. Généralités sur les lymphocytes B matures

1.1. Lymphocytes B mémoires

Les BM sont des cellules à longue durée de vie, en effet elles peuvent survivre très longtemps avant la rencontre avec son Ag. Il a été mis en évidence, dans la rate, la présence de BM plus de 30 ans après la dernière rencontre avec son Ag (Mamani-Matsuda et al., 2008). Ce sont des cellules caractérisées par leur haute affinité avec leur Ag, se traduisant par une activation de la cellule même en présence d'une très faible quantité d'Ag. Les BM sont des cellules avec un haut potentiel prolifératif, capables de se différencier en plasmocytes, très rapidement, pour répondre plus rapidement et de façon plus intense, à l'Ag (réponse secondaire) (Pape et al., 2011).

Le BM humain, exprime typiquement à sa surface le CD27 (Klein et al., 1998), contrairement au BM murin, pour qui, le CD27 est un très mauvais marqueur pour caractériser les BM (Anderson et al., 2007). Les BM peuvent être mis en évidence, chez la souris, par la co-expression, à différentes intensités, des marqueurs CD80, CD73 et PDL-2 (pour *program cell death 1 ligand 2*, aussi appelé CD273) (Tomayko et al., 2010). Il existe au moins 5 sous-ensembles de BM murins, caractérisés, non pas seulement par la présence d'Ig (switchés ou non), mais par la variation d'intensités des 3 marqueurs mentionnés précédemment. Les sous-classes de BM murins présentent une ontogénie et un stade de maturation différents les uns des autres (Tomayko et al., 2010).

Chez l'homme, les cellules CD27⁺ sont capables de répondre beaucoup plus rapidement, à un stimuli, *in vitro*, que les cellules naïves CD27⁻, mimant bien la réponse secondaire *in vivo* (Tangye and Good, 2007).

Les BM résident principalement dans la rate et les amygdales, néanmoins ces lieux ne semblent pas être indispensables à la préservation de la mémoire humorale. Les BM peuvent être retrouvés, dans une moindre mesure, dans le sang périphérique et dans la MO (car principalement des plasmocytes) (Giesecke et al., 2014).

1.1.1. LB mémoires extra-folliculaires (indépendants du centre germinatif)

Les cellules B CD27⁺ expriment des mutations au niveau des gènes des Ig (switch isotypique). Cependant une importante proportion continue néanmoins à exprimer des IgM, suggérant l'existence de cellules B mémoire IgM⁺. Ces cellules B CD27⁺ IgM⁺ ont été observées chez des patients ne pouvant former de CG (n'ayant donc pas subi de switch isotypique ni de commutation de classe), ce qui laisse supposer que ces LB sont générés indépendamment du CG et de la réponse T (Tangye and Good, 2007).

1.1.2. LB mémoires (dépendants du centre germinatif)

Historiquement, les BM étaient caractérisés par la délétion de l'IgD de surface ainsi que du CD38. En effet, les BM étaient caractérisés par IgD-CD38-, alors que les B naïfs étaient IgD⁺CD38-. Cette caractérisation est toujours d'actualité (complétée avec l'expression du CD27) et a été confortée par le fait que les cellules IgD⁺ expriment des gènes des Ig non mutés, contrairement aux cellules B CD27⁺IgD- (Tangye and Good, 2007).

1.2. Plasmocytes

De nombreux signaux orientent le devenir des LB à la sortie du CG. En effet, certaines cellules deviennent des BM alors que d'autres se différencient en ASC. Les signaux nécessaires à l'orientation vers les BM sont peu connus, contrairement aux signaux

menant à un devenir plasmocytaire. L'expression des facteurs de transcription tels que Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1) et XBP-1 (X box binding protein 1), parallèlement à l'extinction de gènes comme Bcl-6 (B-cell lymphoma 6) et PAX-5 (paired box 5), sont caractéristiques d'une orientation de la cellule B vers le plasmocyte (*Giesecke et al., 2014*).

Les LB en développement peuvent donner des PC à courte durée de vie, également appelés plasmablastes, correspondant à des cellules avec une demi-vie ne dépassant pas les 5 jours, capable de subir une commutation de classe (lors du premier contact avec les Tfh et notamment les cytokines qu'ils sécrètent), mais pas d'hypermutation somatique. Tout cela permet à ces ASC, de produire une réponse très rapide mais peu affine à l'Ag concerné (*McHeyzer-Williams et al., 2011*). En revanche, les LB peuvent également donner des PC à longue durée de vie, qui sont des cellules capables de survivre et de sécréter des Ac pendant de nombreuses années. Ces cellules sont à la base de l'efficacité vaccinale durant parfois plusieurs décennies.

Les plasmocytes sont amenés à circuler pendant une courte période jusqu'à ce qu'ils atteignent une niche dans la MO, la rate, les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) ou les ganglions lymphatiques (*Shih et al., 2002*). Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) sont très importants, chez la souris ainsi que chez l'homme, car plus de 80 % des plasmocytes sont situés dans l'intestin. Les PC à courte durée de vie se trouvent dans des sites extrafolliculaires, (la pulpe rouge de la rate et les cordes médullaires des ganglions lymphatiques), tandis que les PC à longue durée de vie sont situés dans d'autres organes tels que la MO et le GALT.

Toutes ces niches, où les plasmocytes peuvent se loger, fourniront des cellules plasmiques précoces circulantes qui produiront continuellement des Ac pendant des mois, voire des années en l'absence d'Ag stimulant. Elles sont importantes pour la protection à long terme d'un hôte mammifère contre les agents pathogènes envahissants (*Asano et al., 1985*).

Les cellules plasmiques sont caractérisées par la co-expression de CD138 et CD38, ce qui permet leur identification en cytométrie en flux. Ces cellules B différenciées en phase terminale perdent l'expression du CD20 acquis lors de leur développement dans

la MO, au stade pré-B. Les plasmocytes circulants à l'état d'équilibre proviennent principalement des muqueuses, la majorité d'entre eux sécrètent des IgA et expriment CCR10 et la $\beta 7$ intégrine. Au moins 70 % des plasmocytes sont présents dans l'intestin, où ils sécrètent des IgA (*Brandtzaeg et al., 1999*).

Une faible expression d'IRF4 est requise pour la différenciation des cellules B dans le CG, ainsi que l'expression d'autres protéines comme Bcl6, alors qu'une forte expression de l'IRF4 réprime le programme des cellules B du CG, entraînant l'expression de Blimp1 et la différenciation des cellules B en plasmocytes (*Suan et al., 2017*).

2. Les fonctions des lymphocytes B matures

2.1. Sécrétion d'anticorps

La fonction première des plasmocytes est la production et la sécrétion d'Ac - également appelés immunoglobulines (Ig) - c'est pour cela que l'on peut employer plus spécifiquement le terme de cellules sécrétrices d'Ac (ASC). Cette fonction de production d'Ac est essentielle pour la santé humaine et sous-tend la protection fournie par pratiquement tous les vaccins actuels.

Il existe différentes classes et sous-classes d'Ig chez l'homme : les IgM, les IgD, les IgG (1 à 4), les IgA (1 et 2) et les IgE qui peuvent être distinguées biochimiquement et fonctionnellement (figure 8). Ces variantes permettent de lutter au mieux contre toute forme d'agent pathogène. La molécule d'Ig a une forme en Y. Elle est constituée de 3 segments de taille égale reliés par une zone de jonction flexible. Toutes les Ig ont une structure de base identique. Elles sont formées de deux paires de chaînes lourdes et légères reliées par des ponts disulfures.

sous-classes	IgG				IgM	IgA		IgE	IgD
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4		IgA1	IgA2		
chaîne lourde	γ1	γ2	γ3	γ4	μ	α2	α2	δ	ε
chaîne légère	κ ou λ				κ ou λ	κ ou λ		κ ou λ	κ ou λ
chaîne J	non				oui	oui		non	non
poids moléculaire (kDa)	146	146	165	146	970	160	160	184	188
Taux sérique moyen chez l'adulte (mg/mL)	9	3	1	0,5	1,5	3	0,5	0,03	5.10-5
Demi-vie dans le sérum (jours)	21	20	7	21	10	6	6	3	2
présence membranaire	oui				oui	oui		oui	oui
Sécrétion	oui				oui	oui		oui	non
Localisation	sang				LB / sang	muqueuses / sécrétions		granulocytes / basophiles / mastocytes	LB
Proportion	70 à 75%				10%	15 à 20%		< 1%	< 1%
fonction(s)	neutralisation des toxines, virus et bactéries				agglutination / voie classique du complément	agglutination / neutralisation virus et bactéries		allergie / neutralisation des parasites	activation LB
activation de la voie classique du complément	++	+	+++	-	++++	-	-	-	-
activation de la voie alterne du complément	-	-	-	-	-	+	-	-	-
passage de la barrière placentaire	+++	+	++	+/-	-	-	-	-	-
présence à la surface des LB matures	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Se lie aux récepteurs Fc des macrophages et phagocytes	+	-	+	+/-	-	+	+	+	-
Liaison de forte affinité aux mastocytes et basophiles	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Transport au travers des muqueuses	-	-	-	-	+	++	++	-	-
Induit la dégranulation des mastocytes	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Réactivité avec la protéine A staphylocoque	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-

Figure 8 : Propriétés physiques et fonctionnelles des différents isotypes d'Immunoglobulines humaines

(Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, and Serge Weinman.; Murphy, Kenneth, Casey T. Weaver, Charles A. Janeway, and Pierre L. Masson. I)

La mémoire immunitaire et plus particulièrement humorale se met en place après une première rencontre avec l'Ag (réponse primaire). Cette réponse contient un temps de latence, correspondant à la phase de maturation des LB dans les CG ainsi qu'à la différenciation terminale en plasmocytes (4 à 7 jours). Le pic de la réponse (sécrétion d'IgM et d'IgG) se fait 7 à 10 jours après la rencontre antigénique. Les premières Ig sécrétées sont les IgM, elles sont peu spécifiques mais permettent une réponse rapide. Une fois sortie du CG et après hypermutation somatique, les LB sécréteront des IgG (Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, and Serge Weinman.).

Lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag (réponse secondaire) un compartiment de BM, portant des BCR de haute affinité, sera immédiatement disponible pour se différencier

en plasmocytes sécréteurs principalement d'IgG (IgA dans les muqueuses). Cette réponse est plus rapide et plus forte (10 à 1000 fois plus élevée que la réponse primaire), car la phase de différenciation dans les CG n'a plus lieu d'être, ce qui réduit considérablement la phase de latence (1 à 3 jours). Le pic de la réponse à lieu seulement 3 à 5 jours après la rencontre antigénique (figure 9) (Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, and Serge Weinman.).

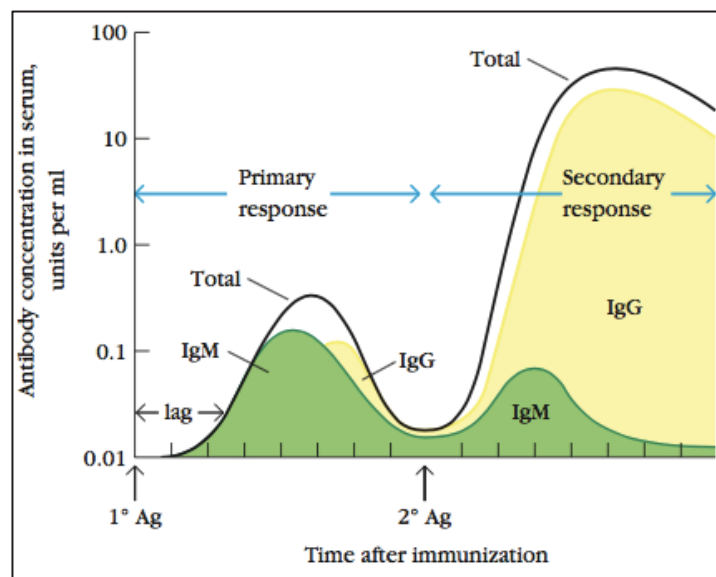


Figure 9 : Concentration des isotopes d'anticorps sécrétés contre un antigène au cours des réponses primaires et secondaires (Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, and Serge Weinman.).

Les concentrations sériques en anticorps sont représentées sur une échelle logarithmique. Les unités de temps ne sont pas spécifiées car elles diffèrent quelque peu en fonction du type d'antigène, de la voie d'administration, de la présence ou non d'un adjuvant et de l'espèce ou de la lignée.

Cette fonction physiologique essentielle, qui est de produire des Ac pour lutter contre des pathogènes externes, peut malheureusement dans certains cas devenir délétère. En effet, lors des transplantations d'organes, le fait de lutter contre des Ag du non soi (provenant du greffon), peut entraîner à plus ou moins long terme, un rejet du greffon, par le receveur de type humoral (partie II A.3.2).

2.2. Cellules présentatrices d'antigènes

Les LB sont connus pour leur fonction principale dans l'immunité humorale, par la sécrétion d'Ac, mais beaucoup moins pour leur fonction de cellules présentatrices d'Ag (CPA). Au cours des dernières décennies, des études conçues pour définir le rôle des LB en tant que CPA ont généré des résultats divergents, remettant en cause sa capacité à amorcer les LT.

En général, il est clair que les LB intègrent et présentent les Ag spécifiques et non spécifiques différemment. La présentation de l'Ag spécifique à travers le récepteur de l'Ag des LB se produit avec une très grande efficacité et est associée à l'activation des LB, entraînant l'activation des LT apparentées. En revanche, la présentation de l'Ag non spécifique par les LB est minimisée et dissociée de l'activation des cellules B. En conséquence, les LB inactivent les LT qui reconnaissent les épitopes antigéniques non spécifiques présentés par les LB. Les LB peuvent également induire une différenciation et une expansion régulatrice des cellules T. Ces mécanismes servent à assurer une production efficace d'Ac spécifiques de l'Ag de haute affinité mais minimisent la production d'Ac et d'auto-Ac non spécifiques (*Chen and Jensen, 2008*).

Comme d'autres types de CPA professionnelles, les cellules B expriment de manière constitutive les molécules du CMH de classe II (CMH-II), et cette expression est initiée pendant le développement des cellules B dans la MO au stade pro-B et est maintenue ensuite tout au long de la différenciation des LB et de la maturation (*Chen and Jensen, 2004*).

La fonction potentielle du CMH-II dans les LB en développement de la MO reste à déterminer. Si les LB matures expriment le CMH-II comme mécanisme pour présenter l'Ag aux LT CD4⁺ et obtenir une aide des LT pour la production d'Ac de haute affinité, cela ne peut pas être appliqué aux B immatures, car les ils sont incapables de produire des Ig. Une des hypothèses est que l'expression du CMH-II soit nécessaire au développement et à la maturation des LB. Cette possibilité, cependant, n'est pas étayée par les résultats selon lesquels le développement des LB est apparemment normal chez les souris déficientes en CMH-II (*Madsen et al., 1999*) et chez les patients atteints du syndrome des lymphocytes dénudés (*Reith and Mach, 2001*), où

l'expression du CMH-II est interrompue en raison de la perte de fonction des facteurs de transcription.

2.3. Sécrétion cytokinique

Les LB sont des cellules participant à l'inflammation par la sécrétion d'Ac, mais pas seulement, car ils peuvent également sécréter plusieurs cytokines jouant un rôle clef dans l'inflammation et le contrôle de cette dernière. Seule la sécrétion des cytokines dites « pro-inflammatoires » seront décrites dans cette partie, car la fonction régulatrice, et notamment la capacité à sécréter des cytokines « anti-inflammatoires » des cellules B sera développée plus en détails (partie I C.2) ultérieurement.

Les LB peuvent être subdivisés en au moins deux sous-ensembles de cellules B effectrices produisant des réseaux distincts de cytokines (*Harris et al., 2000*). D'une part, les LB amorcés par des interactions dites Th1 (par les *T helper* de type 1), que l'on appellera LB-Th1, produisent de l'IFN γ , de l'IL12p40, du TNF α et de l'IL10. D'autre part, les LB amorcés par des interactions Th2 (par les *T helper* de type 2), que l'on appellera LB-Th2, produisent de l'IL4, IL2, IL13, IL6, IL10 et TNF α . Les signaux qui régulent la différenciation de ces deux sous-ensembles sont distincts, les cellules LB-Th1 se développant en réponse à l'IFN γ et IL12 (*Harris et al., 2005a*) et les cellules LB-Th2 se développant en réponse à l'IL4 (*Harris et al., 2005b*).

Fait intéressant, les cellules LB-Th1 et LB-Th2 peuvent amorcer des LT CD4⁺ naïfs pour se différencier en effecteurs de type Th1 et Th2 *in vitro* (*Harris et al., 2000*), suggérant que ces cellules B productrices de cytokines pourraient fonctionner pour amplifier les réponses immunitaires dépendantes des LT *in vivo*.

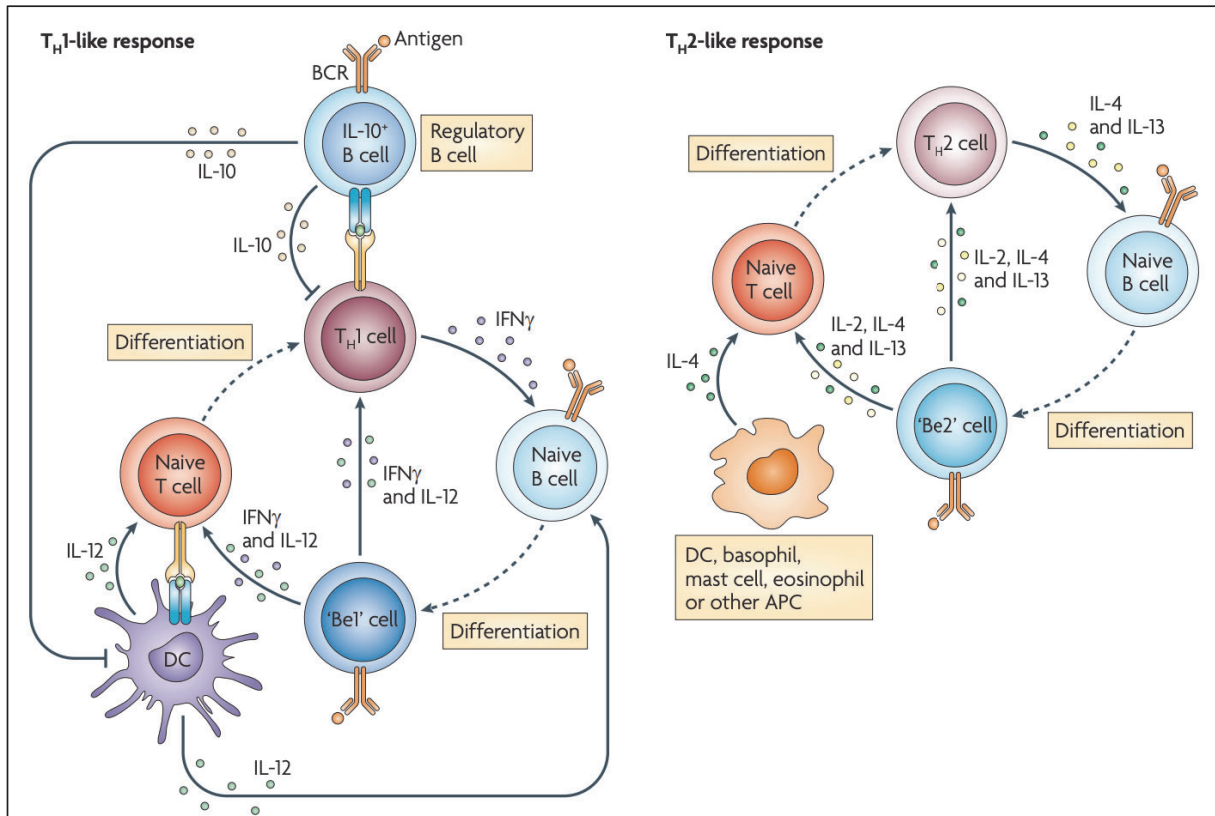


Figure 10 : Schéma représentant la fonction sécrétrice des LB dans la réponse Th1 et Th2

Les cellules effectrices et régulatrices B ont des rôles opposés dans les réponses immunitaires. Les cellules effectrices et régulatrices B peuvent présenter un antigène aux cellules T CD4 + et fournir une co-stimulation et des cytokines. Les cellules effectrices B (cellules « Be1 » et « Be2 » correspondant respectivement aux LB-Th1 et LB-Th2) peuvent sécréter des cytokines, telles que IFN γ , IL12, IL4 et IL2, qui renforcent et stabilisent le profil des cytokines des Th1 et Th2. De plus, les cellules effectrices B peuvent recruter des cellules T naïves supplémentaires dans la réponse inflammatoire. En revanche, les cellules B régulatrices produisent de l'IL-10, qui supprime le potentiel inflammatoire des LT effecteurs, modifie l'activité des DC et favorise le développement et l'expansion des Treg (Lund and Randall, 2010).

C. Population B régulatrices

Les cellules régulatrices B (Breg) jouent un rôle important dans le maintien de la tolérance et l'altération (sur-activation ou inhibition) de ces cellules, de manière numérique ou fonctionnelle, est la conséquence de nombreuses maladies, notamment auto-immunes.

Il existe aujourd'hui de nombreux arguments suggérant que, dans certaines circonstances, les cellules B contribuent au maintien de la tolérance. La tolérance des cellules B existe et peut être appelée auto-immunité physiologique mais le système de

régulation de cette auto-immunité peut être défaillant. Apparaît alors une auto-immunité pathologique et agressive, qui va aboutir au déclenchement d'une maladie auto-immune par une prolifération anormale des lymphocytes B auto-réactifs. Ces LB auto-réactifs sont capables de sécréter des auto-Ac très délétères pour l'organisme (*Hampe, 2012*). Il existe de nombreux exemples montrant le rôle des LB dans le maintien de la tolérance dans un contexte de transplantation (*Chong and Sciammas, 2011; Redfield et al., 2011*). Chez la souris, il a été rapporté que lorsqu'une déplétion des cellules CD20+ (LB) avec un anti-CD20 était réalisée, il y avait une accélération du rejet de greffe cutanée (*DiLillo et al., 2011*). Chez le rat, la tolérance dans le long terme, pour une allogreffe, est caractérisée par une accumulation de LB exprimant des gènes associés à la tolérance (*Le Texier et al., 2011*).

Bien que plusieurs phénotypes aient été attribués aux cellules Breg, y compris les phénotypes des LB issus de la ZM, (*Bouaziz et al., 2008; Mauri and Bosma, 2012*) les deux sous-ensembles de cellules B qui ont reçu la plus grande attention sont les cellules B transitionnelles et les lymphocytes B10. Ces cellules sont capables d'inhiber les LT effecteurs ainsi que de recruter des LT régulateurs (*Bouaziz et al., 2014*).

1. Phénotypes et généralités des populations B régulatrices

1.1. B transitionnels

Les lymphocytes B transitionnels décrits précédemment (paragraphe I A.3.1.1) sont des cellules B immatures, en cours développement. Ce sont des cellules pré-CG, que l'on peut retrouver dans le sang, en faible proportion dans des situations physiologiques. Ce sont des cellules capables de sécréter de l'IL10 (*Moreau et al., 2015*).

Certains patients, transplantés rénaux, possèdent un profil particulier, ce sont des patients qui, sans traitement immunosuppresseurs, peuvent conserver sans rejet, les fonctions de leur greffon. On les appelle : patients tolérants opérationnels (*Newell et al., 2010; Sagoo et al., 2010*). Cette absence de rejet en dépit de traitement immunosuppresseur est due au maintien de LB transitionnels (CD24^{hi}CD38^{hi}) dans le

sang périphérique, égal à celui des individus sains et à un nombre plus élevé que celui des patients sous immunosuppresseurs ou ayant un rejet chronique (*Newell et al., 2010; Silva et al., 2012*).

1.2. B10

Chez la souris, des cellules B avec le phénotype CD19 + CD5 + CD1d^{hi}, connues sous le nom de cellules B10, ont été caractérisées dans la rate et le péritoine comme des cellules productrices d'IL10 en réponse à stimulation *ex vivo* avec des lipopolysaccharides (LPS) additionnés à du phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA) et de l'ionomycine (*Rincón-Arévalo et al., 2016*). Ces cellules B10 murines sont capables, *in vitro*, d'inhiber les LT CD4⁺ en diminuant leur production d'IFN γ et de TNF α (*Matsushita et al., 2010*). Les B10, ont également montré leur rôle dans le cancer. En effet, leur production d'IL10 peut inhiber la réponse anti-tumorale nécessaire à l'élimination des cellules cancéreuses (*Rincón-Arévalo et al., 2016*).

Chez l'homme, ces lymphocytes B10 sont caractérisés par le phénotype CD19⁺ CD24^{hi} CD27⁺. Cette population B10 est anormalement exprimée chez les patients atteints de polyarthrites rhumatoïdes, de lupus systémique érythémateux, ainsi que du syndrome de Sjögren (*Iwata et al., 2011*).

1.3. B de la zone marginale

Les LB de la ZM peuvent être caractérisés comme des cellules régulatrices. Il a été montré lors de culture *in vitro* de LB humains de la ZM, que toutes les cellules étaient capables de sécréter de l'IL10, après stimulation avec du CpG (séquences dinucléotidiques Cytosine-phosphate-Guanine) et, que certaines étaient capables de sécréter l'IL10 spontanément, sans stimulation au préalable (*Appelgren et al., 2018*). Dans un modèle murin de greffe de peau allogénique, les LB de la ZM ont également été rapportés comme ayant une capacité à améliorer la survie du greffon en agissant sur la suppression de l'activation des LT (*Moreau et al., 2015*).

1.4. *Plasmablastes régulateurs*

Il a été mis évidence, lors d'une infection avec la bactérie *Salmonella*, que la majorité des LB, sécrétant de l'IL10 (Neves et al., 2010) et de l'IL35 (Shen et al., 2014), étaient des cellules CD138⁺. Ce marqueur est caractéristique ASC, ce qui laisse penser qu'une partie des cellules B régulatrices serait en fait des plasmocytes et donc, des cellules encore plus différenciées (Fillatreau, 2015).

Les facteurs de transcription IRF4 et Blimp-1 sont essentiels pour les fonctions suppressives des cellules B. En effet, au cours de l'infection à *Salmonella*, les niveaux d'expression des ARNm (acide ribonucléique messenger) d'IRF4 et de Blimp-1 sont corrélés avec le niveau d'expression des ARNm de l'IL10 et d'Ebi3 (*Epstein-Barr virus induced gene 3*) dans les sous-ensembles de cellules plasmiques CD138^{int}CD22⁺, CD138^{hi}CD22⁺ et CD138^{hi}CD22⁻ (Shen et al., 2014). Les ASC sont souvent caractérisées en utilisant des niveaux d'expression de CD138 et CD22 pour distinguer 3 stades de maturation de l'ASC. Les cellules CD138^{int}CD22⁺ sont les cellules les plus matures, avec une forte capacité à produire des Ac, les CD138^{hi}CD22⁺ sont à un stade de différenciation intermédiaire, alors que les CD138^{hi}CD22⁻ sont les moins différenciées (Fillatreau, 2015).

Des analyses ont également montré que tous les plasmocytes CD19⁺CD138^{hi} exprimant les ARNm de l'IL10 et les ARNm des deux sous-unité de l'IL35, co-transcrivaient Prdm1 le gène codant pour Blimp-1 (Shen et al., 2014). Des souris déficitaires en Prdm1 au niveau du compartiment B uniquement, développent une forte encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) par rapport aux souris contrôles. Les souris déficitaires accumulent anormalement des TH1 et des TH17, ce qui montre bien que Blimp-1 contribue aux fonctions régulatrices des cellules B (Matsumoto et al., 2014).

2. Fonctions principales des populations B régulatrices

2.1. Sécrétion d'IL10

Il est indéniable que la principale fonction d'un Breg est sa capacité à produire et sécréter de l'IL10. Cette cytokine est connue comme étant une cytokine essentielle au maintien de l'homéostasie et de la tolérance. Elle permet notamment, l'inhibition des cellules immunitaires dites effectrices et le recrutement des cellules régulatrices (*Akdis and Akdis, 2014*).

La stimulation par CpG de LB issus de cellules mononuclées du sang (PBMC) de donneur sain induit l'expression de TNFR2 (*Tumor necrosis factor receptor 2*) à la surface de ces cellules, ainsi qu'une forte sécrétion d'IL10 (*Ticha et al., 2017*). L'analyse par cytométrie en flux de ces LB montre que les cellules sécrétant l'IL10 sont situées dans la fraction TNFR2+ et presque absentes dans la fraction TNFR2-. La principale sous population B TNFR2+ produisant de l'IL10 après stimulation CpG serait des cellules mémoires CD27+, IgM+. Le TNFR2 semble en revanche être absent à la surface des plasmablastes (CD27hiCD38hi), ainsi que des plasmocytes (CD138+) (*Ticha et al., 2017*).

2.2. Sécrétion TGFβ

Il a été mis en évidence une augmentation des Breg TIM-1+ (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 1*) chez des souris après une allogreffe d'îlots. Les cellules B TIM-1+ pourraient transférer la tolérance à long terme des allogreffes d'îlots via l'expression d'IL10 ou de TGFβ (*transforming growth factor beta*) (*Moreau et al., 2015*). Le TGFβ, tout comme l'IL10, est une cytokine nécessaire à l'induction des lymphocytes T régulateurs (Treg) (*Kanamori et al., 2016*).

2.3. Sécrétion d'EBI3

La famille des cytokines de l'IL12 est composée de 4 membres (IL12, IL23, IL27 et IL35), chaque membre est composé de 2 sous-unités, une sous-unité α (IL12p35,

IL23p19 et IL27p28) et une sous-unité β (IL12p40 et Ebi3). Les sous-unités sont chacune codées par des chromosomes distincts et leur expression est régulée de manière indépendante (*Vignali and Kuchroo, 2012*).

Il est à noter que les 3 sous-unités α sont structurellement liées et chacune peut éventuellement s'associer à l'une des sous-unités β . L'appariement des sous-unités α , IL12p35 ou IL23p19 avec IL12p40, donne naissance aux deux cytokines de la famille, pro-inflammatoires, qui sont respectivement l'IL12 et l'IL23. En revanche, les deux membres immunosuppresseurs de la famille, qui sont l'IL27 et l'IL35 dérivent de l'appariement de l'IL27p28 ou IL12p35 avec Ebi3. Cette dernière, semble être la sous-unité essentielle au devenir régulateur des cellules sécrétrices des cytokines (*Dambuza et al., 2017; Vignali and Kuchroo, 2012*).

La ou les cytokines prédominantes, de la famille des cytokines de l'IL12, produites dans l'environnement joueraient un rôle direct sur la différenciation des lymphocytes naïfs en influençant l'orientation et le devenir de ces lymphocytes (pro- ou anti-inflammatoires). Les cytokines de la famille de l'IL12 sont donc considérées comme ayant des fonctions critiques dans l'initiation, l'intensité, la durée et la qualité de la réponse adaptative (*Dambuza et al., 2017; Vignali and Kuchroo, 2012*).

2.4. Sécrétion d'IL35

L'IL35 inhibe les maladies auto-immunes tout en prévenant la défense de l'hôte contre l'infection et en favorisant la croissance tumorale et les métastases en convertissant les cellules B et T au repos en cellules productrices d'IL10. Les Breg et les Treg sont des cellules produisant et sécrétant de l'IL35 (*Dambuza et al., 2017*).

Les cellules B productrices d'IL35 ont été identifiées comme étant des acteurs clés dans la régulation négative de l'immunité. Des souris chimériques dépourvues d'expression des sous-unités de l'IL35 (IL12p35 ou EBi3) uniquement au niveau des cellules B, développent une EAE démyélinisante transmise par les LT exacerbée. En revanche, ces souris montrent une résistance nettement améliorée à l'infection par la bactérie pathogène *Salmonella* par rapport aux souris témoins. Dans le modèle *Salmonella*, l'absence d'expression de l'IL35 par les cellules B a entraîné une

augmentation de réponses cellulaires et une augmentation du nombre de macrophages dans la rate ainsi que des LT inflammatoires. Il a également été mis en évidence une augmentation des LB en tant que CPA (*Shen et al., 2014*).

2.5. Adénosine et enzymes immunosuppressives

CD73 et CD39 sont deux enzymes jouant un rôle majeur dans la dégradation de l'adénosine triphosphate (ATP, pro-inflammatoire) en adénosine (immunosuppressive). CD73 est actif lors de la dernière étape de la voie de dégradation, lorsque l'enzyme dégrade l'adénosine monophosphate (AMP) en adénosine.

Des LB murins, possédant des propriétés régulatrices, sont capables d'exprimer à leur surface CD73 et par ce fait, de produire de l'adénosine capable d'inhiber une réponse inflammatoire, lors de colites expérimentales (*Kaku et al., 2014*).

populations	Phénotype		mécanismes
	murin	humain	
B transitionnels	T1: CD19+ CD21- CD23- T2: CD19+ CD21hi CD23+	CD19+ CD24hi CD38hi	Il10
B 10	CD19+ CD5+ CD1dhi	CD19+ CD24hi CD27+	Il10
plasmablastes régulateurs	CD19+ CD138+CD44+	CD19+ CD138+ CD22-/+	Il10, Il35
LB	TIM1+	TIM1+	Il10, TGFβ
LB	CD73+	CD39+ CD73+	Adénosine
B de la ZM	CD19+ CD21hi CD23- CD24hi IgMhi IgDlow CD1dhi	CD19+ CD27+ IgD+ IgM+	Il10
B mémoires	-	CD19+CD27+IgM+TNFR2+ (CD138-)	Il10

Figure 11 : Tableau récapitulatif des différentes populations B régulatrices, des phénotypes de ces populations chez l'homme et la souris, ainsi que leurs mécanismes d'action.

D. Autres voies d'activation des lymphocytes B : les *Toll Like Receptor*

Les LB sont classiquement activés ou réactivés *via* la liaison de l'Ag, dont il est étroitement spécifique, avec son récepteur principal le BCR. Néanmoins, le BCR n'est pas l'unique moyen d'activation du LB. En effet, le LB est capable de s'activer, certes de façon non spécifique, mais très rapidement, par le biais de récepteurs appartenant à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, intervenant au cours des mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires, dits conservés, chez de nombreux pathogènes, pouvant être d'origine et de nature très variées. Ces récepteurs se trouvent à la surface des cellules de l'immunité innée, mais également à la surface des LB et des LT, ce sont les *Toll Like Receptor* (TLR).

Les LB portent des TLR au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des membranes endosomales. Les LB peuvent ainsi être activés directement par des ligands comme les lipopolysaccharides (LPS) et les séquences CpG, jouant un rôle dans la régulation de l'expression génétique, pouvant l'activer ou l'inhiber par la présence ou non de méthylation sur les résidus cytosines. Ces modifications épigénétiques sont réalisées par des enzymes appelées ADN méthyltransférases).

La plupart des ligands des TLR ont besoin de l'engagement du BCR pour activer de façon suffisante les LB. Seuls les CpG-B et les CpG-C (permettant d'activer le TLR9) et les agonistes synthétiques des TLR7 et 8, y parviennent (*Bekeredjian-Ding et al., 2007, 2005*). Pour les autres ligands des TLR intracellulaires, seul le BCR permet une endocytose efficace de ceux-ci par les LB (*Lanzavecchia, 1985*). Toutefois, il existe une activation synergique du TLR9 et du BCR, induisant une « hyper réponse » des LB. L'activation du BCR, permet une relocalisation du TLR9 des endosomes précoces, où il se trouve à l'état basal, vers les endosomes tardifs et l'autophagosome. Le recrutement de TLR9 dans les autophagosomes est nécessaire pour l'hyper-activation des MAP kinases (*Chaturvedi et al., 2008; O'Neill et al., 2009*). Il semble donc exister une synergie entre les voies de signalisation du BCR et des TLR. Une stimulation simultanée des deux types de récepteurs permet, une hyperactivation des MAP kinases, mais également de NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) (*Busconi et al., 2007*).

1. Rôle des TLR dans la réponse humorale T dépendante

La nécessité d'un engagement TLR direct sur les cellules B en réponse aux Ag protéiques a été étudiée chez des souris dont la déficience en MyD88 était restreinte aux LB. La vaccination de ces souris, avec de l'albumine humaine et du LPS, active les LT auxiliaires (Th pour *T helper*), mais n'est pas capable d'induire une réponse humorale efficace contrairement aux souris sauvages. La fonction TLR sur les cellules B était nécessaire pour les réponses IgG2 et, dans une moindre mesure, pour les réponses IgM et IgG1, tandis que les réponses IgA et IgE étaient indépendantes des TLR. Ces résultats mettent en évidence que la stimulation directe des TLR des LB améliore et module la réponse Ac à un Ag protéique (*Pasare and Medzhitov, 2005*).

Ces données peuvent tout de même être nuancées. D'une part, parce que les réponses dirigées contre les Ag T-dépendants répétitifs semblent pouvoir s'affranchir de l'engagement des TLR (*Gavin et al., 2006*). D'autre part, plusieurs travaux laissent suggérer que les TLR ne sont pas les seuls PRR (Pattern recognition receptor) impliqués dans la mise en place des réponses humorales T-dépendantes (*Lambrecht et al., 2009*).

2. Rôle des TLR dans la réponse humorale T indépendante

Les TLR participent également aux réponses humorales T-indépendantes de type I et de type II. Ils permettent de nuancer la délimitation entre ces deux types de réponses T-indépendantes.

Les LB de la ZM spécialisés dans la lutte contre les bactéries encapsulées sont particulièrement sensibles à la stimulation des TLR (*Bernasconi et al., 2002*). De plus, chez l'homme, une déficience en TLR provoque une susceptibilité aux infections invasives par certaines bactéries encapsulées (*von Bernuth et al., 2008*). Par conséquent, les TLR des LB de la ZM semblent avoir un rôle clef dans les réponses humorales T indépendantes.

II. Transplantation et mécanismes immunologiques du rejet

A. Généralités

L'un des enjeux majeurs en transplantation d'organes solides est le contrôle optimal des phénomènes de rejet induits par les antigènes exprimés par le greffon du donneur. Cette réaction met en jeu principalement les cellules effectrices de l'immunité acquise, LT et LB via des actions cellulaires directes, la production d'anticorps ou de médiateurs solubles (les cytokines).

1. Les allo-antigènes

1.1. Les antigènes majeurs d'histocompatibilité

Les protéines HLA (*human leukocyte antigen* ou CMH) sont exprimées par la quasi-totalité des cellules de l'organisme. Il en existe de deux catégories :

- Les molécules de classe I : protéines présentes à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. Le CMH de classe I est constitué d'une chaîne lourde α liée à une molécule de β -2-microglobuline. La chaîne lourde se compose de 2 domaines (lieu de fixation du peptide), un domaine de type Ig et une région transmembranaire avec une terminaison cytoplasmique. La chaîne lourde est codée par des gènes des *loci* HLA-A, HLA-B ou HLA-C. Il existe aussi des gènes, codant pour des molécules de classe I, dits non classiques, telles que HLA-G et HLA-E (*Sheldon and Poulton, 2006*).
- Les molécules de classe II : généralement présentes sur les CPA, mais également au niveau de l'épithélium thymique et des lymphocytes T activés. Sur le même principe que les molécules de classe I, elles se composent de 2 chaînes polypeptidiques (α et β), avec un domaine de liaison au peptide, un domaine de type Ig et une région transmembranaire avec une terminaison cytoplasmique. Les deux chaînes polypeptidiques sont codées par des gènes

situés dans la région HLA-DP, -DQ ou -DR du chromosome 6 (*Sheldon and Poulton, 2006*).

Les gènes HLA jouent un rôle clef dans les mécanismes de défense immunitaire en présentant les peptides dérivés des pathogènes aux LT, entraînant ainsi le déclenchement de la réponse immunitaire permettant de lutter contre les infections. Les molécules de classe I vont entraîner l'activation des LT CD8+ (*Gilliland et al., 1989*), alors que les molécules de classe II vont, elles, activer la réponse T CD4+ (*Thorsby et al., 1983*).

Chaque individu exprime entre 12 et 14 protéines HLA, permettant la présentation d'un maximum de peptides différents. Le polymorphisme des HLA étant immense, les individus entre eux, expriment rarement les mêmes HLA (*Montgomery et al., 2018*). Lors de transplantations d'organes, les HLA du donneur sont ainsi souvent différents des HLA du receveur. Ce qui augmente la probabilité que les LT du receveur puissent attaquer le greffon en reconnaissant les protéines HLA (ainsi que d'autres protéines) du donneur comme du non soi.

1.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité

En transplantation, il existe des antigènes que l'on appelle « majeurs », comme les molécules HLA et d'autres que l'on appelle « mineurs », moins réactifs mais qui peuvent tout de même conduire au rejet du greffon (*Spierings and Fleischhauer, 2019*). Les antigènes mineurs d'histocompatibilité regroupent l'ensemble des molécules (autres que les molécules du CMH) susceptibles d'induire l'activation de LT allo-spécifiques conduisant au rejet.

La plupart du temps, ces Ag mineurs sont de nature peptidique, ils peuvent provenir de glycoprotéines membranaires, mais également de protéines intracellulaires (facteurs de transcription, myosine, ...). Les nombreuses variations géniques propres à chaque individu entraînent la formation de peptides différents, qui seront alors reconnus et présentés aux LT par le biais des molécules de CMH (*Wallny and Rammensee, 1990*).

Les meilleurs exemples d'Ag mineurs sont ceux produit par le chromosome Y ou l'ADN mitochondrial (*Simpson, 1998*). Les antigènes mâles HY sont les Ag mineurs les mieux caractérisés. Ces Ag ne sont pertinents que lors de transplantation d'un tissu mâle chez une femelle histocompatible (ne possédant pas le chromosome Y). Les peptides, dérivés des gènes codés par le chromosome Y seront reconnus comme étrangers (*Simpson et al., 1997*).

1.3. Le système ABO

Ce système n'entre pas dans la définition des Ag mineurs, car ces Ag sont incapables d'activer les LT. Les déterminants antigéniques du système ABO sont des oligosaccharides présents à la surface de différents types cellulaires et notamment à la surface des érythrocytes et de l'endothélium vasculaire, interface importante entre le greffon et l'hôte (*Hosoi, 2008*).

Les individus immunocompétents du groupe O, développent et produisent au début de leur vie, des Ac contre les Ag des autres groupes sanguins : des anti-A et des anti-B (*Daniels, 2005*). Il a été supposé que ces Ac étaient majoritairement des IgM, et qu'elles étaient produites par sensibilisation à des substances environnementales (alimentaire), des bactéries ou des virus. Ces anticorps constituent une barrière immunologique très efficace contre la transfusion et la transplantation d'organe entre individus de groupes sanguins différents. Ainsi, lors d'une greffe d'organe solide d'un donneur de type A et/ou B chez un receveur de type O, l'endothélium du greffon sera directement attaqué par les Ac préformés dirigés contre le système du donneur, entraînant un rejet hyper aigu de l'organe greffé (*Chopek et al., 1987*).

Depuis maintenant plusieurs années, des transplantations rénales de donneur ABO-incompatible sont réalisées, en utilisant des protocoles spécifiques, comme la plasmaphérèse ou une déplétion ciblant les LB (cellules productrices d'Ac) visant à diminuer ainsi les Ac anti-A/B chez le receveur de type O (*Tydén et al., 2005*). Chez ces patients, la survie du greffon est similaire à celle d'un patient ayant reçu un greffon d'un donneur du même groupe sanguin (*Takahashi et al., 2004*).

1.4. Les anticorps non HLA

La majorité des rejets humoraux en transplantation est médié par les Ac anti-HLA, mais il a également été démontré que des Ac dits non-HLA pouvaient être à l'origine d'alloréactivité. Notamment lors d'une manifestation d'alloréactivité après transplantation rénale entre frères et sœurs HLA- identiques (*Opelz and Collaborative Transplant Study, 2005*). Il a également été diagnostiqué des cas de rejets humoraux en absence de détection d'Ac anti-HLA, laissant suggérer l'implication d'Ac non-HLA (*Jackson et al., 2012*).

2. Réponse innée

La réponse innée est le premier mécanisme de défense enclenché par l'organisme pour lutter contre un agent pathogène. En transplantation d'organe, la réponse innée est principalement déclenchée par le processus d'ischémie-reperfusion lié directement à l'acte 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. Tout ce processus conduit *in fine* à une nécrose du greffon et donc une inflammation conduisant à l'activation de la réponse innée via la libération de signaux de danger (*Kezić et al., 2017*).

A la surface des cellules de l'immunité innée se trouvent des TLR qui vont reconnaître les signaux de danger libérés après dommages tissulaires (DAMPs pour *Damage Associated Molecular Pattern*) et ainsi induire un signal à l'intérieur de la cellule. Cependant ces signaux et l'activation des cellules de l'immunité innée qui en découle ne semblent pas suffisant pour induire le rejet de greffe. Une reconnaissance, par les monocytes du receveurs, des allo-antigènes comme étant du non soi est nécessaire pour activer de façon complète les réponses immunitaires et notamment les cellules dendritiques (*Oberbarnscheidt and Lakkis, 2014*). La compréhension de tous ces mécanismes aboutissant à l'activation de la réponse innée dans un contexte de transplantation d'organe laisse suggérer de nombreuses perspectives thérapeutiques.

3. Réponse adaptative

La réponse innée, capable de présenter les allo-Ag mais également de fournir des signaux nécessaires à l'activation des LB et des LT, va pour la majorité du temps entraîner une réponse adaptative, au niveau des OL II^{aires}. Cette réponse adaptative implique une réponse spécifique de l'Ag et conduit à la génération de cellules dites mémoires, spécifiques de ce même Ag.

L'activation de la réponse adaptative va entraîner le rejet de l'organe transplanté, on parle ici de rejet aigu. Ce rejet est d'abord constitué d'une phase de reconnaissance et d'activation, puis une phase effectrice. Il peut être de différentes natures : à médiation cellulaire (LT) ou à médiation humorale (LB).

3.1. *Rejet aigu à médiation cellulaire (TCMR, T Cell mediated rejection)*

De nombreuses cellules sont impliquées dans le rejet aigu d'allogreffe. Les LT (CD3+) en font partie et ont même un rôle prédominant dans ce mécanisme de rejet à médiation cellulaire (*Halloran et al., 2018*). Les réactions cellulaires les plus communes comprennent les réactions d'hypersensibilité retardée et la cytotoxicité induite par les lymphocytes. Les réactions d'hypersensibilité retardée sont dues à l'infiltration du greffon par les LT (dirigés spécifiquement contre un antigène du greffon). Ils reconnaissent les complexes CMH/peptides portés à la surface des cellules du greffon et produisent en réponse des cytokines et des chimiokines.

3.2. *Rejet aigu à médiation humorale (ABMR, antibody-mediated rejection)*

L'ABMR, comme son nom l'indique a pour acteurs principaux les Ac et plus particulièrement les Ac dirigés contre les HLA du donneur (DSA pour *donnor-specific antibody*). En amont de la sécrétion de ces DSA, a lieu une phase d'activation des LB,

puis de différenciation pour aboutir à la formation de cellules sécrétrices d'Ac (suivant tout le processus de maturation et de différenciation des Lb décrit dans partie I). Les Ac sécrétés vont agir directement au niveau des cellules du greffon, en neutralisant ces dernières. L'attaque des cellules endothéliales du greffon consiste au mécanisme majeur du rejet lors d'une réponse humorale. D'autres mécanismes sont capables d'entraîner des lésions du greffon comme la formation du complexe Ac/Ag, qui va entraîner le recrutement de macrophages, de cellules dendritiques et de granulocytes, aboutissant à la phagocytose des cellules du greffon. Les Ac peuvent aussi se fixer sur le complément qui se situe dans le sérum. Amplifiant ainsi l'action direct des Ac et, menant à la mort des cellules du greffon par lyse membranaire. Ces différents mécanismes seront décrits dans le prochain paragraphe.

La toxicité des DSA peut être symptomatique, marquée par l'apparition d'un rejet humoral aigu, et donc par une insuffisance rénale aiguë. 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) (*Loupy et al., 2017*). Ces lésions sont souvent combinées à un marquage C4d positif, traduisant une activation du complément. Cette toxicité associée aux DSA peut également être asymptomatique se traduisant par des lésions histologiques infra-cliniques responsables d'une destruction du greffon insinueuse et progressive.

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

4.1. *Anticorps et lésions endothéliales*

Les Ac vont permettre l'activation du complément (*Duncan and Winter, 1988*), le recrutement de cellules inflammatoires mais surtout l'attaque directe des cellules endothéliales du greffon. Tout ceci conduisant à la création de lésions endothéliales.

La liaison des DSA avec les molécules HLA peut entraîner l'activation des cellules endothéliales, il a été montré *in vitro* que les Ac anti-HLA de classe I étaient capables d'induire la prolifération des cellules endothéliales (*Jin et al., 2005*).

La prolifération des cellules endothéliales va aboutir à l'exposition de la membrane basale - entraînant l'activation plaquettaire et la thrombose (*Furmańczyk-Zawiska et al., 2018*) – à l'exposition du muscle lisse – entraînant la prolifération des cellules du muscle lisse, créant un rétrécissement vasculaire et des occlusions, pour former des dommages ischémiques de l'organe transplanté (*Boersema et al., 2015*) – et à l'attaque tissulaire par le système immunitaire, à médiation humorale ou cellulaire. L'aboutissement de ce long processus débouche sur la perte des fonctions du greffon et son rejet.

Les Ac vont également permettre, grâce à leur fragment Fc (Fragment cristallisable), d'activer les myofibroblastes et entraîner l'augmentation des constituants fibrillaires de la matrice extra-cellulaire, cette augmentation est appelée « fibrose ». La fibrose, lésion élémentaire du tissu conjonctif, est une composante fréquente des processus inflammatoires (*Granata et al., 2020*).

4.2. *Activation du complément*

La voie d'activation du complément comprend un versant dépendant des Ac. En effet, le complexe formé par la reconnaissance des Ac (IgM ou IgG1,2 ou 3) (*Duncan and Winter, 1988*) avec leur Ag, forme un agrégat, pouvant être reconnu par la molécule C1q du complément, qui s'active et qui enclenche la cascade d'activation par la voie classique du complément, menée par l'immunité adaptative (*Duncan and Winter, 1988*).

Le C1q est l'unité de reconnaissance des activateurs de cette voie classique. Les fractions C1, C4 et C2 interagissent pour former la C3 convertase : C4b,2a. La C3 convertase va permettre de cliver C3 en C3a et C3b par la C3 convertase. Le C3b, se lie de façon covalente à la surface de la cellule. Alors que C3a, va diffuser et entraîner la migration des leucocytes vers le site de l'infection (*Klos et al., 2009*). Le fragment C3b, fixé à la membrane, amorce la cascade des réactions qui conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire, à partir des composants tardifs du complément (commun aux voies : classique, alterne et des lectines).

C3b entraîne le clivage du facteur C5 en C5a et C5b, composant tardif de la voie du complément. C5b reste faiblement lié à C3b et s'assemble rapidement à C6 et C7 pour former le complexe C5b67 qui va, lui aussi, s'ancrer à la membrane via C7. Ce complexe lie ensuite C8, pour former le complexe C5b678.

La liaison du facteur C9 au reste du complexe, entraîne la formation du complexe d'attaque membranaire du complément (MAC), et de ce fait l'insertion de C9 dans la membrane plasmique de la cellule. Il s'ensuit alors une réaction en chaîne où plusieurs molécules de C9 se polymérisent pour former des pores dans les membranes cellulaires cibles, provoquant la lyse et la mort cellulaire (Cole and Morgan, 2003).

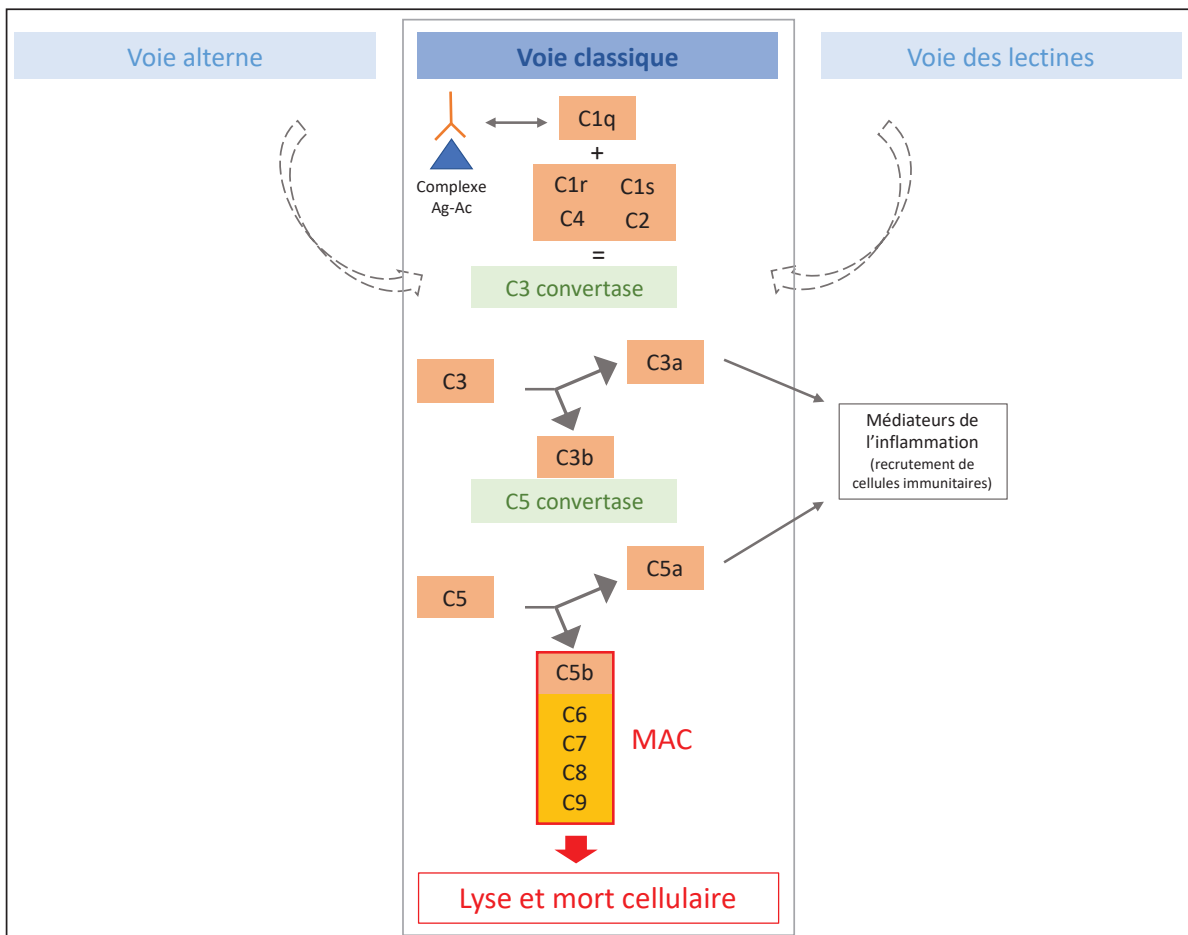


Figure 12 : Schéma simplifié de la voie classique du complément.

4.3. Toxicité endothéliale et mécanisme d'ADCC

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 être responsables de l'athérosclérose accélérée du greffon.

L'injection de DSA (de classe I) dans un greffon cardiaque aboutit à l'athérosclérose accélérée de ce greffon chez des souris immunodéficientes ayant un KO pour la molécule C3 du complément, laissant penser que le complément n'est pas le seul acteur dans la mise en place des lésions chroniques humorales *in vivo* (Hirohashi et al., 2010).

Les Ac peuvent également enclencher un mécanisme d'ADCC (Antibody-Dependent-Cell mediated Cytotoxicity). 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) – pouvant entraîner cette toxicité indépendante du complément.

5. Chronologie d'apparition des DSA

5.1. DSA historiques

L'exposition préalable à des protéines HLA. (= CMH) d'un autre individu est possible et assez fréquente. Elle peut être faite lors de divers événements, comme les transfusions sanguines, les grossesses, ou les transplantations antérieures. Ceci peut entraîner le développement d'Ac dirigés contre ces protéines HLA, on parle alors d'Ac anti-HLA. Lors d'une transplantation, les HLA du donneur peuvent être reconnus par les Ac anti-HLA qui circulent chez le patient, si ces Ac anti-HLA sont spécifiques des HLA du donneur, on les appelle les Ac anti-donneurs ou DSA (*donor specific antibody*). Lorsque ces DSA sont présents avant transplantation, on parle de DSA historiques ou préformés (Zhang, 2018).

La présence de ces DSA avant la transplantation peut être un gros problème et entraîner des rejets hyper aigus (Zhang, 2018). La présence de DSA peut aussi

entraîner des rejets plus pernicious qui, sur le moyen terme, vont conduire à une perte de fonction du greffon beaucoup plus rapidement qu'en l'absence de ces DSA (rejets aigus à médiation humorale) (*Zhang, 2018*).

Il est donc essentiel, lorsque l'on prévoit une transplantation, d'éviter que les HLA du donneur correspondent aux Ac anti-HLA éventuels qui circulent chez le receveur. La présence de DSA chez des patients en attente de greffe diminue drastiquement les chances de trouver un donneur compatible. Néanmoins, des solutions permettant la transplantation chez ses patients ont vu le jour, comme l'utilisation de certains immunosuppresseurs combinés avec une phase dite de désensibilisation pré-greffe.

5.2. *DSA de novo*

Les Ac anti-HLA peuvent être présents avant transplantation, mais peuvent aussi se développer après la transplantation, lorsque le traitement immunosuppresseur n'est pas suffisant. Dans ce cas il est souvent nécessaire d'avoir recours à une biopsie rénale afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de signes de rejet humoral. Le traitement de ce type de rejet est souvent difficile, ce qui mène régulièrement à l'échec de la transplantation (*Zhang, 2018*).

Les Ac anti-HLA sont un problème très préoccupant en transplantation et notamment en transplantation rénale, il est donc impératif d'éviter qu'ils se développent et, quand ils sont présents, il faut éviter, tant que possible, les transplantations avec un donneur dont les HLA sont la cible des Ac circulants chez le receveur. Après transplantation, il est essentiel d'avoir un traitement immunosuppresseur, optimal et adapté, pour éviter le développement de ces DSA.

B. Traitements immunosuppresseurs

1. Traitement d'induction

Les traitements d'induction consistent à donner un traitement immunosuppresseur avant ou pendant la transplantation, et ce de façon ponctuelle. Ce traitement fait appel à des Ac spécifiques dirigés contre les LT et provoquant une déplétion profonde. Néanmoins tous les traitements d'induction ne sont pas tous déplétants, l'exemple du Basiliximab, bloquant la prolifération cellulaire sans déplétion, est décrit ci-dessous.

L'objectif du traitement d'induction est de réduire l'incidence du rejet aigu précoce à la suite d'une transplantation et de réduire la néphrotoxicité en retardant l'introduction des inhibiteurs des calcineurines, qui sont des agents de maintenance (*Møller et al., 2008*). Il a été démontré dans plusieurs articles de transplantation hépatique, qu'une administration plus tardive des CNI, quatre à cinq jours après la transplantation, permettait de diminuer les lésions rénales par rapport aux patients traités directement après la transplantation (*Bajjoka et al., 2008, Rafael-Valdivia et al., 2011*).

Son mécanisme d'action implique donc une déplétion lymphocytaire T, mais aussi la présence d'Ac anti-LB et anti-DC et d'Ac dirigés contre les molécules d'adhésion leucocytaires. Un effet spécifique favorisant l'émergence de Treg (CD4⁺ CD25^{high} foxp3⁺) a également été mis en évidence (*Lopez et al., 2006*).

1.1. *Anti-thymocytes (Thymoglobuline)*

L'obtention d'anti-thymocytes, se fait grâce à l'immunisation de lapins mis en contact avec des thymocytes humains, mécanisme conduisant à la génération d'anticorps polyclonaux. Ces Ac agissent sur la lignée T créant une lymphopénie profonde pouvant persister quasiment plus d'un an après transplantation (*Brennan et al., 1999*). Cette molécule agit également sur la lignée B en des Ac dirigés contre les LB et les plasmocytes (*Masson, E. Néphrologie et thérapeutiques*).

Il est le traitement d'induction de référence pour les patients dits immunisés, ce qui de façon pragmatique correspond aux patients possédant des anticorps anti-HLA contre le donneur avant transplantation (*Thibaudin et al., 1998*).

1.2. *Anti-CD25 (Basiliximab)*

Le basiliximab est un anticorps monoclonal chimérique murin/humain (IgG1kappa) dirigé contre la chaîne alpha du récepteur de l'IL2-2 (antigène CD25), récepteur exprimé à la surface des LT en réponse à une stimulation antigénique. Le basiliximab se lie spécifiquement au CD25 des LT activés exprimant le récepteur de haute affinité pour l'IL2 (IL-2R) et de ce fait empêche la liaison de l'IL2, signal critique de prolifération des lymphocytes T au cours de la réponse immunitaire impliquée dans le rejet d'allogreffe (*Vidal : le dictionnaire. 77e éd. Paris*). Le Basiliximab n'entraîne pas une déplétion des LT, mais inhibe seulement la prolifération de ces cellules.

Le ciblage uniquement des cellules activées conduisant à une déplétion peu profonde des LT, convient aux patients avec de faible risque immunologique.

1.3. *Anti-CD52 (Alemtuzumab)*

Il s'agit d'un anticorps humanisé dirigé contre le CD52. Tout comme la thymoglobuline, il induit une déplétion durable et massive des LT, mais agit également sur le compartiment B, créant une lymphopénie profonde chez le patient (*Lee et al., 2014*).

2. Traitement d'entretien : immunosurveillance

Le traitement d'entretien est initié au moment de la transplantation d'organe et se poursuit sur le long terme, afin de diminuer le risque de rejet du greffon ainsi que d'augmenter les chances de survie. Il existe tout un panel de différents traitements d'entretien, les plus importants sont détaillés ci-dessous :

2.1. Agents anti-prolifératifs

Le mycophénolate mofétil (Cellcept) est un immunosuppresseur utilisé en transplantation d'organes solides. Il agit en bloquant une enzyme intervenant dans la fabrication de la guanine, élément essentiel de l'ADN. Sans guanine, l'ADN des cellules ne peut plus se dupliquer et la prolifération cellulaire caractéristique de la réaction immunitaire du rejet devient impossible.

La guanine appartient à la famille des purines et le mycophénolate mofétil à celle des anti-purines. Le point fort de cet anti-purine est qu'à la différence des autres cellules, les lymphocytes n'ont pas de voie de suppléance pour produire de la guanine. Les autres cellules du corps qui se divisent activement disposent de voie de secours pour leur approvisionnement en guanine et sont donc moins touchées, ce qui permet une inhibition spécifique des lymphocytes.

2.2. Les anti-calcineurine

L'activation du LT CD4+ par la reconnaissance de l'Ag provoque une cascade de réactions, aboutissant à l'augmentation du calcium intracellulaire et à l'activation de la calcineurine. La calcineurine activée déphosphoryle le facteur de transcription du gène de l'IL2 : NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées). Ce phénomène va lui permettre de pénétrer dans le noyau du LT et induire la synthèse d'IL2. La cytokine est ensuite libérée entraînant la prolifération de LT et la production de cytokines. L'inhibition de la calcineurine a pour conséquence d'empêcher la translocation de NFAT et de ce fait d'inhiber la transcription de l'IL2 et l'activation des LT (*Schreiber and Crabtree, 1992*).

La Ciclosporine et le Tacrolimus, sont deux traitements inhibant de manière indirecte la calcineurine. Leur activité inhibitrice nécessite une fixation préliminaire à une protéine-récepteur cytoplasmique : la cyclophiline (pour la ciclosporine) et la FKBP12 (pour le Tacrolimus). C'est le complexe ainsi formé, qui va se lier à la calcineurine induisant son inhibition et par conséquent, l'inhibition du signal de transduction des LT, empêchant ainsi la transcription des gènes des cytokines.

Les inhibiteurs de la calcineurine conduisent à une amélioration significative de la survie à court terme du greffon. En revanche, leur utilisation à long terme peut être un élément important dans la survenue de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire (Cosio et al., 2007; Nankivell et al., 2004a, 2004b).

2.3. Les inhibiteurs de signalisation

Afin d'éviter le rejet après transplantation, il est possible de cibler différentes voies de signalisation intracellulaires, présentes dans les cellules immunitaires. Cette inhibition se fait principalement en inhibant le troisième et le quatrième signal entre les CPA et les LT, consistant à inhiber la prolifération par l'inhibition de la protéine mTOR (mechanistic target of rapamycin). Il existe également de nouveaux inhibiteurs visant à bloquer la protéine kinase Janus kinase 3 (JAK3) ou des molécules inhibant la machinerie cellulaire du protéasome.

Les inhibiteurs de mTOR

Parmi les inhibiteurs de signalisation, les inhibiteurs de la voie mTOR (sirolimus, évérolimus, etc.) ne semblent pas montrer le même niveau de néphrotoxicité que les inhibiteurs de la calcineurine. Ils seraient capables de bloquer le cycle cellulaire de myofibroblastes, limitant ainsi certaines lésions induites au cours du rejet chronique (Strutz, 2009).

Ils inhibent également la synthèse du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), mais surtout, les voies de signalisation dépendantes de son récepteur. Ce mécanisme d'action pourrait favoriser leur utilisation pour la prévention du rejet chronique (Mulay et al., 2006; Najafian and Kasiske, 2008). Cependant, ces résultats doivent être nuancés par la découverte de lésions glomérulaires induites sur le rein normal (Sartelet et al., 2005).

Les inhibiteurs de mTOR peuvent être utilisés en alternative aux traitements standards reconnus pour certaines situations particulières telles que la vasculopathie du greffon (Eisen et al., 2003) ou la néoplasie ou encore l'insuffisance rénale (Ventura-Aguilar et al., 2016).

2.4. Blocage des molécules de costimulation

Les premières stratégies ciblant la réponse humorale ciblaient directement le LB pour la réponse humorale et le LT pour la réponse cellulaire, mais petit à petit le ciblage des molécules de costimulation entre ces deux cellules (signal 2) est devenu une stratégie thérapeutique à part entière. En effet, s'attaquer à la collaboration LB et LT permet d'agir sur la différenciation du LB en plasmocyte et donc de diminuer la synthèse de DSA. Le CTLA4-Ig est la seule spécialité commercialisée et comprend deux molécules (Abatacept et Belatacept). De nouvelles molécules sont en cours de développement, notamment des molécules bloquant les voies CD40/CD40L ou PD1/PDL1 (illustration en figure 13 des différentes molécules inhibant les différents signaux de costimulation).

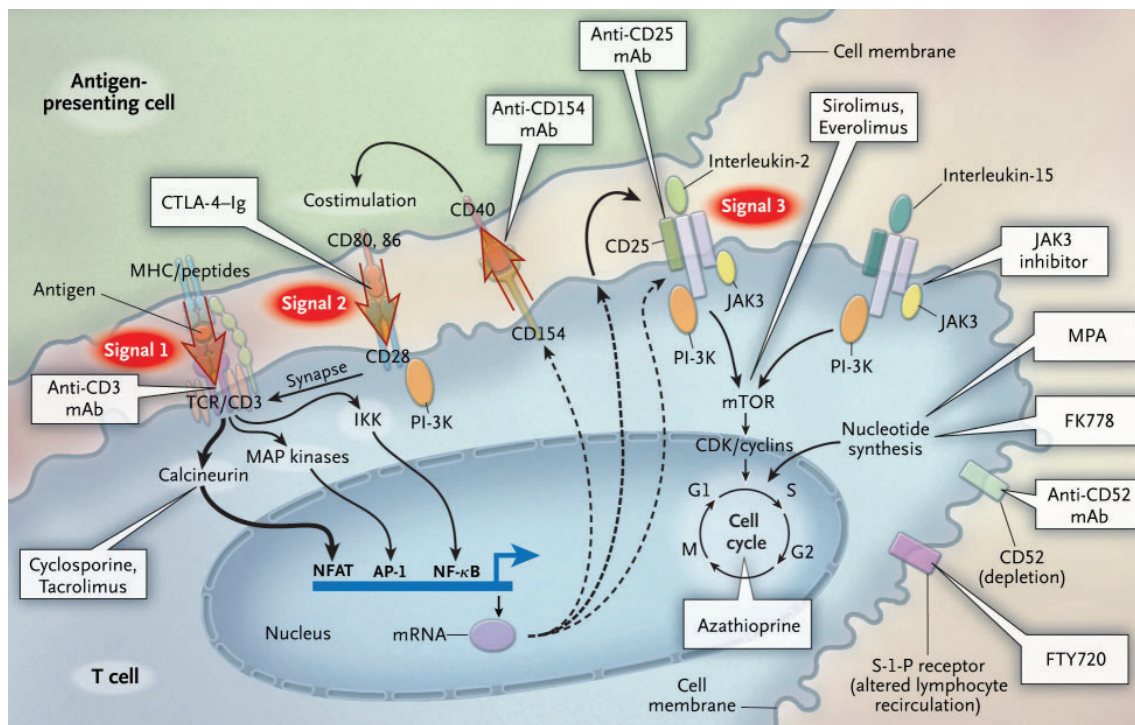


Figure 13 : Cibles théoriques des différentes classes des traitements immunosuppresseurs pour inhiber l'activation du lymphocyte T. (Halloran, 2004).

2.4.1. Blocage de la voie B7/CD28

Deux molécules ont été développées pour inhiber le signal de costimulation médié par CD28. La plus ancienne est l'Abatacept, molécule de fusion entre le domaine de liaison

extracellulaire de CTLA-4 et la fraction Fc d'une IgG1. Plus récemment a été développé une autre molécule : le belatacept ou molécule LEA29Y (Belatacept, *Bristol Myers Squibb, BMS*), qui est en fait une forme modifiée de l'Abatacept, afin d'obtenir une meilleure affinité avec le CD80/CD86. Ces deux molécules, sur le même principe que le récepteur CTLA4, vont se lier au CD80/CD86 avec une meilleure affinité que CD28, ce qui va entraîner un blocage de la voie médiée par CD28 sans effet sur les autres voies de costimulation (*Vincenti, 2008*). La molécule de CTLA4 a bénéficié d'une mutagenèse dirigée de 2 acides aminés permettant d'augmenter son affinité pour le CD86 (*Larsen et al., 2005*)

Le belatacept est un immunosuppresseur développé pour remplacer les inhibiteurs des calcineurins (CNI ou anti-calcineurine) comme traitement d'entretien du patient transplanté rénal non immunisé. Cette molécule a été développée dans l'objectif de diminuer la néphrotoxicité associée à l'utilisation de CNI. Néanmoins, il a été observé, chez les patients transplantés traités avec du Belatacept, une augmentation de rejet à médiation cellulaire, par rapport aux patients traités sous CNI (*Vincenti, 2016*).

Il permet de bloquer la liaison entre (I) les molécules de costimulation 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 costimulation (*cf. Figure 14*).

Cependant en dehors de l'inhibition de la signalisation de CD28, le belatacept permet également la modification des interactions des autres molécules de costimulation de la famille du CD28. Le CTLA4-Ig bloque en effet (I) la liaison dite « classique » du CTLA4 avec le CD80/86 ainsi que (II) celle de PDL1 avec CD80, tout en laissant la possibilité à ICOS-L de se lier au CD28 (*Figure 14*) (*Ford, 2016*).

En utilisant un modèle préclinique d'ABMR après transplantation rénale chez le primate non humain, Kirk et al. ont montré que le belatacept empêchait la maturation des cellules B dans le sang périphérique et les populations de cellules T mémoires dans les OL II^{aires}. Ils ont également pu mettre en évidence la suppression de la reconstruction du centre germinatif après la déplétion des cellules T (*Lo et al., 2015*).

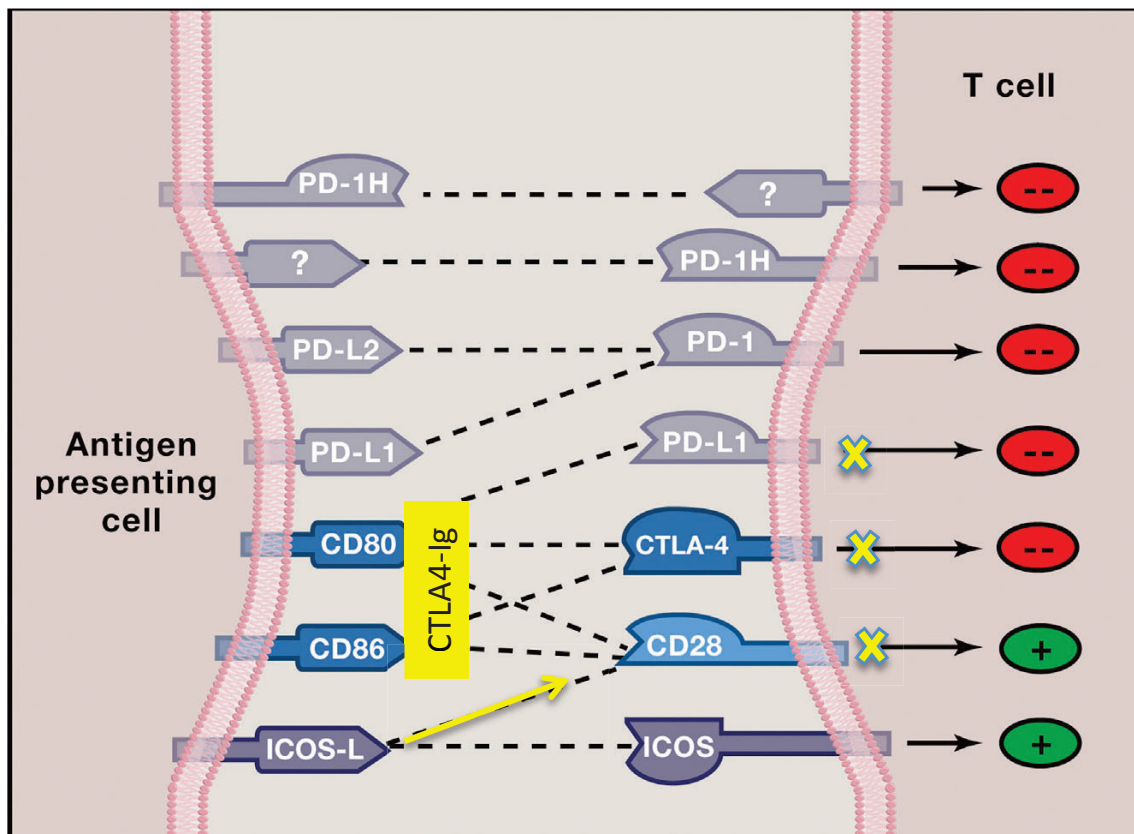


Figure 14 : Conséquences du Belatacept (CTLA4-Ig) sur les mécanismes de costimulation lors de la synapse immunologique.

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 (mycophenolic acid) et corticoïdes soit par un protocole standard associant CNI (Calcineurine inhibitors), 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 et al., 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 belatacept 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 suggéré par les modèles expérimentaux (*Adams et al., 2003; Kitchens et al., 2012*).

C'est surtout la publication des résultats cliniques des études de phase III sur le long terme (avec sept ans de recul) qui ont permis au belatacept de devenir une molécule couramment utilisée dans le contrôle du rejet humoral en transplantation (*Vincenti et al., 2016*). Dans un contexte où la survie à long terme des greffons n'a que peu progressé au cours de ces dix dernières années, le belatacept pourrait ouvrir de nouvelles perspectives. En effet, les patients traités par belatacept 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 sous belatacept par rapport aux patients sous CNI. Cette amélioration des fonctions rénales pourrait en partie s'expliquer par la diminution de la synthèse de DSA *de novo* (*Vincenti et al., 2016*), ainsi que l'augmentation de populations régulatrices, comme les LB transitionnels, (*Leibler et al. 2014*), chez les patients transplantés, non immunisés avant la greffe, traités avec du Belatacept, par rapport aux patients traités avec des CNI.

Une étude plus récente, l'étude BELACOR, a également permis de montrer l'efficacité du belatacept chez des patients transplantés rénaux, possédant des DSA historiques (score de 4 à 6) avant la greffe. En effet, les patients sous belatacept (combiné avec du Cellcept et des corticoïdes) montraient une diminution des DSA préformés (classe I et II) et ne développaient pas de rejet humoral à 1 an post greffe (*Leibler et al., 2019b*). Les patients BELACOR montraient une augmentation des B transitionnels et une diminution des Tfh par rapport aux patients de la cohorte contrôle traités avec des anti-calcineurine (combiné avec du Cellcept et des corticoïdes), un an après la greffe.

2.4.2. Inhibition de la voie CD40/CD40L

Nous avons pu voir précédemment que l'interaction entre les molécules CD40/CD40L (CD154) est nécessaire, voire essentielle, à la formation des centres germinatifs et donc, à la formation d'une réponse humorale spécifique et efficace. C'est pour ces raisons que le blocage de cette voie est étudié depuis de nombreuses années. En

effet, l'inhibition d'un signal de costimulation comme celui médié par CD40/CD40L pourrait induire une tolérance nécessaire après transplantation d'organe. Les Ac anti-CD154 ont montré une efficacité dans la prévention de rejet après transplantation d'organe (cœur, rein et peau), ainsi que l'induction d'une tolérance, dans des modèles murins (*Hancock et al., 1996; Larsen et al., 1996*), et primate (*Kirk et al., 1999*).

Dans un modèle murin de transplantation rénale, il a été démontré que les Ac anti-CD154 ont un effet inhibiteur sur les lymphocytes T cytotoxiques (LTc) et un effet activateur sur les Treg (*Meng et al., 2008*). Dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat, le blocage de la voie CD40, par la protéine de fusion CD40Ig, induit une tolérance de l'organe transplanté. Cette tolérance se manifeste par le développement de cellules régulatrices CD8+ (*Guillonneau et al., 2007*). En revanche, ces propriétés tolérogènes n'ont pas été observées chez le primate (*Kirk et al., 1999*). De plus, il a été observé, lors d'essais cliniques chez l'homme des thromboses artérielles, possiblement liées à la présence de CD154 sur les plaquettes, favorisant le thrombus artériel (*André et al., 2002*), entraînant l'interruption prématurée de ces essais.

Le développement d'anticorps anti-CD40 (*Haanstra et al., 2003, 2005; Imai et al., 2007*) pourrait être une bonne alternative, afin d'inhiber le couple CD40/CD40L dont la fonction costimulatrice est très importante dans l'activation lymphocytaire, tout en évitant les effets secondaires thrombogènes observés lors du blocage de CD154 (CD40L). Une première étude chez le primate en 2009, a permis de montrer des résultats prometteurs et non toxiques de cette molécule (*Aoyagi et al., 2009*). Très récemment, une étude randomisée et en double aveugle, a été menée chez l'homme avec l'Isalimab, Ac monoclonal bloquant la voie CD40. Cette étude a été menée pour permettre d'examiner l'innocuité, la tolérabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de l'Isalimab chez des sujets sains et des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Toutes les doses ont bien été tolérées, sans modification cliniquement pertinente des paramètres de sécurité et sans événement thromboembolique. L'Isalimab semble être un Ac prometteur, dans le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L, avec une utilisation potentielle en transplantation et dans d'autres maladies auto-immunes (*Espié et al., 2020*).

2.4.3. Inhibition de PDL1-Ig

La voie PD1/PDL1 est une voie de costimulation négative essentielle, jouant un rôle clef dans la régulation de la réponse allo-immune, c'est pour cela que la cibler lors de transplantation d'organes, pourrait avoir un impact sur le système immunitaire du receveur et un rôle dans l'acceptation du greffon.

Après transplantation d'organe, il a été démontré que le ciblage de la voie du PD1/PDL1 par le biais de protéines de fusion, comme PDL1-Ig, pouvait améliorer la survie de l'allogreffe. Cette amélioration ne se fait pas par l'utilisation seule du PDL1-Ig, mais lors d'une combinaison avec une dose suboptimale d'anti-calcineurine. Les deux molécules agissant en synergie, permettent une meilleure prise du greffon, en inhibant la production IFN γ et de ce fait, la production de toutes les chimiokines et leurs récepteurs dépendants de l'IFN γ (*Ozkaynak et al., 2002*).

La voie PD1/PDL1 a un effet important sur l'inhibition de l'allo-réactivité des LT (*Akiyama et al., 2002; Aramaki et al., 2004*), et lorsqu'elle est combinée avec d'autres approches - comme la modulation d'un des signaux médiés par les molécules de costimulation ou une immunosuppression classique – pourrait prolonger considérablement la survie de l'allogreffe et même prévenir le rejet chronique, induisant l'acceptation de l'allogreffe à long terme (*Wang et al., 2007*).

Problématique

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés précédemment au sein de l'équipe ainsi que les résultats observés dans la littérature.

Le Belatacept a montré d'excellents résultats cliniques avec une meilleure survie des patients, ainsi qu'une meilleure survie de greffon par rapport aux patients traités avec des CNI.

Ces résultats peuvent en partie s'expliquer par une diminution des DSA préformés chez les patients non immunisés avant la greffe, avec la diminution d'au moins un facteur trois de la synthèse de ces DSA lorsque les patients étaient traités avec du Belatacept, par rapport à la cohorte contrôle de patients traités avec des CNI (*Vincenti, 2016*). Ces patients présentaient également une augmentation des LB transitionnels, sous population particulière de LB, connue comme étant une population régulatrice, notamment surexprimés chez les patients tolérants opérationnels (*Newell et al., 2010*).

Ces observations ont également pu être mise en évidence dans la cohorte BELACOR (article en annexe 2) de patients immunisés avant greffe (présence de DSA historiques) traités avec du Belatacept. En effet, le Belatacept permet de diminuer la synthèse de DSA préformés après transplantation.

Au sein du laboratoire, nous avons également mis en évidence l'effet du Belatacept sur la collaboration Tfh – LB *in vitro* (article en annexe 1). Dans cette article Claire Leibler a mis en place un modèle de co-culture de Tfh-LB *in vitro*, dans lequel elle montrait une diminution de l'expression d'ICOS à la surface des Tfh, se traduisant par une diminution de l'activation de ces cellules, lorsqu'elle traitait les cellules avec du Belatacept. Elle observait également une diminution des plasmablastes en présence de Belatacept. Ces observations ont également pu se faire en clinique, chez des patients transplantés rénaux. Lorsque les patients étaient traités avec du Belatacept, ils présentaient moins de Tfh ICOS+ au niveau du sang circulant, par rapport à une cohorte de patients transplantés rénaux traités avec des CNI, ou par rapport à une cohorte d'individu sain. La diminution de la fréquence en plasmablastes a également

été observée dans le sang des patients traités avec le Belatacept, par rapport aux patients traités avec les CNI. La fréquence en plasmablastes retrouvait le taux normal quantifié dans le sang des individus sains.

Dans cet article, elle montrait également une action directe du Belatacept sur la maturation B, *in vitro*. En effet, lorsqu'elle mettait en culture uniquement des LB, elle observait une diminution des plasmablastes, une diminution des Ig, ainsi que la diminution de Blimp-1, lorsque les LB étaient traités avec du Belatacept.

Ces résultats montrent, tout d'abord *in vivo*, l'implication du Belatacept dans le contrôle de la réponse humorale en diminuant la synthèse de DSA. Puis *in vitro*, en agissant sur la collaboration Tfh/LB, ainsi que sur le processus de maturation B et la génération de plasmocytes fonctionnels.

L'objectif de ma thèse a naturellement découlé de tous ces résultats et a consisté à déterminer si le Belatacept agissait directement sur la collaboration Tfh/LB au niveau des CG, au sein des OL II^{aires}, en altérant le processus de maturation du LB, pour *in fine* diminuer la synthèse d'Ig sécrétées par les plasmocytes.

L'accès aux OL II^{aires} chez les patients transplantés n'étant pas possible, il a fallu mettre en place *in vivo*, un modèle de CG humains fonctionnels dans des souris immunodéficientes, afin d'étudier l'effet direct du Belatacept sur les CG humains **(Article 1)**.

Résultats

Belatacept alter human germinal centers function in immunodeficient mice

Samson C, Thiolat A, Moktefi A, Leibler C, Cohen JL, Pilon C, Grimbert P.

En transplantation, la majorité des perte de greffon après transplantation est lié à un événement humoral. La prévention de l'apparition de ces DSA est donc un enjeu majeur en transplantation.

Le belatacept a montré d'excellents résultats cliniques chez les patients transplantés, il fait désormais partie des molécules classiquement utilisées pour inhiber la réponse humorale. Il permet la diminution de la sécrétion de DSA par les LB par l'inhibition de la coopération LB et Tfh au niveau des CG, siège de la différenciation lymphocytaire B.

Le manque d'accès direct aux CG chez l'homme et le nombre limité de modèle de CG humains chez la souris freinent l'étude des effets des traitements immunosuppresseurs, notamment du belatacept, sur les OL II^{aires}.

Toutes ces raisons ont mené à l'élaboration de ce projet portant sur l'étude de l'effet du belatacept sur des centres germinatifs fonctionnels humains dans un modèle de souris immunodéficientes.

Parmi les rares modèles existants nous avons décidé d'adapter celui de Schmidt et al., décrit dans Plos One en 2008, consistant à injecter 20×10^6 de PBMC humains directement dans la rate (injection intra-splénique) de souris immunodéficientes : les NOD rag1 (-/-) pprf1(-/-). Ils suppléaient également les souris avec le facteur de survie essentiel au développement du LB : huBlys.

Dans notre modèle nous avons décidé d'injecter 10×10^6 PBMC déplétés en lymphocytes CD8+ (afin de limiter les effets de la xénoGVH) dans des souris immunodéficientes : les NSG (NOD/scid/IL-2R γ -/-). L'administration d'huBlys n'étaient pas nécessaire à la formation de CG humains dans notre modèle.

Une fois le modèle de CG humains mis en place dans les rates de souris NSG, nous avons voulu étudier l'effet du belatacept sur ces structures. Nous avons maintenant assez de recul pour savoir que le belatacept agit directement sur le LB mais aussi sur la coopération LB/Tfh. L'une des principales hypothèses était que le belatacept agissait directement sur les OL II^{aires} et plus particulièrement sur la fonctionnalité des CG. Grâce à ce modèle nous avons pu confirmer l'effet direct du belatacept sur la mise en place d'une réponse plasmocytaire fonctionnelle en intervenant au niveau de l'ontogénie B dans les CG.

Ce premier travail soumis à AJT a permis (I) de mettre place un modèle permettant l'évaluation de traitements sur la réponse humorale (II) de confirmer l'action du belatacept sur le développement des centres germinatifs.

Article

Belatacept alter human germinal centers function in immunodeficient mice

Samson C^{2,3}, Thiolat A^{2,3}, Moktefi A⁵, Leibler C⁴, Cohen JL^{1,2,3}, Pilon C^{1,2,3}, Grimbert P^{1,2,3,4}

Affiliations

1. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe hospitalo-universitaire Chenevier Mondor, Centre d'Investigation Clinique Biothérapie, F-94000, Créteil, France ;
2. Université Paris-Est, UMR_S955, UPEC, F-94000, Créteil, France ;
3. Inserm, U955, Equipe 21, F-94000, Créteil, France ;
4. AP-HP, Groupe hospitalo-universitaire Chenevier Mondor, Service de néphrologie-transplantation, F-94000, Créteil, France ;
5. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Groupe hospitalo-universitaire Chenevier Mondor, Service d'anapathologie clinique, F-94000, Créteil, France ;

Corresponding author email: philippe.grimbert@aphp.fr

Abbreviations

ABMR: antibody-mediated rejection

ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity

APC: antigen-presenting cell

BAFF: B-cell activating factor

DSA: donor-specific antibody

GC: germinal center

Ig: Immunoglobulin

Il: Interleukine

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

Tfh: T follicular he

Abstract

The humoral response, mediated by alloantibodies directed against donor HLA molecules (DSAs), is one of the main causes of graft loss in kidney transplantation. Understanding the physiopathological mechanisms involved during humoral rejection as the development of therapeutic tools are therefore a main objective in the field of solid organ transplantation.

Among the immunosuppressive agents used in renal transplantation, Belatacept, a monoclonal antibody targeting T costimulatory molecules has also shown its ability to more effectively prevent the secretion of DSA by different mechanisms including a direct action on plasma cells but also on B lymphocytes and follicular helper T lymphocytes (Tfh) cooperation. This cellular cooperation occurs within germinal centers (GC), the seat of B lymphocytes differentiation.

After developing a mouse model of functional human GC, we wanted to study the effect of Belatacept on GC formation as well as on the ability of B lymphocytes to secrete immunoglobulin (Ig). We demonstrate that unlike other immunosuppressive agents such as Calcineurin inhibitors, Belatacept inhibits the formation of these GCs, by inhibiting the frequency of Tfh and B lymphocytes. This alters the B maturation and therefore the generation of plasma cells and consequently the Ig secretion.

These results open new strategies to study other immunosuppressive molecules for a better control of humoral responses in the field of transplantation and autoimmune diseases

Introduction.

Solid organ transplantation has become the best therapeutic option for end-stage organ disease but faces two major issues: the limited transplant supply and the poor long-term transplants outcome which have not improved over the past 30 years (Loupy and Lefaucheur, 2018). This observation is related to the occurrence of antibody-mediated rejection (ABMR) which remains the death-censored leading cause of transplant loss across all solid organ transplants (Smith and Colvin, 2012). Anti-HLA donor-specific antibodies (DSAs) arising after kidney transplantation, also called *de novo* donor-specific antibodies (*dn*DSAs), have increasingly been recognized as the leading cause of both acute and chronic ABMR (Aubert et al., 2017). Approximately 15%–30% of KTRs develop *dn*DSAs (Wiebe et al., 2012).

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 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 [CTLA4]-Ig; LEA29Y; Bristol Myers Squibb) is a human fusion protein combining the extracellular portion of CTLA4 that has been mutated to confer greater binding avidity to CD80 and CD86 (B7 molecules) and the constant region fragment of human IgG1. CTLA4 binds to surface costimulatory ligands (CD80 and CD86) of antigen-presenting cells (APCs) and thus, prevents their interaction with CD28, thereby blocking T cell activation (Vincenti et al., 2005).

Long term follow-up analysis of the Phase 3 clinical trial using Belatacept showed that recipient mortality and the graft failure rate at 7 years after transplantation were significantly lower in the group of recipients treated with Belatacept compared with the

control recipients treated with calcineurin inhibitors (CNIs). Interestingly, incidence of *dn*DSAs at year 7 was significantly lower in Belatacept-treated patients than in CNI-treated patients (Vincenti, 2016).

These clinical results are likely to be explained by experimental studies aiming to analyze the effect of Belatacept as other costimulatory inhibitors molecules on different steps of the B cell-mediated response in humans.

Using a preclinical model of ABMR after renal transplantation in macaques, Kir et al showed that Belatacept prevents the maturation of B cells in peripheral blood and memory T cell populations in secondary lymphoid organs and finally suppresses germinal center reconstruction after T cell depletion (Lo et al., 2015)

In vitro human studies show that Belatacept reduces plasmablast differentiation, Ig production, and expression of the major transcription factor involved in plasma cell function, Blimp-1, and all independently of T lymphocytes (Leibler et al., 2018). Belatacept also induces the activation of the Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) on stimulated B cells and reduces the expression of CD86 on their surface (Leibler et al., 2018). When Tfh and B lymphocytes are co-cultured, Belatacept blocks CD28-mediated Tfh activation (Leibler et al., 2018). Moreover, patients treated with Belatacept, exhibited a reduced proportion of blood effector B lymphocytes and activated Tfh (PD1⁺ ICOS⁺) compared to control transplant patients treated with CNI (Leibler et al., 2018). Taken all together, results proved that Belatacept modulates the function of B cells directly and at the level of the B cell-Tfh interaction.

Here, using an experimental *in vivo* model of human germinal centers formation in NSG (NOD/scid/IL-2R γ ^{-/-}) mice, we aim to demonstrate for the first time the detrimental role of Belatacept on human germinal centers formation.

Materiel and methods

Mice

NSG (NOD/scid/IL-2R γ ^{-/-}) mice were obtained from Charles River (Miserey, France). Manipulations were performed according to European Union guidelines and with approval of the Regional Ethics Committee in Animal Experimentation no. 16, Ile-de-France, France (authorization no. 11/12/12-11B).

Blood sample

Human PBMCs were obtained from healthy donors (Etablissement Francais du Sang, Créteil, France). PBMCs were isolated by density gradient centrifugation (Lymphocyte Separation Medium; Eurobio®, France). CD8 depletion was made thanks to a negative depletion with CD8⁺ T Cell Isolation Kit from Miltenyi Biotec (Paris, France).

***In vivo* experiment**

10 x 10⁶ PBMC (depleted or not in CD8⁺) are injected in recipient mice by an intrasplenic injection. Before surgery, mice were given an analgesic solution of buprenorphine. Then, they are kept anesthetized under isoflurane gas. Mice did not show any symptoms of xenograft versus host disease (xenoGVHD) until day 21. The weight of the mice and their general state of health (signs of xenoGVHD) are checked 3 times a week.

Belatacept and ciclosporine treatments

Recipient mice were treated by one intraperitoneal injection at day 0 or day 12, of Belatacept (Nulojix, Bristol-Myers Squibb Pharma) at 5mg/kg, or ciclosporine (Novartis, Pharma S.A.S.) at 0,2mg/kg.

Flow cytometry

Human cells suspensions from mice spleen were prepared by mechanical dilacerations and then stained for the phenotype analysis. APC/Cyanine7 anti-CD19 was purchased from Biolegend (Paris, France). APC anti-CD45 and PE anti-CD8 were purchased from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). PE-Vio770 anti-CD38 was purchased from Miltenyi Biotec (Paris, France). Efluor 506 fixable viability dye was purchased from eBioscience (Paris, France). PE anti-CD138 was purchased from Beckman Coulter (Villepinte, France). Events were acquired on a FACS Canto II flow cytometer using FACS Diva software (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Immunohistochemistry

For immunoenzymatic staining, spleens were collected. Formalin fixation, paraffin inclusion, as well as standard staining (hematein-eosin) were performed on this tissue. Immunohistochemical staining was performed on 3- μ m-thick tissue sections from the formalin-fixed paraffin-embedded spleen specimens, by standardized automated method (Bond; Leica Menarini) using anti-CD20 M0755 (L26 clone, Dako, anti-CD5, NCL-L-CD5-4C7, 4C7 clone, Leica Biosystems), anti-CD38 (NCL-L-CD38-290, SPC32 clone, Leica Biosystems), anti-CD138 (M7228, MI15 clone, Dako, anti-CXCL13, MABB801, clone 53610, R&D systems), anti-BCL6 (PA0204, LN22 clone, Leica Biosystems), anti-ICOS (ab105227, SP98 clone, Abcam), and anti-PD1 (ab52587, NAT105 clone, Abcam). Slides were scanned using NanoZoomer Digital Pathology System (Nanozoomer 2.0-HT slide

Luminex

Ig concentrations were measured in the serum of mice by Luminex following the manufacturer's protocol (Affymetrix E-bioscience; Human Isotyping procartaplex).

Statistical analysis

Statistical analyses of differences between groups were performed using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test, with the software Prism 9.0 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA). All statistical tests were considered statistically different when $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$.

Results

Enrichment in B cells in spleen mice using CD8 depleted PBMCs.

Few in vivo models allow the study of human germinal centers and the B and T cells interaction. Then, in order to facilitate the B cells engraftment, we infuse human PBMC directly in the target organ, the spleen of immunodeficient NSG mice (figure1a). We thus compare the intrasplenic infusion of total PBMC with infusion of CD8-depleted PBMC (CD8 cells are directly implicated in xenoGVHD clinical symptoms development). On day 21, no difference was observed in human cells reconstitution evaluated by the percentage of huCD45, between PBMC and CD8- groups (figure 1b). However, the depletion of CD8+ significantly favored B lymphocytes survival, the proportion of CD19+ among the huCD45 increases from 19.83% to 35.48% after CD8+ depletion (figure 1b). For these reasons we decided to use CD8- infusion for all next experiments.

Belatacept reduces B cells survival and human germinal centers formation

To assess the effect of belatacept on B cells differentiation and on the GC formation in the spleen of NSG mice, we treated the mice by two different strategies: early treatment on day 0 (B0) to study the effect on the structural establishment, and at day 12 (B12) to determine the effect of Belatacept on existing functional germinal structures (figure 2a). The calcineurin inhibitor cyclosporin A was also used as a classical immunosuppressive control treatment. At the endpoint, D21, spleens of the mice were weighed to comprehensively assess the effect of the treatments on the development of GCs. Only D0 treatment with belatacept significantly reduced the spleen weight/size compared to the untreated mice (figures 2b). Indeed, both Belatacept treatments (D0

and D12) significantly decrease the percentage of huCD45+ cells in the spleen while only D0 CNI treatment modify this percentage (figure 2c). Moreover, B cells compartment was strongly affected by belatacept, with a decrease in total CD19+ percentage. Despite the diminution in B cells compartment, no significant changes in B cells subpopulations were observed in the presence of Belatacept. Apart from a slight effect on plasmablasts (CD27+CD38+) when injected at D0, CNI treatment did not modify B cells compartment in proportion and differentiation (figure 2c).

We next analyze by histology the human GC formation and structure 21 days after the IS infusion of CD8- human PBMCs. GC were visible by HE-staining (figure 3a). Immunohistochemical staining formally confirmed the presence of a B cell zone. Indeed, the CD20 expression shows the immature B cells in the center of the GC. CD38 expression shows the differentiated cells at the periphery of follicles and the CD138 positives cells outside of GCs showed the terminal stage of B cell differentiation which corresponding to plasma cells (figure 3a). The distribution of the different stages of maturation of B cells was hierarchically respected compared to a classic secondary lymphoid organ. The presence of T zone was also evaluated by the CD5+ marker. Thus, the CD5+ expression in the NSG mice highlights of the presence of T cells. The joint expression of ICOS and PD1 suggests that these T cells were indeed Tfh (Figure 3a). Bcl6 positive staining confirm the presence of follicular cells. The presence of the chemokine CXCL13, the ligand of CXCR5 express by Tfh also supports the presence of active follicles (figure 3a).

In the presence of belatacept, spleens of NSG mice show significantly fewer B zones, both in terms of naive cells (CD20+) than in terms of differentiated cells (CD38+ and CD138+) (figure 3b). We observe a significant reduction in CD5+ T cells from the T

cells area, only in the belatacept d0 group (figure 3b). Furthermore, a significant reduction of Tfh markers expression (ICOS, PD1, Bcl6, CXCL13) was observed in the spleens of mice treated with belatacept (figure 6). The CNI treatments did not affect the GCs either structurally or quantitatively (B and T cells). Belatacept appears to have a specific effect on the development and maintenance of secondary lymphoid structures.

Belatacept affects the functionality of germinal centers

We next investigate the functionality of germinal center B cells by analyzing human immunoglobulin production in the serum of mice. Human Ig (IgG1,2,3,4, IgA, IgE, IgM) were detected in large amounts in untreated mice (figure 4). However, Belatacept treatment at D0 and to a lesser extent treatment at D12 induce a significantly lower level of all IgG subtype tested (figure 4) but also IgA, IgE, and IgM (figure 4). In contrast, day 0 treatment of mice by CNI has no effect on human Ig production (figure 4) while D12 treatment slightly decreases Ig production but not significantly.

Discussion

Alloantibody response is a key determinant of allograft survival. Although this humoral response is largely dependent on the development of GC in secondary lymphoid organs, this step is only poorly studied in human due to the difficulty of access to these tissues. Moreover, experimental models although aiming to analyze allospecific GC response are limited (Chhabra et al., 2018). Here we establish the first in vivo model of human GC formation in NSG mice and next demonstrate that Belatacept specifically impairs the formation of these GC.

In fact, DSA secretions in the field of solid organ transplantation imply the migration of previously activated B and T cells to the border of B-cell follicles and T-cell zones, where they undergo cognate interactions. At this step, Tfh–B-cell crosstalk leads to the development of the GC response. GC leading to the generation of memory B cells and long-lived PCs (Deenick and Ma, 2011). Although co-stimulation molecules are fundamental for T-cell priming by dendritic cells (DCs) they have also been proven that to play an important role in the different steps of Tfh differentiation and function during GC formation (Hui et al., 2017; Li et al., 2016). Indeed, it has recently been found that continuous CD28 expression is required for Tfh differentiation (Linterman et al., 2014). Along parallel lines, CTLA-4, the inhibitory competitor of CD28, restrains Tfh responses and inhibits their B-cell stimulatory function. Specifically, deletion of CTLA4 on Tfh increased GC B cells and serum antibody titers (Sage et al., 2014; Wang et al., 2015). Although Belatacept has been mainly developed to target DC-priming of T cells, preclinical models have interestingly shown that the use of belatacept inhibited humoral responses in transplantation settings. Follicle size, GC proportion, and IL-21 secretion were decreased in Belatacept-treated primate recipients, suggesting a specific role of Belatacept on Tfh–B-cell crosstalk.

The studies by Chen et al.(Chen et al., 2013) and Young et al.(Young et al., 2016) further showed, in murine models, that delayed CTLA4-Ig could inhibit ongoing humoral response, even if priming of allogeneic T cells had already occurred. Indeed, the introduction of CTLA4-Ig treatment 14 days after sensitization inhibited alloantibody production and collapsed GC responses. These results suggested that CTLA4-Ig action on B-cell stimulatory capacities were important, independently of T-cell priming by DCs. Recently, in a murine skin transplant model, Badell et al.(Badell et al., 2018) showed that Belatacept inhibited the function of adoptively transferred allogeneic Tfh leading to decreased sensitization.

We further studied mechanisms underlying Belatacept action on humoral response in humans(Leibler et al., 2018). We have previously shown that Belatacept inhibited Tfh–B-cell crosstalk *in vitro* by decreasing the proportion of activated PD-1+ICOS+Tfh cells, decreasing Tfh proliferation, and decreasing the differentiation of B cells into plasmablasts. These *in vitro* data account for clinical results showing a marked reduction in de novo DSA synthesis in renal transplant recipients treated with Belatacept when compares to CNI(Vincenti, 2016).

Our model offers mechanistic understanding of both clinical and *in vitro* data suggesting that CTLA4-mediated costimulatory blockade impair specifically several steps of humoral response

In fact, Belatacept appears to have a specific effect on the development and maintenance of secondary lymphoid structures. We observed a decrease in the size of the follicle and the amount of GC. Furthermore, the co-stimulatory blockade agents have serious consequences on the quality of GC since we observed a significant reduction of Tfh. It implies that targeting co-stimulatory pathway led to the induction of

a new equilibrium of T cells population and functions. Significant reduction in Ig production confirm functional consequences of these observations

With the development of new molecules aiming to control humoral response in the field of transplantation, the main challenge will be to design the most adequate strategies. Analyze of cellular barriers-niches such as GC and BM-niches structure and function using other therapeutic targeting B and plasma cells activation will be determinant for a better control of the humoral response occurring in the field of allo transplantation and autoimmune disease.

Acknowledgments

We want to thank X. Decrouy, C. Gandolphe et W. Verbecq-Morlot from Institut Mondor de Recherche Biomédicale imaging facility and M. Surenaud from IMRB luminex platform. France Pirene teams for cytometer access.

Figure Legend

Figure 1: Intrasplenic injection of human CD8 depleted PBMCs allow B cells engraftment

A) Protocol design. Intrasplenic injection of NSG mice were realized with 10×10^6 of PBMC or CD8 depleted PBMCs (CD8⁻). Mice were sacrificed at day 21 and spleens were harvested for analysis. **B)** Flow cytometry detection of human cells at day 21 in the spleen of NSG mice. Histograms represent percentage of human CD45⁺ and CD19⁺ cells are represented. Pie charts represent human cells (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ cells and other) proportion in each group. All samples were initially gated for living lymphocytes by forward and side scatter. The cumulative data of five independent experiments are shown. Each point represents a single xenograft; data are presented as mean percentage \pm SEM. Statistical significance from the controls (PBMC) was determined using Mann-Whitney tests. * $p \leq 0.05$.

Figure 2: Belatacept decreased human B cells persistence

A) Protocol design. Intrasplenic injection of NSG mice were realized with 10×10^6 of CD8 depleted PBMCs (CD8⁻). Belatacept (5mg/kg) or CN1 (0,2mg/kg) were injected either at the same day of cells injection (B0, C0) or at day 12 (B12, C12). Untreated mice (NT) served as control group. Mice were sacrificed at day 21 and spleens were harvested for flow cytometry analysis. **B)** Spleen pictures comparing an untreated mouse versus a B0 treated mouse. Spleen weight (g) of each group at day 21. The cumulative data of five independent experiments are shown. Each point represents a single xenograft; data are presented as mean percentage \pm SEM. Statistical significance from the controls (NT) was determined using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. **** $p \leq 0.0001$. **C)** Gating strategy and percentage of human CD45⁺ cells, CD19⁺ B cells, CD27⁺/CD38⁺ B differentiated cells and

CD138⁺ cells in untreated (NT) and treated groups (B0, B12, C0, C12). The cumulative data of five independent experiments are shown. Each point represents a single xenograft; data are presented as mean percentage \pm SEM. Statistical significance from the controls (NT) was determined using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. $p \leq *0.05$, $**0.01$, and $****0,0001$.

Figure 3: Belatacept inhibited human B and Tfh cells engraftment.

Intrasplenic injection of NSG mice were realized with 10×10^6 of CD8 depleted PBMCs (CD8⁻). Belatacept (5mg/kg) or CN1 (0,2mg/kg) were injected either at the same day of cells injection (B0, C0) or at day 12 (B12, C12). Untreated mice (NT) served as control group. Mice were sacrificed at day 21 and spleens were harvested and fixed for immunohistological analysis. **A)** Photographs of histological sections: sections were visualized and photographed using a NanoZoomer Digital Pathology System (Nanozoomer 2.0-HT slide scanner (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan)). Serial sections were stained with hematoxylin and eosin, anti-human CD20 / CD38 / CD138 for B cells analysis and anti-human CD5 / ICOS / PD1 / CXCL13 for Tfh analysis. Original magnification x20 for H&E coloration, CD5 and CD20 staining; x100 for NT mice (Bcl6, PD1, ICOS, CD38⁺ and CD138), C0 mice (Bcl6, PD1, CD38⁺ and CD138), C12 mice (Bcl6, PD1, ICOS, CD38⁺ and CD138), B12 mice (CXCL13, PD1, CD38⁺ and CD138); x200 for NT mice (CXCL13), C0 mice (CXCL13 and ICOS), C12 mice (CXCL13), B0 mice (CXCL13, Bcl6, PD1, ICOS, CD38⁺ and CD138) and B12 mice (CXCL13, Bcl6 and ICOS). **B)** Histological quantification of human CD5⁺ T cells, ICOS⁺ or PD1⁺ Tfh cells, BCL6⁺ and CXCL13⁺ GC cells, CD19⁺ B cells, CD27⁺/CD38⁺ B differentiated cells and CD138⁺ cells per mm². The cumulative data of two independent experiments are shown. Each point represents a single xenograft;

data are presented as mean percentage \pm SEM. Statistical significance from the controls (NT) was determined using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. $p \leq *0.05$, $**0.01$, and $****0,0001$.

Figure 4: Belatacept treatment affect the plasma cells' ability to secrete immunoglobulins.

Intrasplenic injection of NSG mice were realize with 10×10^6 of CD8 depleted PBMCs (CD8-). Belatacept (5mg/kg) of CNI (0,2mg/kg) were injected either at the same day of cells injection (B0, C0) nor at day 12 (B12, C12). Untreated mice (NT) served as control group. Serum of mice were collected at day 21 and human immunoglobulin, IgG (1,2,3 and 4), IgA, IgE, and IgM were analysis by Luminex assay. The cumulative data of five independent experiments are shown. Each point represents a single xenograft; data are presented as mean percentage \pm SEM. Statistical significance from the controls (untreated CD8-) was determined using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons test. $p \leq *0.05$, $**0.01$, $***0,001$ and $****0,0001$.

References

1. OPTN: Organ Procurement and Transplantation Network - OPTN. <https://optn.transplant.hrsa.gov/>.
2. Agence de la biomédecine. <https://www.agence-biomedecine.fr/>.
3. Loupy, A. & Lefaucheur, C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N. Engl. J. Med.* (2018) doi:10.1056/NEJMra1802677.
4. Smith, R. N. & Colvin, R. B. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin. Immunol.* **24**, 115–121 (2012).
5. Aubert, O. *et al.* Antibody-Mediated Rejection Due to Preexisting versus De Novo Donor-Specific Antibodies in Kidney Allograft Recipients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28**, 1912–1923 (2017).
6. Wiebe, C. *et al.* Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **12**, 1157–1167 (2012).
7. Vincenti, F. *et al.* Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **353**, 770–781 (2005).
8. Vincenti, F. Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2600–2601 (2016).
9. Lo, D. J. *et al.* A pilot trial targeting the ICOS-ICOS-L pathway in nonhuman primate kidney transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **15**, 984–992 (2015).
10. Leibler, C. *et al.* Control of Humoral Response in Renal Transplantation by Belatacept Depends on a Direct Effect on B Cells and Impaired T Follicular Helper-B Cell Crosstalk. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **29**, 1049–1062 (2018).
11. Chhabra, M. *et al.* Germinal Center Alloantibody Responses Mediate Progression of Chronic Allograft Injury. *Front. Immunol.* **9**, 3038 (2018).
12. Deenick, E. K. & Ma, C. S. The regulation and role of T follicular helper cells in immunity. *Immunology* **134**, 361–367 (2011).
13. Li, J., Lu, E., Yi, T. & Cyster, J. G. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-quenching dendritic cells. *Nature* **533**, 110–114 (2016).
14. Hui, E. *et al.* T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1–mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
15. Linterman, M. A. *et al.* CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* **3**, (2014).

16. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* **41**, 1026–1039 (2014).
17. Wang, C. J. *et al.* CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 524–529 (2015).
18. Chen, J. *et al.* Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **13**, 2280–2292 (2013).
19. Young, J. S. *et al.* Delayed Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4-Immunoglobulin Treatment Reverses Ongoing Alloantibody Responses and Rescues Allografts From Acute Rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **16**, 2312–2323 (2016).
20. Badell, I. R. *et al.* Selective CD28 Blockade Results in Superior Inhibition of Donor-Specific T Follicular Helper Cell and Antibody Responses Relative to CTLA4-Ig. *Am. J. Transplant.* **18**, 89–101 (2018).

FIGURES

A

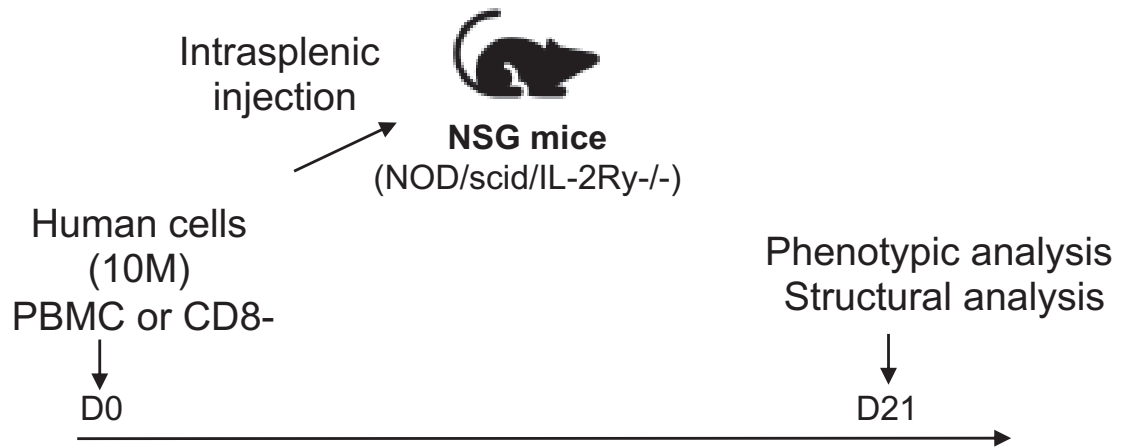


Figure 1A

B

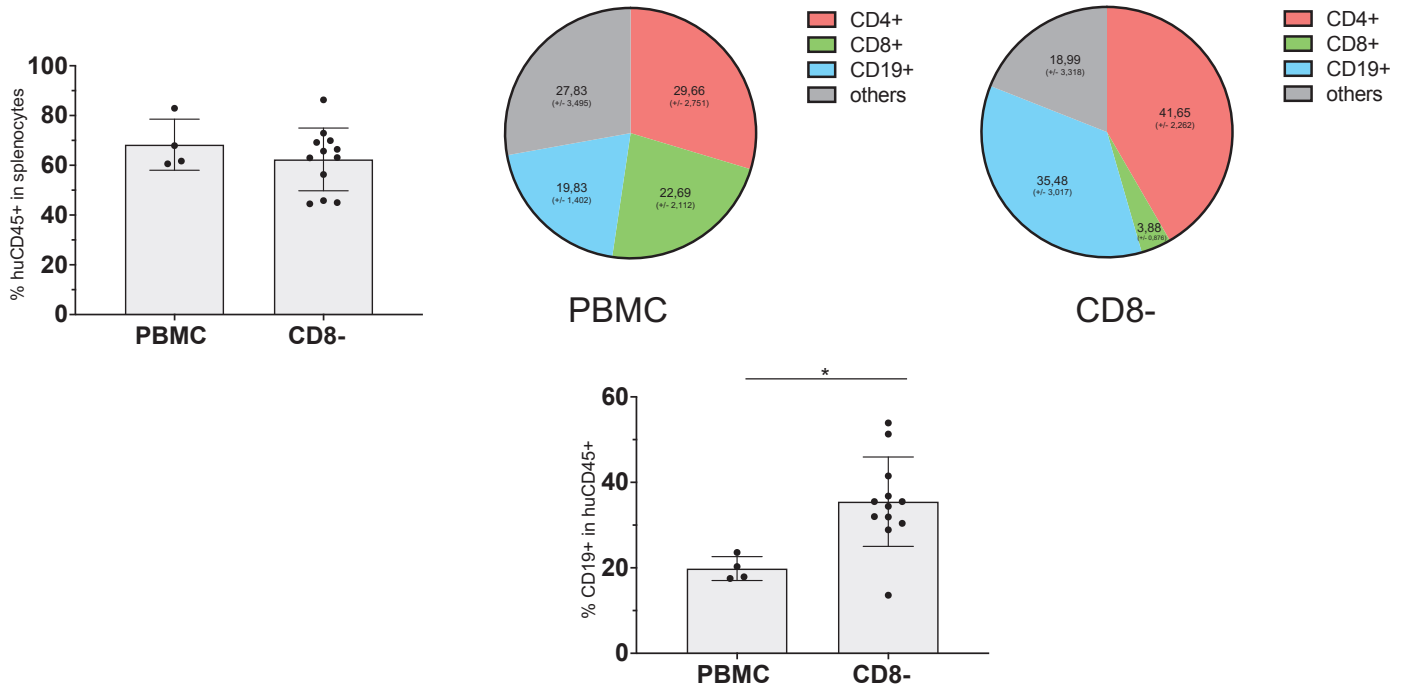


Figure 1B

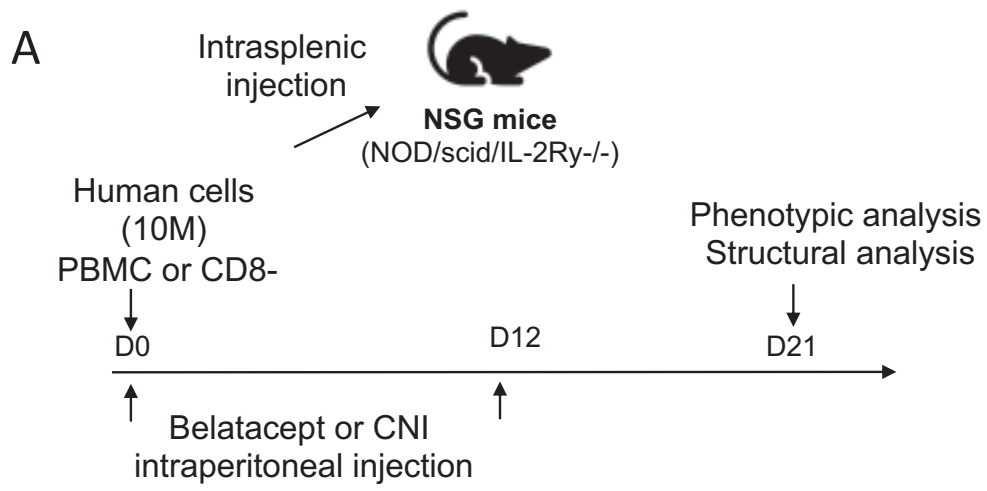


Figure 2A

B

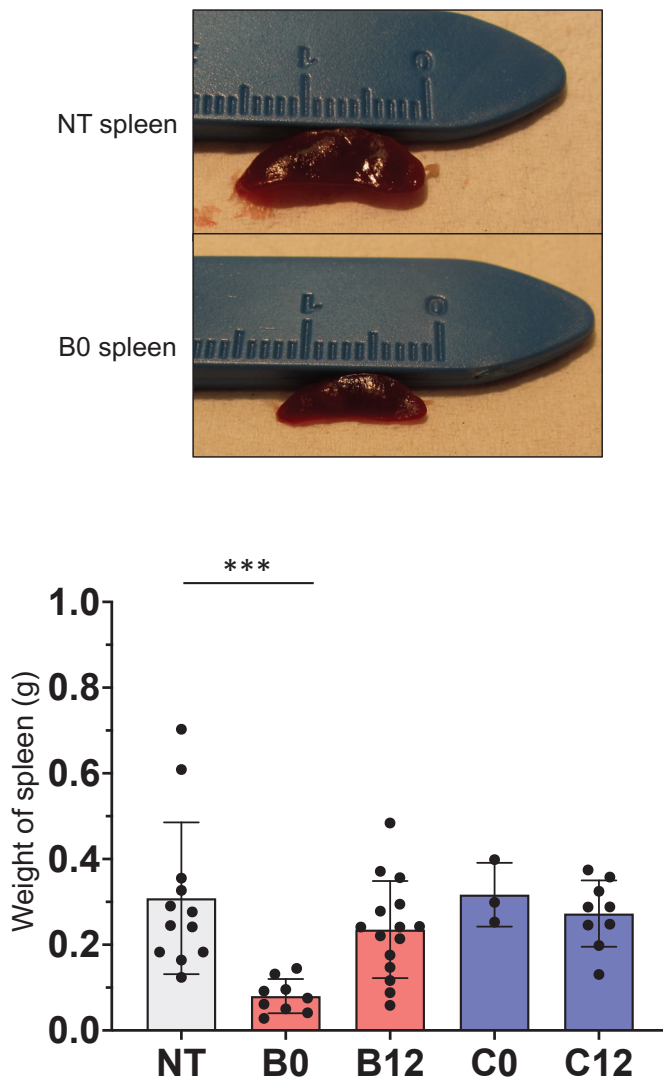


Figure 2B

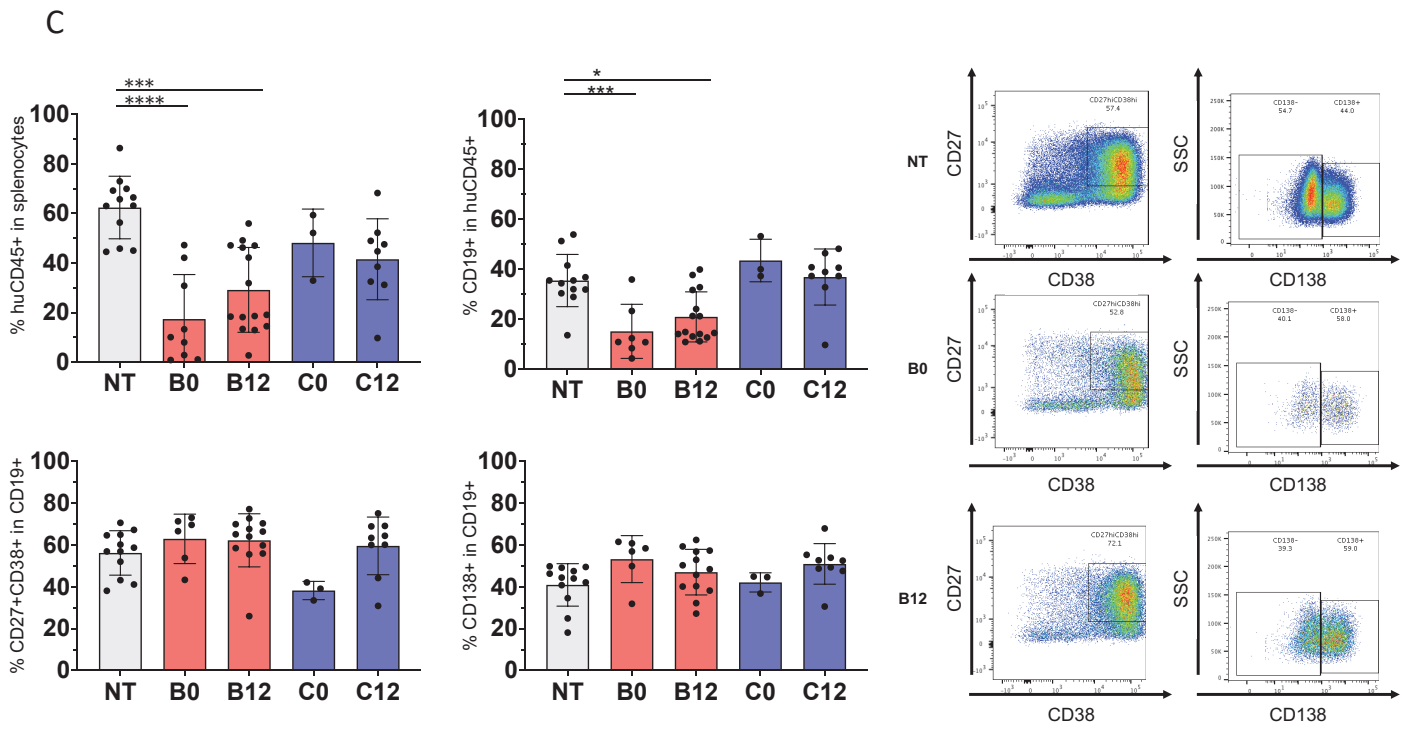


Figure 2C

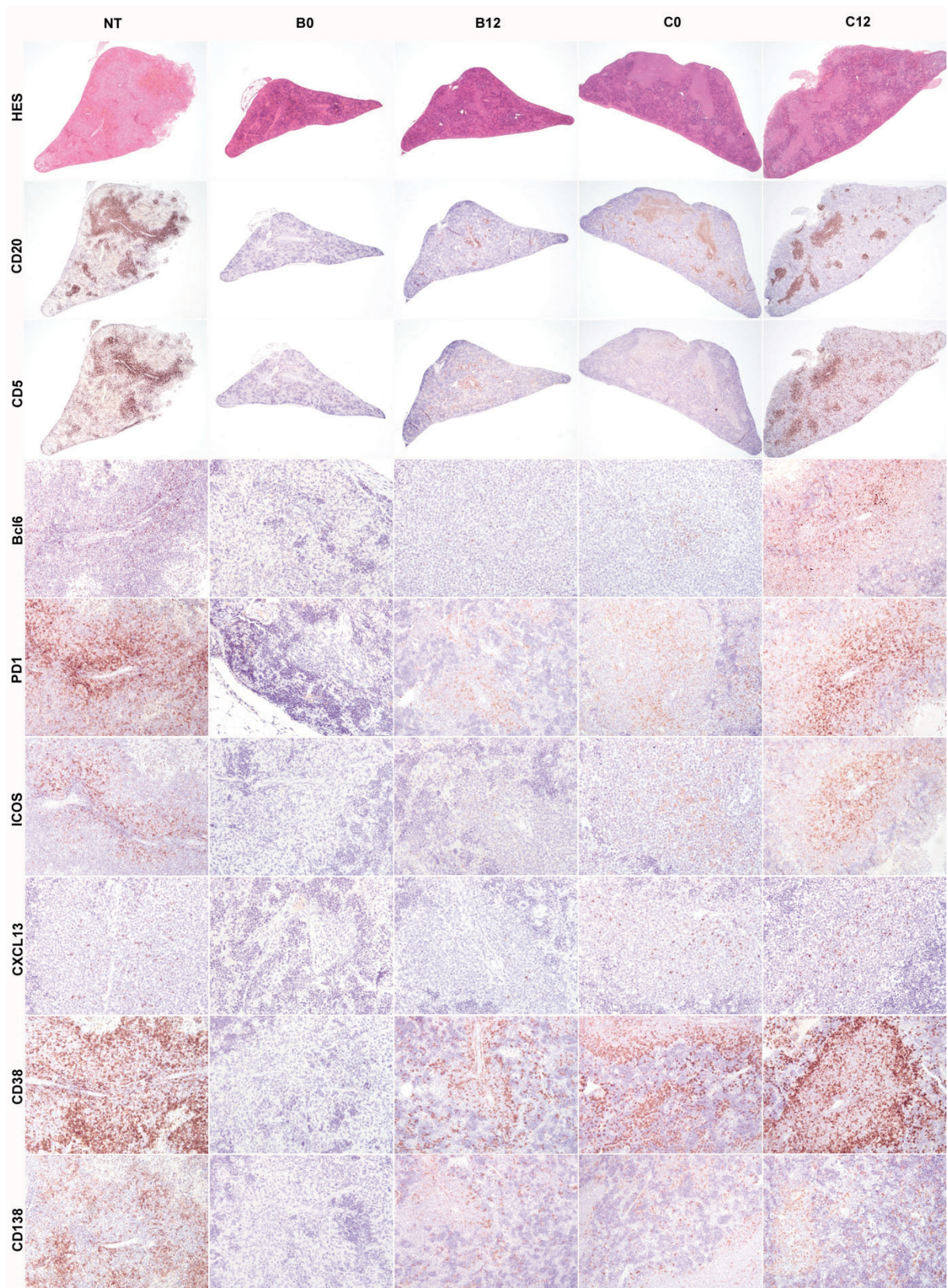


Figure 3A

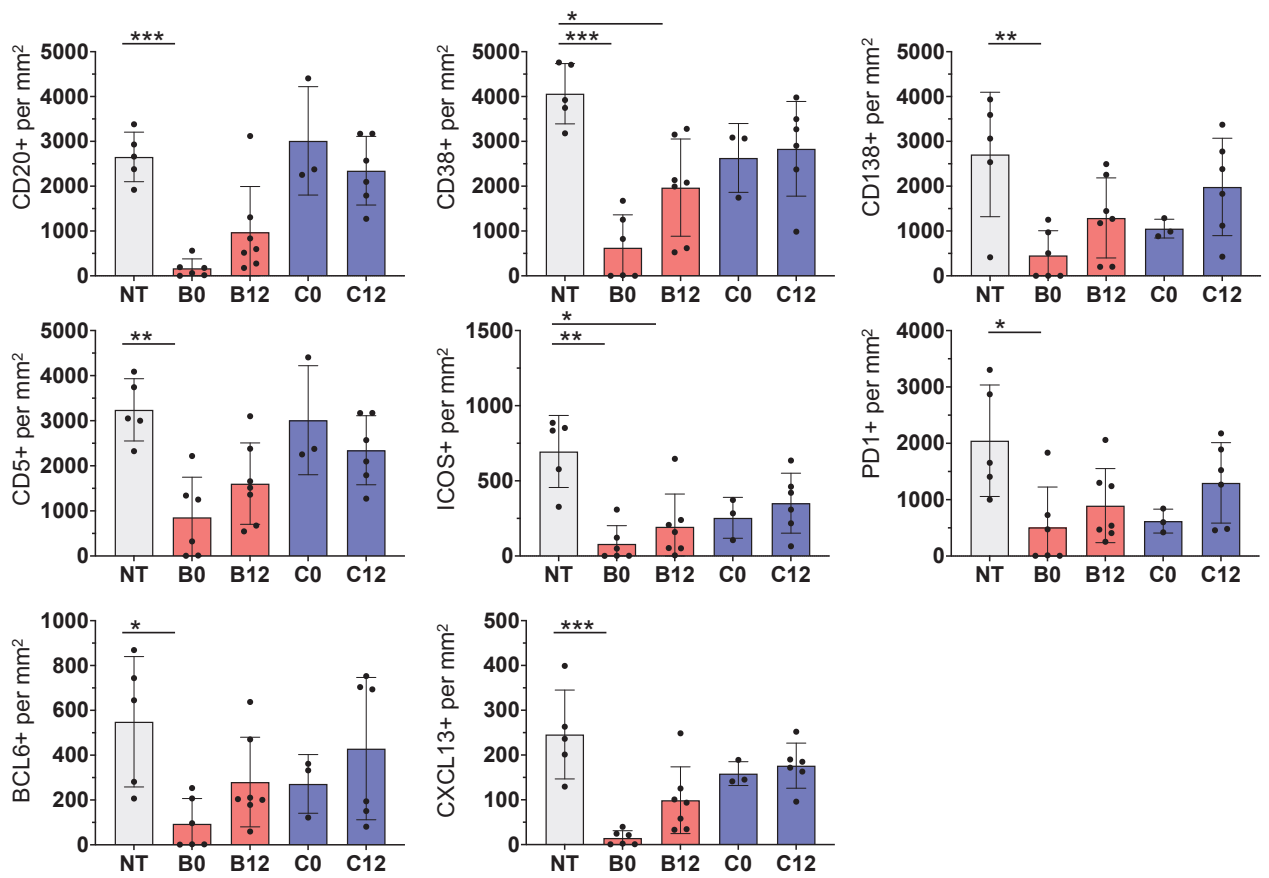


Figure 3B

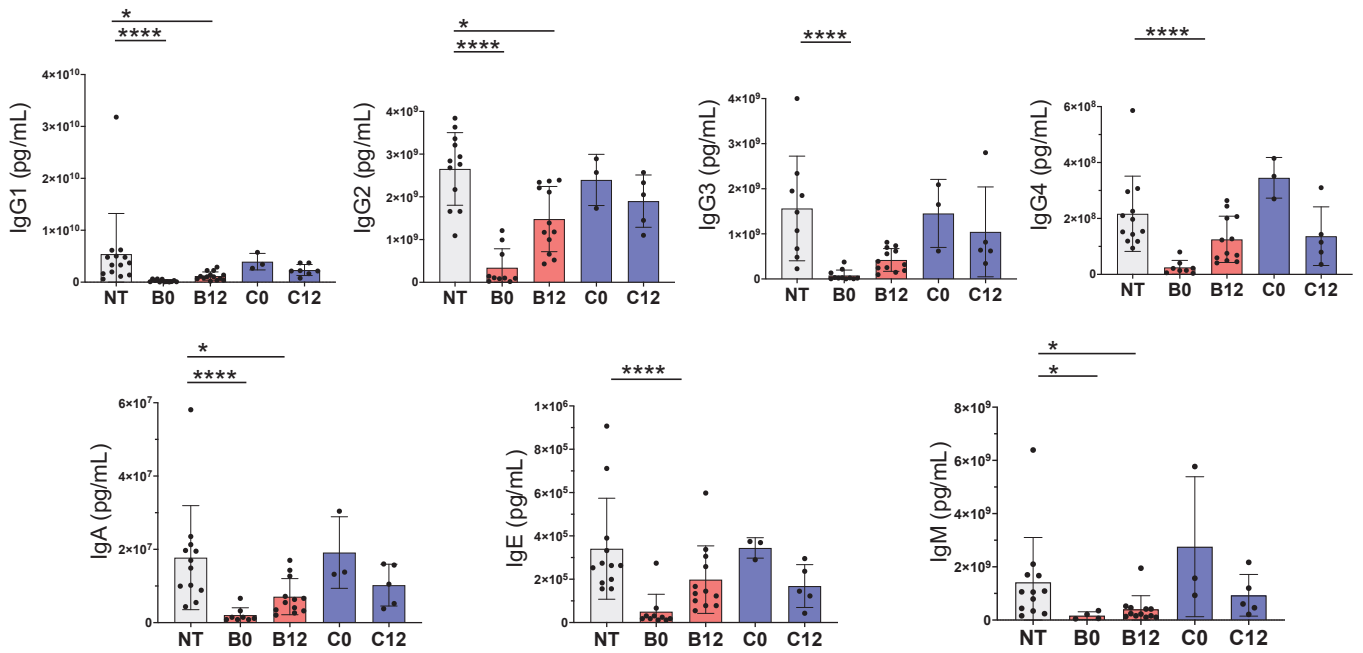


Figure 4

Discussion et perspectives

L'un des enjeux majeurs de la transplantation est de contrôler la réponse humorale. Actuellement de nombreuses approches sont envisagées dans ce but comme nous l'avons décrit dans la revue en annexe (Leibler et al., 2019a).

L'une des hypothèses que nous avons émis (Leibler et al., 2018) était que le belatacept pouvait agir directement sur les CG contrairement au CNI. Cette hypothèse est bien évidemment difficile à confirmer directement chez le patient, car l'accès aux CG est aux OL II^{aires} reste problématique.

Bien que le belatacept ait principalement été développé pour cibler l'amorçage des cellules T par les CPA, les modèles précliniques ont montré de manière intéressante que l'utilisation du belatacept inhibait la réponse humorale dans un contexte de transplantation. Dans un modèle chez le primate non humain (Kirk et al., 1997), on peut observer une diminution de la taille des follicules, la proportion de GC et la sécrétion de IL21 chez les animaux ayant reçu du belatacept, ce qui suggère un rôle spécifique du belatacept sur la coopération Tfh / LB. Les études de Chen et al. (*Chen et al., 2013*) et Young et al. (Young et al., 2016) ont montré dans des modèles murins, que l'administration tardive de CTLA4-Ig pouvait inhiber la réponse humorale en cours, même si l'amorçage des cellules T allogéniques avait déjà eu lieu. En effet, l'introduction du traitement CTLA4-Ig 14 jours après la sensibilisation a inhibé la production d'alloAc et réduit les réponses provenant du CG. Ces résultats suggèrent que l'action de CTLA4-Ig sur les capacités de stimulation des LB est importante, indépendamment de l'amorçage des LT par les DC.

Nous avons donc développé ce modèle murin afin d'étudier l'action du belatacept sur la formation des CG humains dans la rate et ses conséquences sur la mise en place d'une réponse humorale humaine fonctionnelle.

Notre modèle semble confirmer cette hypothèse. Nous observons une réelle diminution des CG, et des cellules B, tant d'un point de vue quantitatif que fonctionnel, lorsque les souris sont traitées avec du belatacept par rapport aux souris non traitées ou aux souris traitées avec des CNI (traitement contrôle).

A. Originalité du modèle

La mise au point de ce modèle a nécessité de nombreux travaux expérimentaux.

Dans notre laboratoire, nous avons pu remarquer que dans la plupart des modèles de xénogreffe, il était impossible de maintenir des LB en vie (rate, sang et MO) plus d'une dizaine de jours dans les souris NSG, lorsque les PBMC étaient injectés par voie intraveineuse. Générer des CG humains fonctionnels et ainsi permettre une différenciation B T-dépendante complète apparaissait d'autant plus complexe.

Le premier modèle murin de CG humains, a été caractérisé en 2008 (Schmidt et al., 2008). Les auteurs ont montré que l'injection de PBMC directement dans la rate de souris « NOD rag1 (-/-) ppf1(-/-) » suivi de huit injections de Blys humain permettait d'observer des structures secondaires dans la rate. Dans ce modèle bien que l'injection intra-splénique à elle seule permettait d'observer des CG, l'ajout de huBLYS augmentait le nombre de structures ainsi que la quantité d'anticorps. En utilisant ce protocole dans des souris NSG nous n'avons néanmoins pas confirmé ces résultats. En effet, nous n'avons pas mis en évidence que l'injection de Blys augmentait le nombre de structures observé et nous avons donc décidé de ne pas l'utiliser.

La mise au point de ce modèle nous a dans un second temps permis de mettre en évidence que le belatacept inhibait la formation et le développement des CG humains, ainsi que la génération de plasmocytes fonctionnels. Ces résultats n'ont en revanche pas pu être mis en évidence pour le traitement contrôle (CNI). En effet, les souris traitées avec des CNI, ont conservé les CG de façon structurelle mais aussi fonctionnelle. De plus, aucune différence au niveau des différentes sous populations de LT, en cytométrie en flux ou en histologie, n'a été observée entre les souris traitées avec les CNI et les souris non traitées (NT).

Ces résultats sont en accord avec la réalité clinique. En effet, il a été montré que l'utilisation de belatacept chez des patients transplantés rénaux entraînait une diminution de la production de DSA, (Vincenti, 2016). Les patients traités avec du

belatacept ont également une diminution des plasmablastes et des Tfh circulants par rapport aux patients CNI (Leibler et al., 2018).

Certaines hypothèses peuvent rendre compte de la différence des résultats observés entre le Belatacept et les CNI. Il est possible que les CNI n'agissent uniquement que sur les cellules circulantes et qu'elles ne sont pas capables de pénétrer dans la rate. Dans notre modèle, les cellules circulent et ont même pu être identifiées au niveau de la MO (diminution en présence de Belatacept), mais elles restent tout de même très largement majoritaires au niveau de la rate. Ce qui limite l'action des CNI ainsi que son efficacité dans notre modèle.

Notre équipe étudie également les MAI et les conséquences liées aux greffes de CSH comme la GVHD. Nous utilisons un modèle pré-clinique de souris NSG, afin d'évaluer des nouvelles stratégies thérapeutiques, comme l'administration d'Ac agonistes, dans ce contexte. Une étude est notamment en cours pour déterminer si ce modèle est adapté à l'évaluation d'Ac monoclonaux, car les premiers résultats montraient une déplétion des cellules humaines lors d'administration d'Ac antagonistes mais également lorsqu'il s'agissait d'Ac agonistes.

Il existe, chez la souris (immunocompétente) ou chez l'homme, à la surface des cellules du système immunitaire différents récepteurs susceptible de capter les fragments Fc des Ac (FcR) (Wang et al., 2018) entraînant différents mécanismes conduisant tous à l'élimination de la cellule liée à l'Ac par ses fragments Fab (ADCC, phagocytoses,...). L'effet des Ac thérapeutiques dans les souris pourraient ainsi utiliser ces mécanismes de déplétion.

Nos observations préliminaires semblent également indiquer que lorsque l'on compare l'administration d'un Ac thérapeutique combiné ou non avec une injection d'IVIG au préalable (permettant de saturer les récepteurs aux fragments Fc humains et murins), il existe une diminution d'efficacité de l'Ac thérapeutique (normalement efficace sans IVIG) lorsqu'il y a saturation des récepteurs aux fragments Fc, suggérant l'implication de ces récepteurs dans la déplétion des cellules humaines.

Suite à ces observations et sachant que le belatacept est une molécule de fusion entre le domaine de liaison extracellulaire de CTLA-4 et la fraction Fc d'une IgG1, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de la reconstitution dans la souris NSG pourrait être due à ce phénomène.

La fraction Fc du belatacept pourrait théoriquement se lier aux cellules murines par la partie Fc de son IgG1, entraînant ainsi la destruction de la cellule sur laquelle le belatacept est fixé. En conclusion, la fixation du belatacept conduirait à l'élimination des LB humains. Il faut noter que la fraction Fc de l'IgG1 composant le belatacept est mutée pour diminuer ses propriétés de liaisons aux récepteurs Fc chez l'homme. Il est vrai que la question de l'impact de cette mutation sur la modulation de la captation du belatacept par les récepteurs Fc murins se pose, cette mutation suffit-elle à duper le système immunitaire murin ?

Dans les souris immunocompétentes, il existe de nombreuses cellules possédant des FcR : les LB, les DC, les monocytes et macrophages, les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), les mastocytes et les thrombocytes. La liaison du fragment Fc de l'Ac sur le FcR active alternativement un mécanisme de phagocytose, ou de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) de l'élément (cellule, protéine antigénique, ...), lié aux parties Fab de l'Ac. Les FcR reconnaissent la région Fc de plusieurs classes et sous-classes d'Ig. On distingue les FcR pour IgG (FcγRI/CD64, FcγRII/CD32 et FcγRIII/CD16) (Bruhns and Jönsson, 2015; Pincetic et al., 2014), pour IgE (FcεRI), pour IgA (FcαRI/CD89), pour IgM (FcμR) et IgA/IgM (Fcα/μR) (Kubagawa et al., 2014). Plusieurs autres récepteurs exprimés sur différents types de cellules se lient également aux molécules d'Ig : FcR néonatal pour IgG (FcRn) sur l'épithélium intestinal, le placenta et l'endothélium, FcεR de faible affinité (FcεRII/CD23) sur les cellules B et les macrophages, et récepteur d'Ig polymère (pIgR) sur l'épithélium muqueux (Bruhns and Jönsson, 2015).

Le belatacept ayant pour fragment Fc une IgG1 (mutée), les FcR concernés sont donc les FcγRI, exprimés à la surface des monocytes et des macrophages, les FcγRII exprimés par de nombreuses cellules du système immunitaire (CD32A : plaquettes, neutrophiles, macrophages et DC ; CD32B : fDC et LB ; CD32C : LB et NK) et les

FcγRIII exprimés à la surface des monocytes, des macrophages, des NK et des neutrophiles (Pincetic et al., 2014).

Chez la souris NSG, la majorité des cellules possédant ces FcR ne sont pas fonctionnelles. Théoriquement la souris NSG ne possède pas de LB ni de LT, leur réponse innée est déficiente, elles ont une altération du développement des cellules myéloïdes et NK, conduisant à une fonction anormale de ces cellules et elles sont déficientes en C5 hémolytique (voie du complément) (Koboziev et al., 2015). Dans la pratique, il a été constaté une activité résiduelle de leurs cellules de l'immunité innée (myéloïdes et NK) (Koboziev et al., 2015), ce qui pourrait laisser imaginer qu'il resterait une activité des FcR dans les souris NSG.

Afin de valider cette hypothèse plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

Dans notre modèle, les souris NSG (NOD/scid/IL-2Rγ^{-/-}) ne sont pas immunocompétentes, elles sont déplétées en LB, LT et NK. Réduisant drastiquement la source de cellules possédant des récepteurs Fc. Théoriquement, les seules cellules fonctionnelles possédant des récepteurs Fc chez la souris NSG seraient les macrophages. Il serait donc facilement possible de préciser l'action indirect du belatacept sur les cellules humaines, en procédant à un marquage murin caractérisant la présence de macrophage dans la rate.

L'inhibition du développement de CG humains dans les rates de souris NSG avec un traitement dépourvu de récepteur Fc (un anticorps...) tel que le bortezomib, pourrait également confirmer que l'inhibition médiée par le belatacept n'est pas Fc dépendante.

B. Action du belatacept sur les CG : conséquences

Les résultats *in vitro* de Leibler et al. de 2018 (Leibler et al., 2018), ont montré que lorsque l'on traite avec du belatacept des cellules B seule ou des co-culture de LB / Tfh on pouvait observer :

i) au niveau des LB, une diminution de la fréquence des plasmocytes, se traduisant par une diminution de la différenciation B et une diminution de la sécrétion d'Ig par ces plasmocytes ;

ii) au niveau des Tfh, une diminution de l'expression d'ICOS et PD1, correspondant à une diminution d'activation de ces Tfh.

Les résultats observés *in vitro* sont le reflet des données analysées en clinique chez les patients transplantés rénaux traités avec du belatacept (Leibler et al., 2018), avec une diminution de la fréquence des Tfh circulants ainsi qu'une diminution des plasmablastes.

Ces résultats nous ont permis de nous questionner sur l'effet du belatacept sur la collaboration Tfh/LB et donc sur la maturation T dépendante des LB au sein des CG. L'accès aux OL II^{aires} chez le patient étant impossible, la mise place d'un modèle murin de CG humains était l'une des seules issues permettant de répondre à cette question.

Le modèle nous a permis de mettre en évidence une inhibition de la formation de CG, chez les souris ayant été traitées avec du belatacept. En effet, les rates des souris traitées sont beaucoup plus petites (et plus légères) que les rates des souris NT ou CNI. Cette diminution se traduit par la diminution de CG, que l'on peut aisément observer par des colorations ou grâce à des marquages immunohistochimiques sur des coupes de rates.

La diminution des CG est clairement la conséquence d'une diminution des LB et des Tfh lorsque les souris étaient traitées avec du belatacept, reflétant les résultats obtenus par Leibler et al. *in vitro* ainsi que les résultats observés chez les patients transplantés (article en annexe 1). Cette diminution était, logiquement, moins prononcée lorsque le belatacept était injecté plus tardivement (souris B12), car les CG avait pu commencer à se mettre en place, contrairement aux souris B0. En effet, l'injection du Belatacept en même temps que la xéno greffe, empêche la mise en place de CG.

Le Belatacept permet une élimination, plus ou moins importante en fonction du timing d'injection, des follicules, ce qui a pour conséquence une diminution drastique du processus de maturation B T-dépendant et ainsi du nombre de cellules sécrétrices d'Ac générées.

La diminution de plasmocytes générés par le CG, lorsque les souris sont traitées avec du belatacept, a pour principale conséquence une diminution de la sécrétion d'Ig. Dans notre modèle nous pouvons voir que toutes les classes et sous classes d'Ig (G, A, E et M) sont concernées. Notre modèle reflète les résultats cliniques, qui montrait que lorsque des patients transplantés, non immunisés avant la greffe, étaient traités avec du belatacept il diminuait d'au moins d'un facteur trois l'apparition de DSA par rapport aux patients traités avec des CNI (Vincenti, 2016).

La mise en place d'une réponse mémoire dans notre modèle - grâce à un Ag préalablement rencontré par le système immunitaire - et l'étude de l'effet du belatacept sur cette réponse pourrait être envisagée, car en clinique, les mêmes observations que Vincenti et al. ont été faites chez des patients transplantés possédant des DSA historiques (*Leibler et al., 2019b*).

C. Perspectives

1. Etude des réponses mémoires

Notre prochaine étape sera de démontrer la capacité de ces CG à générer des plasmocytes capables de sécréter des Ag spécifiques à une stimulation donnée, en d'autres termes démontrer la mise en place d'une réponse mémoire spécifique d'antigène.

1.1. Réponse vaccinale

Le modèle le plus simple à mettre en place pour nous permettre de répondre à cette question est un modèle vaccinal. Outre l'intérêt de démontrer la fonctionnalité des CG, l'étude de cette réponse vaccinale sera particulièrement utile en clinique humaine pour définir les meilleures stratégies de protection vaccinale chez les patients transplantés d'organe.

1.2. La stratégie d'approche

Nous avons choisi de développer un modèle utilisant un vaccin monovalent et couvrant une large partie de la population afin d'étudier une réponse secondaire également appelé « boost antigénique rapide » nous permettant ainsi d'éviter la survenue d'une xenoGVH. Notre choix s'est porté sur l'Engerix (vaccin contre l'hépatite B).

Le modèle expérimental utilisé était le suivant :

- I) les PBMC étaient déplétés en CD8⁺ sont issus d'un donneur avec une sérologie antérieure positive à l'hépatite B ;
- II) les souris ont été vaccinées à J21 (date à laquelle nous savons que les CG sont fonctionnels).

De plus, des sérologies doivent être réalisées avant et après le boost antigénique, afin d'étudier la présence d'anti-Hbs (Ac sécrétés en réponse à une stimulation vaccinale avec un vaccin contre l'hépatite B).

Au cours d'une expérience préliminaire nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence la présence d'Ac spécifiques. L'hypothèse la plus vraisemblable de cet échec est le manque de sensibilité des techniques de détection de ces Ac.

Sachant qu'un ELISA (technique classiquement utilisé en clinique pour étudier la sérologie de l'hépatite B d'un patient) n'est pas assez sensible pour détecter un taux correct d'Ac anti-Hbs dans le sérum avant 28 jours (Burton et al. 2018 ; Salimzadeh et al. 2018). D'autres méthodes d'analyses plus sensibles, non utilisées en routine cliniques, peuvent être utilisées comme l'ELISPOT ou l'utilisation en cytométrie en flux de tétramère spécifiques du HBsAg marqués par fluorescence se liant au BCR à la surface des cellules B spécifiques de HBsAg (Salimzadeh et al., 2018).

Il est toutefois important de souligner que peu d'étude ont réussi à analyser une réponse humorale naturelle. C'est le cas dans une expérience publiée en 2017, dans laquelle Picarda et al. démontraient dans un modèle de greffe cardiaque chez le rat une réponse immune spécifique à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) – métalloprotéine très immunogène, induisant la synthèse massive d'Ac – après plusieurs stimulations (Picarda et al., 2017). Néanmoins, dans notre modèle le

développement d'une xénoGVHD sévère ne nous permet pas d'utiliser ce protocole étendu dans le temps. Une autre étude publiée en 2014 (Ishikawa et al., 2014) a également permis d'observer la production de certains types d'auto-Ac humains pouvant être maintenus dans des souris NSG après greffe de LT mémoires et LB dérivés de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR).

2. Évaluations d'autres cibles thérapeutiques

L'étude de l'effet du belatacept et des CNI sur ce modèle de CG humains ouvre la porte à l'étude d'autres traitements, comme ceux inhibant les molécules de costimulation. Tout traitement agissant ou étant potentiellement capable d'agir sur la coopération Tfh/LB ou directement sur des cellules B différenciées (ayant besoin de passer par le CG) peut être testé dans ce modèle.

Ainsi le blocage de la voie CD40/CD40L a des conséquences dramatiques sur les réponses humorales. Chez l'homme, le déficit génétique en CD40L conduit à un trouble immunitaire sévère : le syndrome hyper IgM. Les patients qui sont génétiquement déficients en CD40L sont gravement immunodéprimés, ils sont dépourvus de réactions du CG et produisent des taux réduits d'Ac à commutation de classe, démontrant l'importance de CD40/CD40L dans les réponses immunitaires. L'étude de molécule ciblant cette voie dans notre modèle pourrait être intéressante afin de mettre en évidence ce syndrome hyper IgM ainsi que l'inhibition de la mise en place de nos CG.

PD-1/PD-L1 est également une voie d'inhibition majeure de l'activation des LT. L'utilisation d'inhibiteurs de PD-1 pour renforcer l'immunité des LT a révolutionné le traitement et le pronostic de plusieurs cancers métastatiques (Pardoll, 2012). Comme mentionné tout au long de cette thèse, les cellules Tfh expriment PD-1 mais sa fonction sur ce sous-ensemble spécifique de LT est complexe. Il semblerait avoir un rôle sur la migration des Tfh mais également sur l'affinité des LB sortant du CG (Good-Jacobson et al., 2010). Contrairement à CTLA4-Ig, qui empêche principalement les cellules T de recevoir des signaux de costimulation, l'administration de PDL1-Ig est supposée induire un signal inhibiteur via PD-1 sur les cellules T directement. L'efficacité de PDL1-Ig pour prévenir le rejet d'organe a été étudiée dans certains modèles

expérimentaux (Gao et al., 2003) notamment pour ses fonctions sur les LT, dans le contrôle de la réponse cellulaire. Son impact sur la réponse humorale, par le biais des Tfh, n'a pas encore été évalué et notre modèle semblerait très intéressant pour étudier cette question.

Ce modèle permet l'étude de l'effet d'un traitement directement sur les cellules d'OL II^{aire} et non pas seulement sur les cellules circulantes, qui on le sait, notamment chez les LB, ont un phénotype particulier. Ce modèle permet également de voir, une fois l'effet sur les cellules B mis en évidence, à quel stade de différenciation les LB s'arrêtent, s'il inhibe la différenciation, s'il entraîne une mort cellulaire sans altérer le processus de différenciation et surtout s'il est capable d'inhiber la sécrétion de DSA.

Une expérience préliminaire, consistant à réaliser le même protocole d'injection IS, mais en remplaçant le belatacept par un autre immunosuppresseur : le Daratumumab (anti CD38+). Cette molécule, utilisé dans le traitement du myelome (Lokhorst et al., 2015; Lonial et al., 2016) permet de cibler les plasmocytes, mais également toutes les autres cellules immunitaires activés et notamment les LT. Les premiers résultats sont très encourageants et ils semblent mettre en évidence, tout comme avec le belatacept, une diminution de la fréquence en cellules CD45+ humains correspondant à une diminution très importante des LB totaux (CD19+), mais également des LB activés (CD38+) et des plasmocytes (CD138+). L'étude de la sécrétion d'Ig dans ce modèle n'a pas encore pu être étudiée.

3. Modèle d'allogreffe

Le modèle que nous venons de voir, ainsi que ses différentes applications, consiste à injecter des cellules humaines dans des souris immunodéficientes, c'est donc un modèle de xénogreffe. Or, pour se rapprocher au mieux de la clinique et de la greffe rénale, il faudrait mettre en place un modèle d'allogreffe, consistant, en plus d'injecter les PBMC humains dans la rate des souris NSG, à réaliser une réponse allogénique humaine.

Cette réponse allogénique peut être générée par une greffe de peau humaine directement sur la souris (consistant à générer une réponse allogénique avec les PBMC injectés), c'est ce qui est réalisé dans un article publié par Issa F. et al., dans lequel il montrait que lorsqu'on injectait des lymphocytes Treg cultivés *in vitro*, ils étaient capables de conserver leurs fonctions suppressives autologues (vis-à-vis des PBMC injectés) *in vivo*, ce qui permettait de contrôler la réaction d'allogreffe de peau (Issa et al., 2010).

D'autres méthodes mimant une réaction allogénique peuvent être envisagées, comme l'utilisation de souris NSG HLA-A2 (humain). Le modèle consisterait à injecter des PBMC d'un donneur présentant un polymorphisme différent au niveau de la molécule HLA-A (classe 1) à la surface de ces cellules, ce qui entrainerait une réaction allogène vis-à-vis de cet antigène spécifiquement. L'injection de PBMC d'un autre donneur, à un temps différent, pourrait être également envisagé afin de réaliser cette stimulation allogénique.

Conclusion

En transplantation, l'ABMR, médié par la présence de DSA est l'une des principales causes de perte de greffon. De nombreuses molécules sont utilisées en clinique afin de contrôler cette réponse humorale. Le belatacept, utilisé comme agent IS bloquant le second signal dit de co-stimulation des LT a également montré une capacité à limiter la sécrétion de DSA par les LB par l'inhibition de la coopération LB et Tfh au niveau des CG, siège de la différenciation lymphocytaire B.

Afin de mieux définir les mécanismes d'action de cette molécule sur les réponses humorales, nous avons mis au point un modèle expérimental innovant permettant d'étudier son impact sur la formation des centres germinatifs fonctionnels humains dans un modèle de souris immunodéficientes.

Nos résultats objectivent sur des cellules les mécanismes par lesquels sont inhibés ces réponses humorales conduisant à une diminution de la fréquence en LB et plus particulièrement en cellules sécrétrices d'Ac.

Ce modèle permet de bien illustrer l'effet du belatacept au sein des OL II^{aires} sur la modulation de l'ontogénie B dans un contexte de greffe. Il ouvre la voie à d'autres études et notamment celles permettant d'étudier d'autres molécules immunosuppressives.

Bibliographie

- Abbas, Lichtman, and Pillai. Cellular and Molecular Immunology, 7th edition
- Akdis, C.A., and Akdis, M. (2014). Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs. *J. Clin. Invest.* 124, 4678–4680.
- Akiyama, Y., Shirasugi, N., Uchida, N., Matsumoto, K., Kitajima, M., Bashuda, H., Yagita, H., Okumura, K., Aramaki, O., and Niimi, M. (2002). B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation* 74, 732–738.
- 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., Tang, H.L., and Cyster, J.G. (2007). Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315, 528–531.
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 167, 6834–6840.
- Anderson, S.M., Tomayko, M.M., Ahuja, A., Haberman, A.M., and Shlomchik, M.J. (2007). New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 204, 2103–2114.
- André, P., Prasad, K.S.S., Denis, C.V., He, M., Papalia, J.M., Hynes, R.O., Phillips, D.R., and Wagner, D.D. (2002). CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat. Med.* 8, 247–252.
- Aoyagi, T., Yamashita, K., Suzuki, T., Uno, M., Goto, R., Taniguchi, M., Shimamura, T., Takahashi, N., Miura, T., Okimura, K., et al. (2009). A human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys: induction and maintenance therapy. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9, 1732–1741.
- Appelgren, D., Eriksson, P., Ernerudh, J., and Segelmark, M. (2018). Marginal-Zone B-Cells Are Main Producers of IgM in Humans, and Are Reduced in Patients With Autoimmune Vasculitis. *Front. Immunol.* 9, 2242.
- Aramaki, O., Shirasugi, N., Takayama, T., Shimazu, M., Kitajima, M., Ikeda, Y., Azuma, M., Okumura, K., Yagita, H., and Niimi, M. (2004). Programmed death-1-programmed death-L1 interaction is essential for induction of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigen. *Transplantation* 77, 6–12.
- Asano, Y., Nagai, T., Miyata, T., Yazaki, T., Ito, S., Yamanishi, K., and Takahashi,

M. (1985). Long-term protective immunity of recipients of the OKA strain of live varicella vaccine. *Pediatrics* 75, 667–671.

- Bajjoka, I., Hsaiky, L., Brown, K., and Abouljoud, M. (2008). Preserving renal function in liver transplant recipients with rabbit anti-thymocyte globulin and delayed initiation of calcineurin inhibitors. *Liver Transpl* 14, 66–72.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Brière, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F., and Saeland, S. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 881–922.
- 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.
- Bekeredjian-Ding, I., Inamura, S., Giese, T., Moll, H., Endres, S., Sing, A., Zähringer, U., and Hartmann, G. (2007). Staphylococcus aureus protein A triggers T cell-independent B cell proliferation by sensitizing B cells for TLR2 ligands. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 2803–2812.
- Bekeredjian-Ding, I.B., Berkeredjian-Ding, I.B., Wagner, M., Hornung, V., Giese, T., Schnurr, M., Endres, S., and Hartmann, G. (2005). Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 4043–4050.
- Benitez, A., Weldon, A.J., Tatosyan, L., Velkuru, V., Lee, S., Milford, T.-A., Francis, O.L., Hsu, S., Nazeri, K., Casiano, C.M., et al. (2014). Differences in mouse and human nonmemory B cell pools. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 4610–4619.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* 298, 2199–2202.
- Boersema, M., van den Born, J.C., van Ark, J., Harms, G., Seelen, M.A., van Dijk, M.C.R.F., van Goor, H., Navis, G.J., Popa, E.R., and Hillebrands, J.L. (2015). CD16⁺ monocytes with smooth muscle cell characteristics are reduced in human renal chronic transplant dysfunction. *Immunobiology* 220, 673–683.
- Bolduc, A., Long, E., Stapler, D., Cascalho, M., Tsubata, T., Koni, P.A., and Shimoda, M. (2010). Constitutive CD40L expression on B cells prematurely terminates germinal center response and leads to augmented plasma cell production in T cell areas. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 220–230.
- Bossen, C., Tardivel, A., Willen, L., Fletcher, C.A., Perroud, M., Beermann, F., Rolink, A.G., Scott, M.L., Mackay, F., and Schneider, P. (2011). Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses. *Eur. J. Immunol.* 41, 787–797.
- Bouaziz, J.-D., Yanaba, K., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells as inhibitors

of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224, 201–214.

- Bouaziz, J.-D., de Masson, A., Le Buanec, H., Bagot, M., and Bensussan, A. (2014). [Update on regulatory B cells]. *Med. Sci. MS* 30, 721–724.
- Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., and Haraldsen, G. (1999). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 20, 267–277.
- 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.
- Bruhns, P., and Jönsson, F. (2015). Mouse and human FcR effector functions. *Immunol Rev* 268, 25–51.
- Burton, A.R., Pallett, L.J., McCoy, L.E., Suveizdyte, K., Amin, O.E., Swadling, L., Alberts, E., Davidson, B.R., Kennedy, P.T., Gill, U.S., et al. (2018). Circulating and intrahepatic antiviral B cells are defective in hepatitis B. *J Clin Invest* 128, 4588–4603.
- Busconi, L., Bauer, J.W., Tumang, J.R., Laws, A., Perkins-Mesires, K., Tabor, A.S., Lau, C., Corley, R.B., Rothstein, T.L., Lund, F.E., et al. (2007). Functional outcome of B cell activation by chromatin immune complex engagement of the B cell receptor and TLR9. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 7397–7405.
- Cariappa, A., Boboila, C., Moran, S.T., Liu, H., Shi, H.N., and Pillai, S. (2007). The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2270–2281.
- Carsetti, R., Rosado, M.M., and Wardmann, H. (2004). Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol. Rev.* 197, 179–191.
- Chaturvedi, A., Dorward, D., and Pierce, S.K. (2008). The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* 28, 799–809.
- Chen, X., and Jensen, P.E. (2004). The expression of HLA-DO (H2-O) in B lymphocytes. *Immunol. Res.* 29, 19–28.
- Chen, X., and Jensen, P.E. (2008). The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 56, 77–83.
- 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-4lg. *Am J Transplant* 13, 2280–2292.

- Chong, A.S., and Sciammas, R. (2011). Matchmaking the B-cell signature of tolerance to regulatory B cells. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* *11*, 2555–2560.
- Chopek, M.W., Simmons, R.L., and Platt, J.L. (1987). ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation. *Transplant. Proc.* *19*, 4553–4557.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 343–349.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat. Immunol.* *9*, 54–62.
- Cole, D.S., and Morgan, B.P. (2003). Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin. Sci. Lond. Engl.* *1979* *104*, 455–466.
- Cosio, F.G., Amer, H., Grande, J.P., Larson, T.S., Stegall, M.D., and Griffin, M.D. (2007). Comparison of low versus high tacrolimus levels in kidney transplantation: assessment of efficacy by protocol biopsies. *Transplantation* *83*, 411–416.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 621–663.
- Dambuzza, I.M., He, C., Choi, J.K., Yu, C.-R., Wang, R., Mattapallil, M.J., Wingfield, P.T., Caspi, R.R., and Egwuagu, C.E. (2017). IL-12p35 induces expansion of IL-10 and IL-35-expressing regulatory B cells and ameliorates autoimmune disease. *Nat. Commun.* *8*, 719.
- Daniels, G. (2005). The molecular genetics of blood group polymorphism. *Transpl. Immunol.* *14*, 143–153.
- Day, E.S., Cachero, T.G., Qian, F., Sun, Y., Wen, D., Pelletier, M., Hsu, Y.-M., and Whitty, A. (2005). Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* *44*, 1919–1931.
- DiLillo, D.J., Griffiths, R., Seshan, S.V., Magro, C.M., Ruiz, P., Coffman, T.M., and Tedder, T.F. (2011). B lymphocytes differentially influence acute and chronic allograft rejection in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 2643–2654.
- Ding, B.B., Bi, E., Chen, H., Yu, J.J., and Ye, B.H. (2013). IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *190*, 1827–1836.
- Duncan, A.R., and Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature* *332*, 738–740.
- Eisen, H.J., Tuzcu, E.M., Dorent, R., Kobashigawa, J., Mancini, D., Valantine-von

Kaeppler, H.A., Starling, R.C., Sørensen, K., Hummel, M., Lind, J.M., et al. (2003). Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 349, 847–858.

- Espié, P., He, Y., Koo, P., Sickert, D., Dupuy, C., Chokoté, E., Schuler, R., Mergentaler, H., Ristov, J., Milojevic, J., et al. (2020). First-in-human clinical trial to assess pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of iscalimab, an anti-CD40 monoclonal antibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 20, 463–473.
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324–335.
- Ferguson, A.R., Youd, M.E., and Corley, R.B. (2004). Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, 1411–1422.
- Fillatreau, S. (2015). Regulatory plasma cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* 23, 1–5.
- Fischereeder, M., Luckow, B., Hocher, B., Wüthrich, R.P., Rothenpieler, U., Schneeberger, H., Panzer, U., Stahl, R.A., Hauser, I.A., Budde, K., et al. (2001). CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet Lond. Engl.* 357, 1758–1761.
- (Ford, 2016)Ford, M.L. (2016). T Cell Cosignaling Molecules in Transplantation. *Immunity* 44, 1020–1033.
- Furmańczyk-Zawiska, A., Bączkowska, T., Dęborska-Materkowska, D., Nazarewski, S., Kosieradzki, M., and Durlík, M. (2018). Effect of Thrombophilic Factors on Renal Graft Function: A Single-Center Experience. *Transplant. Proc.* 50, 1715–1719.
- Gao, W., Demirci, G., Strom, T.B., and Li, X.C. (2003). Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation* 76, 994–999.
- Gavin, A.L., Hoebe, K., Duong, B., Ota, T., Martin, C., Beutler, B., and Nemazee, D. (2006). Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science* 314, 1936–1938.
- Giesecke, C., Frölich, D., Reiter, K., Mei, H.E., Wirries, I., Kuhly, R., Killig, M., Glatzer, T., Stölzel, K., Perka, C., et al. (2014). Tissue distribution and dependence of responsiveness of human antigen-specific memory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 3091–3100.
- Gilliland, L.K., Norris, N.A., Grosmaire, L.S., Ferrone, S., Gladstone, P., and Ledbetter, J.A. (1989). Signal transduction in lymphocyte activation through crosslinking of HLA class I molecules. *Hum Immunol* 25, 269–289.

- 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.
- Goldsby, Richard A., Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, and Serge Weinman.; Murphy, Kenneth, Casey T. Weaver, Charles A. Janeway, and Pierre L. Masson. I)
- Granata, S., Benedetti, C., Gambaro, G., and Zaza, G. (2020). Kidney allograft fibrosis: what we learned from latest translational research studies. *J. Nephrol.*
- Gray, D., Kumararatne, D.S., Lortan, J., Khan, M., and MacLennan, I.C. (1984). Relation of intra-splenic migration of marginal zone B cells to antigen localization on follicular dendritic cells. *Immunology* *52*, 659–669.
- Guillonneau, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *117*, 1096–1106.
- Haanstra, K.G., Ringers, J., Sick, E.A., Ramdien-Murli, S., Kuhn, E.-M., Boon, L., and Jonker, M. (2003). Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation* *75*, 637–643.
- Haanstra, K.G., Sick, E.A., Ringers, J., Wubben, J.A.M., Kuhn, E.-M., Boon, L., and Jonker, M. (2005). Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts. *Transplantation* *79*, 1623–1626.
- Hahne, M., Kataoka, T., Schröter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., et al. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J. Exp. Med.* *188*, 1185–1190
- Halloran, P.F., Venner, J.M., Madill-Thomsen, K.S., Einecke, G., Parkes, M.D., Hidalgo, L.G., and Famulski, K.S. (2018). Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *Am J Transplant* *18*, 785–795..
- Hampe, C.S. (2012). B Cells in Autoimmune Diseases. *Scientifica (Cairo)* 2012.
- Halloran, P.F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* *351*, 2715–2729.
- Hancock, W.W., Sayegh, M.H., Zheng, X.G., Peach, R., Linsley, P.S., and Turka, L.A. (1996). Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13967–13972.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of

polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* *1*, 475–482.

- Harris, D.P., Goodrich, S., Gerth, A.J., Peng, S.L., and Lund, F.E. (2005a). Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6781–6790.
- Harris, D.P., Goodrich, S., Mohrs, K., Mohrs, M., and Lund, F.E. (2005b). Cutting edge: the development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 7103–7107.
- 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. Baltim. Md 1950* *179*, 5099–5108.
- He, B., Santamaria, R., Xu, W., Cols, M., Chen, K., Puga, I., Shan, M., Xiong, H., Bussel, J.B., Chiu, A., et al. (2010). The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* *11*, 836–845.
- Hendriks, R.W., and Middendorp, S. (2004). The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol.* *25*, 249–256.
- Hillion, S., Arleevskaya, M.I., Blanco, P., Bordron, A., Brooks, W.H., Cesbron, J.Y., Kaveri, S., Vivier, E., and Renaudineau, Y. (2019). The Innate Part of the Adaptive Immune System. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*
- 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.
- Hobeika, E., Levit-Zerdoun, E., Anastasopoulou, V., Pohlmeier, R., Altmeier, S., Alsadeq, A., Dobenecker, M.-W., Pelanda, R., and Reth, M. (2015). CD19 and BAFF-R can signal to promote B-cell survival in the absence of Syk. *EMBO J.* *34*, 925–939.
- Hoffmann, F.S., Kuhn, P.-H., Laurent, S.A., Hauck, S.M., Berer, K., Wendlinger, S.A., Krumbholz, M., Khademi, M., Olsson, T., Dreyling, M., et al. (2015). The immunoregulator soluble TACI is released by ADAM10 and reflects B cell activation in autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *194*, 542–552.
- Hosoi, E. (2008). Biological and clinical aspects of ABO blood group system. *J Med Invest* *55*, 174–182.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczek, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* *397*, 263–266.
- Imai, A., Suzuki, T., Sugitani, A., Itoh, T., Ueki, S., Aoyagi, T., Yamashita, K.,

- Taniguchi, M., Takahashi, N., Miura, T., et al. (2007). A novel fully human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 84, 1020–1028.
- Inamine, A., Takahashi, Y., Baba, N., Miyake, K., Tokuhisa, T., Takemori, T., and Abe, R. (2005). Two waves of memory B-cell generation in the primary immune response. *Int. Immunol.* 17, 581–589.
 - Ishikawa, Y., Usui, T., Shiomi, A., Shimizu, M., Murakami, K., and Mimori, T. (2014). Functional engraftment of human peripheral T and B cells and sustained production of autoantibodies in NOD/LtSzscid/IL-2R γ (-/-) mice. *Eur. J. Immunol.* 44, 3453–3463.
 - Issa, F., Hester, J., Goto, R., Nadig, S.N., Goodacre, T.E., and Wood, K. (2010). Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation* 90, 1321–1327.
 - 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.
 - Jackson, A.M., Kuperman, M.B., and Montgomery, R.A. (2012). Multiple hyperacute rejections in the absence of detectable complement activation in a patient with endothelial cell reactive antibody. *Am J Transplant* 12, 1643–1649.
 - Jamal, M.S., Ravichandran, S., Jaikhan, N., Chatterjee, S., Dua, R., and Rao, K.V.S. (2010). Defining the antigen receptor-dependent regulatory network that induces arrest of cycling immature B-lymphocytes. *BMC Syst. Biol.* 4, 169.
 - 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.
 - Kaku, H., Cheng, K.F., Al-Abed, Y., and Rothstein, T.L. (2014). A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 5904–5913.
 - Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., and Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* 37, 803–811.
 - Kezić, A., Stajic, N., and Thaiss, F. (2017). Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *J Immunol Res* 2017, 6305439.
 - Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., et al. (1999). Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat. Med.* 5, 686–693.

- Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H., and Knechtle, S.J. (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8789–8794.
- 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., Rajewsky, K., and Küppers, R. (1998). 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.* 188, 1679–1689.
- Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.-O., Ager, R.R., Reis, E.S., and Köhl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.* 46, 2753–2766.
- Kohli, R.M., Abrams, S.R., Gajula, K.S., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Stivers, J.T. (2009). A portable hot spot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J. Biol. Chem.* 284, 22898–22904.
- Kubagawa, H., Kubagawa, Y., Jones, D., Nasti, T.H., Walter, M.R., and Honjo, K. (2014). The old but new IgM Fc receptor (FcμR). *Curr Top Microbiol Immunol* 382, 3–28.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159.
- Kwun, J., Matignon, M., Manook, M., Guendouz, S., Audard, V., Kheav, D., Poullot, E., Gautreau, C., Ezekian, B., Bodez, D., et al. (2019). Daratumumab in Sensitized Kidney Transplantation: Potentials and Limitations of Experimental and Clinical Use. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 30, 1206–1219.
- Kobozev, I., Jones-Hall, Y., Valentine, J.F., Webb, C.R., Furr, K.L., and Grisham, M.B. (2015). Use of Humanized Mice to Study the Pathogenesis of Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 21, 1652–1673.
- Lambrecht, B.N., Kool, M., Willart, M.A.M., and Hammad, H. (2009). Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 23–29.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314, 537–539.
- Larsen, C.P., Elwood, E.T., Alexander, D.Z., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Tucker-Burden, C., Cho, H.R., Aruffo, A., Hollenbaugh, D., Linsley, P.S., et al. (1996). Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28

pathways. *Nature* 381, 434–438.

- Larsen, C.P., Pearson, T.C., Adams, A.B., Tso, P., Shirasugi, N., Strobert, E., Anderson, D., Cowan, S., Price, K., Naemura, J., et al. (2005). Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 443–453.
- Le 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. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 429–438.
- 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.
- 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. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 1173–1182.
- Leibler, C., Thiolat, A., Hénique, C., Samson, C., Pilon, C., Tamagne, M., Pirenne, F., Vingert, B., Cohen, J.L., and Grimbert, P. (2018). Control of Humoral Response in Renal Transplantation by Belatacept Depends on a Direct Effect on B Cells and Impaired T Follicular Helper-B Cell Crosstalk. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 29, 1049–1062.
- Leibler, C., Thiolat, A., Elsner, R.A., El Karoui, K., Samson, C., and Grimbert, P. (2019a). Costimulatory blockade molecules and B-cell-mediated immune response: current knowledge and perspectives. *Kidney Int.* 95, 774–786.
- Leibler, C., Matignon, M., Moktefi, A., Samson, C., Zarour, A., Malard, S., Boutin, E., Pilon, C., Salomon, L., Natella, P.-A., et al. (2019b). Belatacept in renal transplant recipient with mild immunologic risk factor: A pilot prospective study (BELACOR). *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 19, 894–906.
- de Leur, K., Luk, F., van den Bosch, T.P.P., Dieterich, M., van der Laan, L.J.W., Hendriks, R.W., Clahsen-van Groningen, M.C., Issa, F., Baan, C.C., and Hoogduijn, M.J. (2019). The Effects of an IL-21 Receptor Antagonist on the Alloimmune Response in a Humanized Mouse Skin Transplant Model. *Transplantation* 103, 2065–2074.
- Levit-Zerdoun, E., Becker, M., Pohlmeier, R., Wilhelm, I., Maity, P.C., Rajewsky, K., Reth, M., and Hobeika, E. (2016). Survival of Ig α -Deficient Mature B Cells Requires BAFF-R Function. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 196, 2348–2360.

- Lindhout, E., Koopman, G., Pals, S.T., and de Groot, C. (1997). Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol. Today* 18, 573–577.
- Liu, D., Xu, H., Shih, C., Wan, Z., Ma, X., Ma, W., Luo, D., and Qi, H. (2015). T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature* 517, 214–218.
- Lo, D.J., Anderson, D.J., Song, M., Leopardi, F., Farris, A.B., Strobert, E., Chapin, S., Devens, B., Karrer, E., and Kirk, A.D. (2015). A pilot trial targeting the ICOS-ICOS-L pathway in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant* 15, 984–992.
- Lokhorst, H.M., Plesner, T., Laubach, J.P., Nahi, H., Gimsing, P., Hansson, M., Minnema, M.C., Lassen, U., Krejcik, J., Palumbo, A., et al. (2015). Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 373, 1207–1219.
- Lonial, S., Weiss, B.M., Usmani, S.Z., Singhal, S., Chari, A., Bahlis, N.J., Belch, A., Krishnan, A., Vescio, R.A., Mateos, M.V., et al. (2016). Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 387, 1551–1560.
- Lopez, M., Clarkson, M.R., Albin, M., Sayegh, M.H., and Najafian, N. (2006). A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 17, 2844–2853.
- López-Fraga, M., Fernández, R., Albar, J.P., and Hahne, M. (2001). Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep.* 2, 945–951.
- Loupy, A., Suberbielle-Boissel, C., Zuber, J., Anglicheau, D., Timsit, M.-O., Martinez, F., Thervet, E., Bruneval, P., Charron, D., Hill, G.S., et al. (2010). Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD 20/plasmapheresis in kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: a pilot study. *Transplantation* 89, 1403–1410.
- 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.
- MacLennan, I.C. (1994). Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Curr. Biol. CB* 4, 70–72.
- Madsen, L., Labrecque, N., Engberg, J., Dierich, A., Svejgaard, A., Benoist, C., Mathis, D., and Fugger, L. (1999). Mice lacking all conventional MHC class II genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10338–10343.
- Maia, S., Pelletier, M., Ding, J., Hsu, Y.-M., Sallan, S.E., Rao, S.P., Nadler, L.M., and Cardoso, A.A. (2011). Aberrant expression of functional BAFF-system

receptors by malignant B-cell precursors impacts leukemia cell survival. *PLoS One* 6, e20787.

- Mamani-Matsuda, M., Cosma, A., Weller, S., Faili, A., Staib, C., Garçon, L., Hermine, O., Beyne-Rauzy, O., Fieschi, C., Pers, J.-O., et al. (2008). The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood* 111, 4653–4659.
- Manser, T. (2004). Textbook germinal centers? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 3369–3375.
- Mantchev, G.T., Cortesão, C.S., Rebrovich, M., Cascalho, M., and Bram, R.J. (2007). TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2282–2288.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335.
- Masson, E. *Néphrologie et thérapeutiques* (vol 15 N°5) p396-397, septembre 2019
Stratégie d'induction en transplantation rénale chez les patients hyperimmunisés I.
Mohamadou, M.B. Matignon. Malard, D. Buob, P. Grimbert, A. Moktefi, N. Ouali, E. Rondeau, Y. Luque.
- Matsumoto, M., Baba, A., Yokota, T., Nishikawa, H., Ohkawa, Y., Kayama, H., Kallies, A., Nutt, S.L., Sakaguchi, S., Takeda, K., et al. (2014). Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity* 41, 1040–1051.
- Matsushita, T., Horikawa, M., Iwata, Y., and Tedder, T.F. (2010). Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 2240–2252.
- Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 221–241.
- McHeyzer-Williams, L.J., Driver, D.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2001). Germinal center reaction. *Curr. Opin. Hematol.* 8, 52–59.
- McHeyzer-Williams, M., Okitsu, S., Wang, N., and McHeyzer-Williams, L. (2011). Molecular programming of B cell memory. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 24–34.
- Meng, L., Wu, Z., Wang, Y., Lassman, C., Busuttill, R.W., Zhai, Y., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2008). Differential impact of CD154 costimulation blockade on alloreactive effector and regulatory T cells in murine renal transplant recipients. *Transplantation* 85, 1332–1338.
- Mihalcik, S.A., Huddleston, P.M., Wu, X., and Jelinek, D.F. (2010). The structure of the TNFRSF13C promoter enables differential expression of BAFF-R during B cell

ontogeny and terminal differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 1045–1054.

- Møller, C.H., Gustafsson, F., Gluud, C., and Steinbrüchel, D.A. (2008). Interleukin-2 receptor antagonists as induction therapy after heart transplantation: systematic review with meta-analysis of randomized trials. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 27, 835–842.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
- Montgomery, R.A., Tatapudi, V.S., Leffell, M.S., and Zachary, A.A. (2018). HLA in transplantation. *Nat Rev Nephrol* 14, 558–570.
- Monroe, J.G., Bannish, G., Fuentes-Panana, E.M., King, L.B., Sandel, P.C., Chung, J., and Sater, R. (2003). Positive and negative selection during B lymphocyte development. *Immunol. Res.* 27, 427–442.
- Moreau, A., Blair, P.A., Chai, J.-G., Ratnasothy, K., Stolarczyk, E., Alhabbab, R., Rackham, C.L., Jones, P.M., Smyth, L., Elgueta, R., et al. (2015). Transitional-2 B cells acquire regulatory function during tolerance induction and contribute to allograft survival. *Eur. J. Immunol.* 45, 843–853.
- Mulay, A.V., Cockfield, S., Stryker, R., Fergusson, D., and Knoll, G.A. (2006). Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus for chronic renal allograft dysfunction: a systematic review of the evidence. *Transplantation* 82, 1153–1162.
- Naismith, J.H., and Sprang, S.R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem. Sci.* 23, 74–79.
- Najafian, N., Salama, A.D., Fedoseyeva, E.V., Benichou, G., and Sayegh, M.H. (2002). Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 13, 252–259.
- Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L.S., O’Connell, P.J., Chapman, J.R., and Allen, R.D.M. (2004a). Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 78, 557–565.
- Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L.-S., O’Connell, P.J., Allen, R.D.M., and Chapman, J.R. (2004b). Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 78, 242–249.
- Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P.A., Olsen, H.S., Migone, T.S., Sosnovtseva, S., Carrell, J.A., Feng, P., Giri, J.G., et al. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood* 97, 198–204.
- Neves, P., Lampropoulou, V., Calderon-Gomez, E., Roch, T., Stervbo, U., Shen,

- P., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Haury, M., Nedospasov, S.A., et al. (2010). Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33, 777–790.
- 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.
 - Ng, L.G., Sutherland, A.P.R., Newton, R., Qian, F., Cachero, T.G., Scott, M.L., Thompson, J.S., Wheway, J., Chtanova, T., Groom, J., et al. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 807–817.
 - 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.
 - Oberbarnscheidt, M.H., and Lakkis, F.G. (2014). Innate allorecognition. *Immunol Rev* 258, 145–149.
 - O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.-L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J. Exp. Med.* 199, 91–98.
 - Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517–1523.
 - O'Neill, S.K., Veselits, M.L., Zhang, M., Labno, C., Cao, Y., Finnegan, A., Uccellini, M., Alegre, M.-L., Cambier, J.C., and Clark, M.R. (2009). Endocytic sequestration of the B cell antigen receptor and toll-like receptor 9 in anergic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6262–6267.
 - Opelz, G. and Collaborative Transplant Study (2005). Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365, 1570–1576.
 - Ostör, A.J.K. (2008). Abatacept: a T-cell co-stimulation modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 27, 1343–1353.
 - Ou, X., Xu, S., and Lam, K.-P. (2012). Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 15401–15406.
 - Ozcan, E., Garibyan, L., Lee, J.J.-Y., Bram, R.J., Lam, K.-P., and Geha, R.S. (2009). Transmembrane activator, calcium modulator, and cyclophilin ligand

interactor drives plasma cell differentiation in LPS-activated B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123, 1277-1286.e5.

- Ozkaynak, E., Wang, L., Goodearl, A., McDonald, K., Qin, S., O'Keefe, T., Duong, T., Smith, T., Gutierrez-Ramos, J.-C., Rottman, J.B., et al. (2002). Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 6546–6553.
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Wei, C., Looney, R.J., Sanz, I., and Anolik, J.H. (2009). Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5982–5993.
- 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.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12, 252–264.
- Pasare, C., and Medzhitov, R. (2005). Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438, 364–368.
- Pieper, K., Rizzi, M., Speletas, M., Smulski, C.R., Sic, H., Kraus, H., Salzer, U., Fiala, G.J., Schamel, W.W., Lougaris, V., et al. (2014). A common single nucleotide polymorphism impairs B-cell activating factor receptor's multimerization, contributing to common variable immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1222–1225.
- Picarda, E., Bézie, S., Boucault, L., Autrusseau, E., Kilens, S., Meistermann, D., Martinet, B., Daguin, V., Donnart, A., Charpentier, E., et al. (2017). Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight* 2, e90088.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.
- Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D.J., Maamary, J., Wang, T.T., Dahan, R., Fiebiger, B.-M., and Ravetch, J.V. (2014). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 15, 707–716.
- Plonquet, A. (2013). Différenciation lymphocytaire B normale. </data/revues/1773035X/00430452/27/>.
- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2011). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat. Immunol.* 13, 170–180.
- Rafael-Valdivia, L., Mendoza, M.A., Martinez-Saldivar, B., Sanchez-Fueyo, A., Brunet, M., Garcia-Valdecasas, J.C., and Rimola, A. (2011). How long should

initiation of calcineurin inhibitors be delayed to protect renal function in liver transplantation? *Transplant Proc* 43, 697–698.

- Redfield, R.R., Rodriguez, E., Parsons, R., Vivek, K., Mustafa, M.M., Noorchashm, H., and Najj, A. (2011). Essential role for B cells in transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 685–691.
- Reinhardt, R.L., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2009). Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* 10, 385–393.
- Reith, W., and Mach, B. (2001). The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 331–373.
- Rincón-Arévalo, H., Sanchez-Parra, C.C., Castaño, D., Yassin, L., and Vásquez, G. (2016). Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int. Rev. Immunol.* 35, 156–176.
- Rock, K.L., Yeh, E.T., and Benacerraf, B. (1984). Selection of thymocyte MHC restriction specificity in vitro. *J. Mol. Cell. Immunol. JMCI* 1, 311–320.
- Rostaing, L., Vincenti, F., Grinyó, J., Rice, K.M., Bresnahan, B., Steinberg, S., Gang, S., Gaité, 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. *Am J Transplant* 13, 2875–2883.
- Rowland, S.L., Leahy, K.F., Halverson, R., Torres, R.M., and Pelandra, R. (2010). BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 4570–4581.
- Sagoo, P., Perucha, E., Sawitzki, B., Tomiuk, S., Stephens, D.A., Miqueu, P., Chapman, S., Craciun, L., Sergeant, R., Brouard, S., et al. (2010). Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120, 1848–1861.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K., et al. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18, 675–685.
- Salimzadeh, L., Le Bert, N., Dutertre, C.-A., Gill, U.S., Newell, E.W., Frey, C., Hung, M., Novikov, N., Fletcher, S., Kennedy, P.T., et al. (2018). PD-1 blockade partially recovers dysfunctional virus-specific B cells in chronic hepatitis B infection. *J Clin Invest* 128, 4573–4587.
- Sartelet, H., Toupance, O., Lorenzato, M., Fadel, F., Noel, L.H., Lagonotte, E., Birembaut, P., Chanard, J., and Rieu, P. (2005). Sirolimus-induced thrombotic microangiopathy is associated with decreased expression of vascular endothelial growth factor in kidneys. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 2441–2447.

- Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today* 13, 136–142.
- Schmidt, M.R., Appel, M.C., Giassi, L.J., Greiner, D.L., Shultz, L.D., and Woodland, R.T. (2008). Human BLyS facilitates engraftment of human PBL derived B cells in immunodeficient mice. *PLoS ONE* 3, e3192.
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., et al. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J. Exp. Med.* 189, 1747–1756.
- Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D., and Grewal, I.S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLyS receptor. *Immunity* 18, 279–288.
- Sheldon, S., and Poulton, K. (2006). HLA typing and its influence on organ transplantation. *Methods Mol Biol* 333, 157–174.
- Shen, P., Roch, T., Lampropoulou, V., O'Connor, R.A., Stervbo, U., Hilgenberg, E., Ries, S., Dang, V.D., Jaimes, Y., Daridon, C., et al. (2014). IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* 507, 366–370.
- Shih, T.-A.Y., Roederer, M., and Nussenzweig, M.C. (2002). Role of antigen receptor affinity in T cell-independent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* 3, 399–406.
- 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* 26, 457–467.
- Silva, H.M., Takenaka, M.C.S., Moraes-Vieira, P.M.M., Monteiro, S.M., Hernandez, M.O., Chaara, W., Six, A., Agena, F., Sesterheim, P., Barbé-Tuana, F.M., et al. (2012). Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med. Camb. Mass* 18, 733–743.
- Simpson, E. (1998). Minor transplantation antigens: animal models for human host-versus-graft, graft-versus-host, and graft-versus-leukemia reactions. *Transplantation* 65, 611–616.
- Simpson, E., Scott, D., and Chandler, P. (1997). The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 39–61.
- Sims, G.P., Ettinger, R., Shirota, Y., Yarboro, C.H., Illei, G.G., and Lipsky, P.E. (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105, 4390–4398.

- Smith, R.N., and Colvin, R.B. (2012). Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin. Immunol.* 24, 115–121.
- Smulski, C.R., and Eibel, H. (2018). BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Front. Immunol.* 9, 2285.
- Spierings, E., and Fleischhauer, K. (2019). Histocompatibility. In *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*, E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, and N. Kröger, eds. (Cham (CH): Springer), p.
- Stein, M., Dütting, S., Mougiakakos, D., Bösl, M., Fritsch, K., Reimer, D., Urbanczyk, S., Steinmetz, T., Schuh, W., Bozec, A., et al. (2017). A defined metabolic state in pre B cells governs B-cell development and is counterbalanced by Swiprosin-2/EFhd1. *Cell Death Differ.* 24, 1239–1252.
- Strutz, F. (2009). Pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in chronic allograft dysfunction. *Clin Transplant* 23 Suppl 21, 26–32.
- Suan, D., Sundling, C., and Brink, R. (2017). Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. *Curr. Opin. Immunol.* 45, 97–102.
- Takahashi, K., Saito, K., Takahara, S., Okuyama, A., Tanabe, K., Toma, H., Uchida, K., Hasegawa, A., Yoshimura, N., Kamiryo, Y., et al. (2004). Excellent long-term outcome of ABO-incompatible living donor kidney transplantation in Japan. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4, 1089–1096.
- Tange, S.G., and Good, K.L. (2007). Human IgM+CD27+ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 13–19.
- 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.
- Thorsby, E., Berle, E., Scott, H., and Braathen, L.R. (1983). Involvement of class II HLA molecules in T cell activation by antigen. Implications for the autologous mixed lymphocyte reaction. *Behring Inst Mitt* 129–134.
- Ticha, O., Moos, L., Wajant, H., and Bekeredjian-Ding, I. (2017). Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Characterizes TLR9-Driven Formation of Interleukin-10-Producing B Cells. *Front Immunol* 8, 1951.
- Tomayko, M.M., Steinel, N.C., Anderson, S.M., and Shlomchik, M.J. (2010). Cutting edge: Hierarchy of maturity of murine memory B cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 7146–7150.
- Tsuji, S., Cortesão, C., Bram, R.J., Platt, J.L., and Cascalho, M. (2011). TACI

deficiency impairs sustained Blimp-1 expression in B cells decreasing long-lived plasma cells in the bone marrow. *Blood* 118, 5832–5839.

- Tydén, G., Kumlien, G., Genberg, H., Sandberg, J., Lundgren, T., and Fehrman, I. (2005). ABO-incompatible kidney transplantation and rituximab. *Transplant. Proc.* 37, 3286–3287.
- Ventura-Aguiar, P., Campistol, J.M., and Diekmann, F. (2016). Safety of mTOR inhibitors in adult solid organ transplantation. *Expert Opin. Drug Saf.* 15, 303–319.
- Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* 237, 22–42.
- 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.
- Vidal : le dictionnaire. 77e éd. Paris, édition en ligne.
- Vignali, D.A.A., and Kuchroo, V.K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat. Immunol.* 13, 722–728.
- Vincenti, F. (2008). Costimulation blockade in autoimmunity and transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 299–306; quiz 307–308.
- Vincenti, F. (2016). Belatacept and Long-Term Outcomes in Kidney Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 374, 2600–2601.
- Vincenti, F., Rostaing, L., Grinyo, J., Rice, K., Steinberg, S., Gaitte, 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.
- Vincenti, F., Tedesco Silva, H., Busque, S., O’Connell, P., Friedewald, J., Cibrik, D., Budde, K., Yoshida, A., Cohny, S., Weimar, W., et al. (2012). 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.
- von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R., Xiao, H., Ku, C.-L., Chrabieh, M., Mustapha, I.B., Ghandil, P., Camcioglu, Y., et al. (2008). Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science* 321, 691–696.
- Wallny, H.J., and Rammensee, H.G. (1990). Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell-derived peptide. *Nature* 343, 275–278.
- Wang, L., Han, R., and Hancock, W.W. (2007). Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand PD-L1 are required for allograft tolerance. *Eur. J. Immunol.* 37, 2983–2990.

- Wang, X., Mathieu, M., and Brezski, R.J. (2018). IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9, 63–73.
- Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2015). The ups and downs of negative (and positive) selection of B cells. *J. Clin. Invest.* 125, 3748–3750.
- Weller, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2005). Vaccination against encapsulated bacteria in humans: paradoxes. *Trends Immunol.* 26, 85–89.
- 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 Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Protein 4–Immunoglobulin Treatment Reverses Ongoing Alloantibody Responses and Rescues Allografts From Acute Rejection. *American Journal of Transplantation* 16, 2312–2323.
- Zhang, R. (2018). Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 13, 182–192.
- Zotos, D., and Tarlinton, D.M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends Immunol.* 33, 281–288.
- Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 207, 365–378.
- Zouali, M., and Richard, Y. (2011). Marginal Zone B-Cells, a Gatekeeper of Innate Immunity. *Front. Immunol.* 2.(2020). Immunobiologie de Janeway.9782100705436: Immunologie - 7e édition: Le cours de Janis Kuby avec questions de révision - AbeBooks - Owen, Judy; Punt, Jenni; Stranford, Sharon: 2100705431.

Control of Humoral Response in Renal Transplantation by Belatacept Depends on a Direct Effect on B Cells and Impaired T Follicular Helper-B Cell Crosstalk

Claire Leibler,^{1,2,3} Allan Thiolat,^{1,2} Carole Hénique,^{1,2} Chloé Samson,^{1,2} Caroline Pilon,^{1,2} Marie Tamagne,⁴ France Pirenne,⁴ Benoit Vingert,⁴ José L. Cohen,^{1,2,3} and Philippe Grimbert^{1,2,3}

¹Université Paris-Est, Unité Mixte de Recherche 955, Université Paris-Est-Créteil, Creteil, France; ²U955, Team 21, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Creteil, France; ³Hôpital Henri-Mondor-A. Chenevier, CIC-BT-504, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Creteil, France; and ⁴U955, Team 2, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Creteil, France

ABSTRACT

Generation of *de novo* donor-specific antibodies (*dnDSAs*) after renal transplant is recognized as the leading cause of late transplant failure. Hence, the optimal immunosuppressive strategies to limit *dnDSA* development need to be defined. Recent clinical trials using the novel costimulatory blockade agent CTLA4-Ig (Belatacept) have shown that kidney transplant recipients (KTRs) treated with Belatacept have better graft survival and function and a lower proportion of *dnDSAs* than control-treated KTRs. Mechanisms involved in the control of humoral responses by Belatacept remain to be investigated. Here, we analyzed the effect of Belatacept on different steps of the B cell-mediated response in humans. *In vitro*, Belatacept reduced plasmablast differentiation, Ig production, and the expression of the major transcription factor involved in plasma cell function, Blimp-1, in a T cell-independent manner. Moreover, Belatacept induced activation of the STAT3 transcription factor in stimulated B cells and reduced the expression of CD86. Additionally, Belatacept blocked CD28-mediated activation of T follicular helper cells (Tfh) in an autologous Tfh-memory B cells model. We then validated these observations in KTRs treated with Belatacept, who had a reduced proportion of blood effector B cells and activated Tfh (PD1⁺ICOS⁺) compared with control-treated KTRs. Our *in vitro* and *in vivo* results suggest that Belatacept modulates B cell function directly and at the level of B cell-Tfh interaction. These mechanisms likely account for the optimal control of humoral responses observed in KTRs treated with Belatacept.

J Am Soc Nephrol 29: 1049–1062, 2018. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2017060679>

Over the last decade, anti-HLA donor-specific antibodies (DSAs) arising after kidney transplantation, also called *de novo* donor-specific antibodies

Received June 23, 2017. Accepted December 15, 2017.

A.T. and C.H. contributed equally to this work.

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

Correspondence: Prof. Philippe Grimbert, Service de Néphrologie et Transplantation, Pôle Cancérologie-Immunité-Transplantation-Infectiologie et unité Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U955, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor and Université Paris-Est-Créteil, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Creteil, France. Email: philippe.grimbert@aphp.fr

Copyright © 2018 by the American Society of Nephrology

Significance Statement

Control of humoral response in renal transplantation by Belatacept depends on a direct effect on B cells and impaired T follicular helper cell (Tfh)-B cells crosstalk. Generation of *de novo* donor-specific antibodies (*dnDSAs*) is the leading cause of late renal transplant failure. Recent clinical trials using the costimulatory blockade agent CTLA4-Ig (Belatacept) have shown that patients treated with Belatacept exhibit better graft survival and function and lower proportion of *dnDSAs* than recipients treated with calcineurin inhibitors. This study of the mechanisms for control of humoral responses by Belatacept found that it affects B cell function by both modulating antigen-presenting capacities and production of antibodies by effector B cells. The results bring new perspectives to the development of immunosuppressive strategies for transplantation and autoimmune disease.

(*dn*DSAs), have increasingly been recognized as the leading cause of late transplant failure in kidney transplanted recipients (KTRs).^{1,2} Approximately 15%–30% of KTRs develop *dn*DSAs.^{3,4} Despite the numerous treatment strategies directed to boost conventional immunosuppression or suppress B cells activity by targeting plasma cells, antibodies, and/or complement, there has been no satisfactory therapy that reliably reverses the effects of DSAs after they are 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 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 [CTLA4]-Ig; LEA29Y; Bristol Myers Squibb) is a human fusion protein combining the extracellular portion of CTLA4 that has been mutated to confer greater binding avidity to CD80 and CD86 (B7 molecules) and the constant region fragment of human IgG1. CTLA4 binds to surface costimulatory ligands (CD80 and CD86) of antigen-presenting cells (APCs) and thus, prevents their interaction with CD28, thereby blocking T cell activation.⁶ Belatacept was granted approval by the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency in 2011 on the basis of the 3-year data from two phase 3 studies: the Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-Line Immunosuppression Trial (BENEFIT) and the BENEFIT Extended Criteria Donors.^{7,8} In their follow-up analysis of the BENEFIT, Vincenti *et al.*⁹ found that recipient mortality and the graft failure rate at 7 years after transplantation were significantly lower in the group of recipients treated with Belatacept compared with the control recipients treated with calcineurin inhibitors (CNIs). Interestingly, incidence of *dn*DSAs at year 7 was significantly lower in Belatacept-treated patients than in CNI-treated patients.⁹ 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 formation.¹⁰ However, in our cohort of KTRs included in the BENEFIT, we previously showed that the proportion and the 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 Belatacept may have regulatory effect on B cells.¹³

The mechanisms of action of Belatacept begin to be elucidated. In animal models, Belatacept inhibits T-dependent antibody production. Larsen *et al.*¹⁴ showed enhanced inhibition of anti-sheep red blood cell antibodies by Belatacept compared with its parent Abatacept. The combined blockade of both CD28:B7 and CD40:40L pathways suppressed DSAs formation in kidney-transplanted macaques.¹⁵ Moreover, Kim *et al.*¹⁶ showed in a nonhuman primate model that Belatacept or anti-CD40 mAb combined with lymphodepletion suppressed the humoral response, which led 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 T follicular helper cells (T_{fh}).¹⁶ Together, these results led us to consider whether Belatacept in patients with transplants could act (1) directly on Ig production by B cells and/or (2) on their APC property.

The results presented herein show that Belatacept works directly by decreasing the plasmablasts differentiation and IgG secretion. Furthermore, Belatacept induces direct signaling in stimulated B cells that may be triggered by CD86. We also showed using both an *in vitro* model and *in vivo* data collected on KTRs that Belatacept, by modifying the expression of costimulatory molecules on the surface of activated B cells, decreases the proportion and activation status of circulating T_{fh} and impairs T_{fh}/B cells crosstalk.

RESULTS

Belatacept Modulates Plasmablasts Differentiation and Function

Because patients treated with Belatacept show reduced DSAs production, we first assessed whether Belatacept 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 T_{fh} help. After 5 days, such stimulation significantly increased plasmablasts by 29-fold compared with unstimulated B cells (Figure 1B). In the presence of Belatacept, 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 Belatacept (Supplemental Figure 1, A and B). Additionally, the proliferative capacities of plasmablasts (Supplemental Figure 1, C and D) and more generally, B cells (data not shown) were not altered by Belatacept.

Next, we assessed the functionality of activated B cells in terms of IgG and IgM secretions. Given that Belatacept is composed of type 1 human γ -chain, total IgG and IgG1 production could not be quantified. We also observed that Belatacept interfered with IgG3 detection (data not shown). However, the secretions of both IgG2 and IgG4 were significantly decreased in the presence of Belatacept (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 Belatacept-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 Belatacept-stimulated culture compared with control on day 5 (Figure 1, G and H).

We next assessed the cytokine profile of stimulated B cells and plasmablasts cultured with or without Belatacept. Although IL-6, TNF α , IL-21, and IL-10 secretion did not differ between groups (data not shown), we did observe a significant decrease

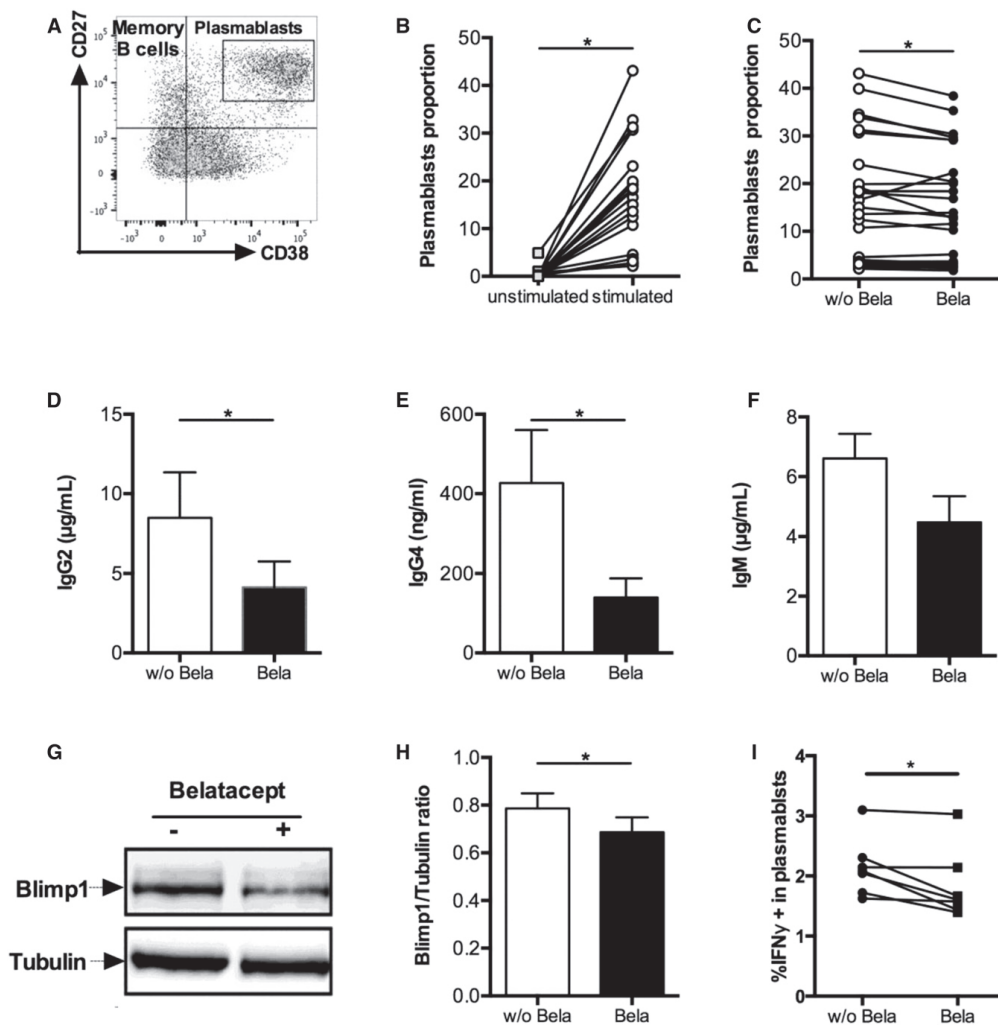


Figure 1. Belatacept alters differentiation of plasmablasts and function of stimulated B cells *in vitro*. B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation for 10 days. (A) Analysis of plasmablast (CD19^{lo}CD27^{hi}CD38^{hi}) differentiation on day 5 using the indicated gating strategy. (B and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

in IFN γ -producing B cells, most notably in the plasmablasts compartment in the presence of Belatacept (Figure 1I).

Thus, our model reveals that the reduced amount of DSAs observed in treated patients could at least in part rely on a direct effect on B cells independent of T cell participation.

Belatacept Induces a Direct Signaling in Stimulated B Cells and Modifies the Expression of Costimulatory Molecules on B Cell Surface

It was previously shown in dendritic cells (DCs) that CTLA4-Ig could induce a reverse signaling through the STAT3 pathway,

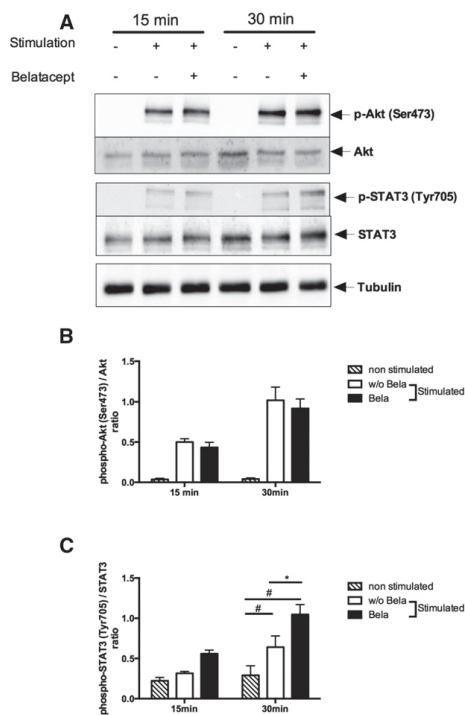


Figure 2. Belatacept induces STAT3 phosphorylation in stimulated B cells. B cells were cultured with or without CD40L and IL-21 stimulation for 15 and 30 minutes in the presence or absence of Belatacept. (A) Expression of phospho-Akt (Ser473), total Akt, phospho-STAT3 (Tyr705), and STAT3. Tubulin was used as a loading control. One representative of five immunoblots is shown. (B) Ratio of p-Akt (Ser473) signal on Akt total signal ($n=5$). (C) Ratio of p-STAT3 (Tyr705) signal on STAT3 total signal ($n=5$). Data are given as mean \pm SEM for each group. * $P<0.05$ without Belatacept (w/o Bela) versus Belatacept (Bela); # $P<0.05$ unstimulated versus stimulated (two-way ANOVA test).

whereas CD28-Ig works through the activation of the Akt/NFkB pathway.^{17,18} Thus, we assessed both STAT3 and Akt/NFkB signaling in stimulated B cells at 15 and 30 minutes in the presence and absence of Belatacept (Figure 2). Although Belatacept did not alter Akt signaling (Figure 2, A and B), there was a significant increase in STAT signaling determined by increased STAT3 phosphorylation in stimulated B cells in the presence of Belatacept (Figure 2, A and C).

We next aimed to determine if this signaling was receptor mediated and more specifically, if Belatacept directly acts on CD80 and/or CD86, both of which are known CTLA4 ligands. *In vitro* stimulation with CD40L and IL-21 induced high expression of CD80 and CD86 on cultured B cells on day 5 (*i.e.*, the proportions of CD80+ and CD86+ B cells increased by

128% and 413%, respectively, after stimulation) (Supplemental Figure 2, A and B). Interestingly, different patterns of CD80 and CD86 expression were observed 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 threefold 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 2, C and D).

Belatacept treatment significantly decreased both the proportion and MFI of CD80 and CD86 in activated B cells (Supplemental Figure 2E), memory B cells, and plasmablasts compared with untreated cultures (Figure 3, A–D). To assess if this decreased expression was related to the ligation of Belatacept on these receptors (hence inducing a steric hindrance and/or competition for the same epitope with flow cytometry antibodies), protein expression of CD80 and CD86 by immunoblot was studied (Figure 3, E–H). Interestingly, CD86 expression was decreased on Belatacept-treated B cells lysates compared with untreated cells (Figure 3, E and F), whereas CD80 was not. This result strongly suggests that Belatacept triggers a direct signal in stimulated B cells *via* CD86. We also observed that about 6% of B cells expressed CD28 and that CD28 was not modulated by Belatacept (Figure 3I). Additionally, inducible T cell costimulator ligand expression was not modified by Belatacept (data not shown). In contrast, programmed cell death ligand 1 (PDL1) expression on total activated B cells and plasmablasts was significantly increased in the presence of Belatacept (Figure 3J).

Belatacept Disrupts Tfh-B Cells Interaction Both *In Vitro* and *In Vivo*

Given that Belatacept directly induced modification of costimulatory molecules expression on B cells, we wondered whether Belatacept could also affect Tfh-B cells crosstalk. As such, the ability of B cells generated with or without Belatacept to stimulate CD4 and Tfh proliferation was evaluated (Figure 4). B cells previously generated in the presence of Belatacept had a reduced capacity to induce T cells proliferation (Figure 4, A and B), Tfh proliferation (Figure 4, C–E) and Tfh activation (proportion of inducible T cell costimulatory-positive [ICOS+] Tfh) (Figure 4F).

To better characterize the specific interaction between Tfh and B cells in the presence of Belatacept, sorted autologous Tfh (CD4+CD45RA–CXCR5+PD1+) and memory B cells (CD19+IgD–CD38^{dim}CD27[±]) from healthy blood donors (HBDs) were cocultured for 5 days with or without Belatacept (Supplemental Figure 3). We did not observe any difference in Tfh proportion and survival in the presence of Belatacept (data not shown). However, the proportion and MFI of activated ICOS+ and programmed cell death-1 (PD1) ICOS+ Tfh were reduced in the presence of Belatacept (Figure 5, A–D). Notably, we observed that plasmablasts proportion was lower in the Belatacept-treated cultures (Figure 5E).

Then, to test the clinical relevance of our data in the peripheral blood of patients with grafts, we analyzed blood sam-

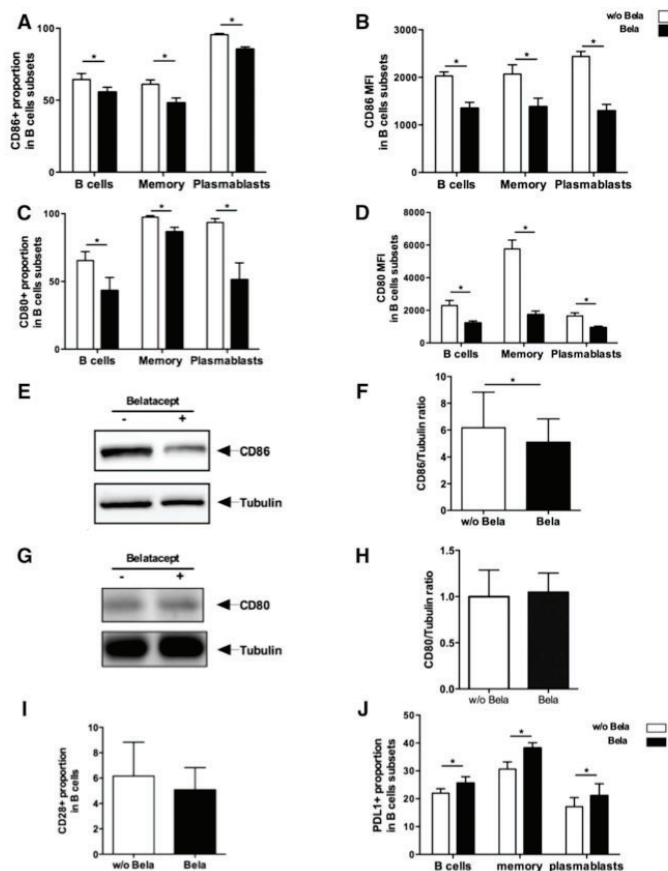


Figure 3. Belatacept modifies the pattern of expression of costimulatory molecules on the surface of B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation in the presence or absence of Belatacept for 5 days ($n=10$). (A) Proportion and (B) MFI of CD86 in total B cells, memory B cells, and plasmablasts. (C) Proportion and (D) MFI of CD80 in B cells subsets described in Figure 1A. (E) Expression of CD86 in B cells lysates on 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) Expression of CD80 in B cells lysates on day 5 by Western blot. Tubulin was used as a loading control. One representative of five immunoblots is displayed. (H) Ratio of CD80 signal on Tubulin signal ($n=8$). (I) Proportion of CD28+ B cells after Belatacept treatment analyzed by flow cytometry ($n=5$). (J) Proportion of PDL1+ B cells after Belatacept treatment analyzed by flow cytometry ($n=7$). Data are given as mean \pm SEM for each group. Bela, Belatacept; w/o Bela, without Belatacept. * $P<0.05$ versus Belatacept (Wilcoxon matched pairs signed rank test).

ples of KTRs who had stable graft functions treated with either Belatacept (Belatacept group; $n=10$) or CNI (CNI group; $n=12$) and an additional cohort of HBDs ($n=12$). Basic clinical characteristics of KTRs treated with Belatacept or CNI are displayed in Table 1.

Although lymphocytes counts and proportion of CD19+ cell did not differ between both groups of KTRs, recipients treated with Belatacept displayed significantly reduced absolute numbers 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 KTRs treated with Belatacept compared with patients treated with CNI (Figure 6, A–G). Finally, the Belatacept group also displayed lower proportions of blood plasmablasts (CD19+CD38^{hi}CD24-) in CD19+ cells compared with the CNI group (Figure 6H), consistent with our *in vitro* cultures (Figure 5E).

To assess B cell capacities to interact with Tfh, patterns of expression of Belatacept ligands (*i.e.*, CD80 and CD86) were analyzed on circulating B cells. CD80 and CD86 were not expressed on the same circulating B cell subpopulations of HBDs, and their expression varied according to the maturation stages of B cells (Figure 7, 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 7, A–C). In KTRs treated with Belatacept, the proportion and MFI of CD80+ B cells were significantly reduced in B cells compared with those in CNI-treated patients (Figure 7, D and E). A similar significant reduction of MFI of CD80+ B cells was observed in memory B cells of the Belatacept group (Figure 7G), whereas the proportion of CD80+ B cells tended to be lower in the Belatacept group ($P=0.07$; $n=6$) (Figure 7F). No difference was detected in the proportion of CD86+ B cells between Belatacept and CNI groups (data not shown). The analysis of CD86 MFI could not be interpreted because of the scarce number of events.

We next aimed to compare the proportion and activation status of circulating Tfh between the three groups of individuals (KTRs, those treated with CNI, and HBDs). The proportions of total CD4+ and memory CD4+CD45RA- were similar in both groups of KTRs (Table 2). However, KTRs treated with Belatacept had lower absolute numbers of memory CD4

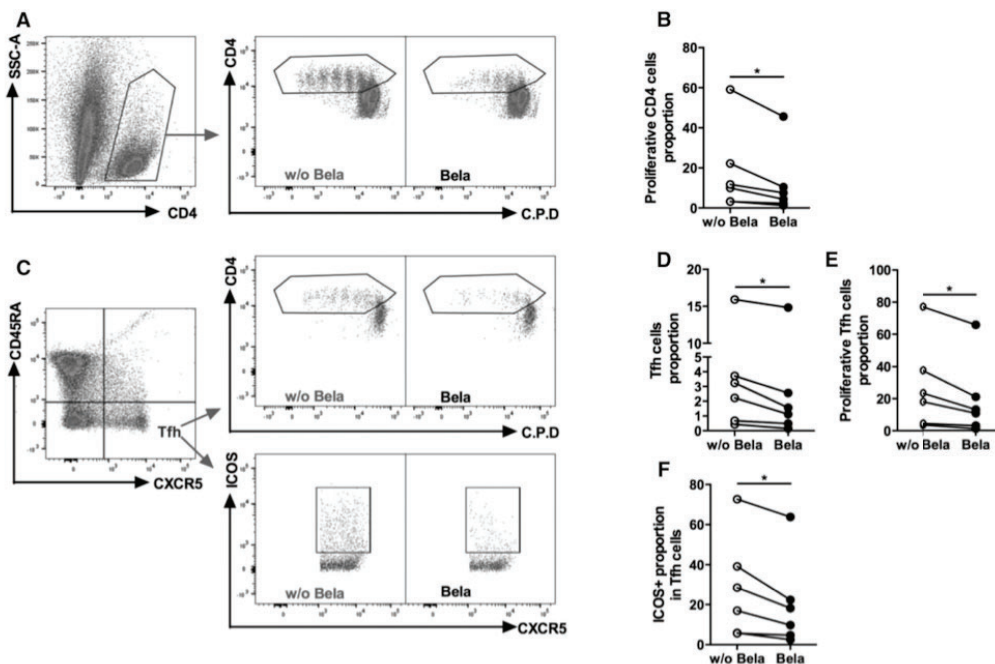


Figure 4. Stimulated B cells generated with Belatacept decrease proliferation of CD4+ cells and Tfh. B cells were cultured with CD40L and IL-21 stimulation in the presence or absence of Belatacept for 5 days ($n=6$). After 5 days, stimulated B cells generated with or without Belatacept were washed and cocultured with autologous CD4 cells labeled with cell proliferation dye (C.P.D.) at a 1:1 ratio (5×10^4) in the presence of soluble anti-CD3 ($2 \mu\text{g/ml}$) for 4 days. Proliferation and ICOS proportion were analyzed by flow cytometry. (A) Dot plots of a representative donor showing gating strategies for proliferative CD4 cells. (B) Proportion of proliferative CD4 cells cocultured with stimulated B cells generated with or without Belatacept for each donor. (C) Dot plots showing the gating strategy for Tfh, proliferative Tfh, and ICOS+ Tfh. (D) Proportion of Tfh in CD4+ cells. (E) Proportion of proliferative Tfh in Tfh. (F) Proportion of ICOS+ Tfh in Tfh. Bela, Belatacept; w/o Bela, without Belatacept. * $P < 0.05$ versus Belatacept (Wilcoxon matched pairs signed rank test).

+CD45RA⁻ T cells than those treated with CNI (Figure 8, A–C, Table 2). The proportion and absolute numbers of circulating Tfh (CD4⁺CD45RA⁻CXCR5⁺) were significantly lower in KTRs treated with Belatacept than in CNI-treated patients (Figure 8, D and E). The quantitative Tfh defect observed in KTRs treated with Belatacept affected the three subgroups of functional Tfh (Tfh1, -2, and -17) (Figure 8, F–H). Interestingly, 99% of Tfh expressed CD28 in three subgroups (Figure 9A). To evaluate the activation status of blood Tfh, we quantified highly activated Tfh (ICOS⁺ and ICOS⁺PD1⁺) in CD4⁺ cells and Tfh. The proportion in CD4⁺ cells and absolute numbers of activated Tfh ICOS⁺ and ICOS⁺PD1⁺ were significantly reduced in KTRs treated with Belatacept compared with patients treated with CNI (Figure 9, B–F). Moreover, in Tfh, the proportion of ICOS⁺PD1⁺ Tfh was significantly lower in the Belatacept group than in the CNI group (Figure 9, G and H). Altogether, our results highlight both quantitative and functional defects of circulating Tfh in KTRs treated with Belatacept.

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 reveals that the lowest level of *dn*DSAs observed in Belatacept-treated KTRs is related to a direct control of B cells responses by Belatacept.

Whereas Belatacept was initially developed to target T cells, these findings show that this therapeutic molecule also directly modulates effector B cells responses and humoral function, independent of T cell modulation. When we used highly purified B cells that we stimulated *in vitro* to reproduce Tfh help, we saw that Belatacept reduced plasmablasts proportion and more significantly, IgG2 and IgG4 secretion. Thus, we were able to show for the first time that Belatacept directly modulates plasma cells function. Additionally, our data show that Belatacept reduces the expression of the transcription factor, Blimp-1, majorly involved in plasma cells generation and

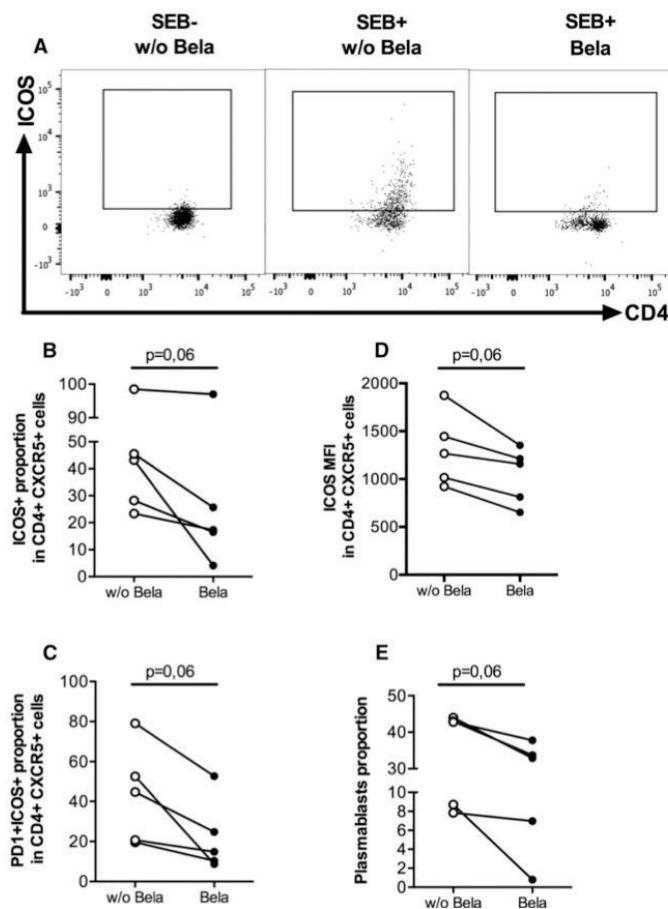


Figure 5. Tfh-memory B cells crosstalk is altered in the presence of Belatacept. Purified blood memory B cells (CD19+IgD⁻CD38^{dim}CD27⁺) were cocultured with Tfh (CD4+CD45RA⁻CXCR5+PD1+) at a 1:1 ratio ($1-3 \times 10^4$) in the presence of the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) for 5 days with or without Belatacept. (A) Dot plot of ICOS in CD4+CXCR5+ cells for a representative donor with or without Belatacept or stimulation by SEB. Notably, the expressions of ICOS (left panel) and PD1 (data not shown) were negative without SEB stimulation. (B and C) Proportions of (B) ICOS+ and (C) ICOS+PD1+ Tfh were analyzed by flow cytometry. (D) MFI of ICOS+ Tfh. (E) Plasmablasts (CD19+CD38^{hi}) proportion. Data are given as mean \pm SEM for each group. Bela, Belatacept; w/o Bela, without Belatacept.

antibodies secretion.¹⁹ Tellier *et al.*²⁰ have already shown that the inactivation of Blimp-1 in mature plasma cells impaired their ability to secrete antibodies but not their survival. In accordance, we did not observe any increase in B cell mortality *in vitro* or any modification in B cell and plasmablast proliferation in the presence of Belatacept. We thus hypothesize that

the reduction of Blimp-1 by Belatacept does not primarily affect plasma cells differentiation but rather “blocks” their Ig production. To assess if Belatacept could also influence antibody-independent functions of treated B cells,^{21–23} we evaluated whether it modified the cytokine profile secreted by B cells and specifically, plasma cells. We found a significant decrease in IFN γ -secreting plasmablasts and B cells as a whole. Interestingly, IFN γ has been implicated in Ig class switching.^{24–27} Whether this particular subset of IFN-secreting plasma cells, which seems to be specifically targeted by Belatacept, plays a role in the decreased Ig secretion observed in our model needs to be further evaluated.

The rationale for the development and use of Belatacept molecule is mainly on the basis of its ability to provide an optimal blockade of naïve T cell activation to prevent allograft rejection.²⁸ By binding on B7 receptors (CD80/CD86) on APCs, Belatacept prevents APCs delivery of costimulatory signal to T cell by inhibiting CD28 (expressed on T cells) interactions with its APC ligands. Kowalczyk *et al.*¹⁷ were the first to suggest that CTLA4-Ig may also have direct effect on APCs. Indeed, CTLA4-Ig could induce a reverse signaling by B7 molecules in human DCs that led to the generation of tolerogenic DCs. In contrast, triggering CD86 on human or murine splenic B cells with an agonist antibody or CD28-Ig could activate B cells, leading to increased IgG production.^{29–31} However, before this work, a direct effect of Belatacept on B cells had not been assessed. Here, we showed that Belatacept activates the STAT3 signaling pathway in stimulated B cells, a mechanism previously described in DCs by Kowalczyk *et al.*³²

We next aimed to assess which receptor could account for the direct signaling triggered by Belatacept in stimulated B cells. Unlike CD80, CD86 molecule has a longer cytoplasmic tail and potential phosphorylation sites that could mediate intracellular signaling. Immunoblot experiments strongly suggest that ligation of Belatacept on CD86 (but not on CD80) specifically triggers a direct signaling in stimulated B cells and decreases its expression. These results are coherent with the described structure of these two molecules^{33–35} and suggest a novel mechanism by which CD80 and CD86 play differential roles in B cells. In addition, we show that CD86 was

Table 1. Clinical and demographic characteristic of KTRs

Demographic and Transplant Characteristics	KTR		P Value
	CNI	Belatacept	
Patients, n	12	10	
Demography			
Recipient age at the time of follow-up, yr	64±3	65±4	0.90
Sex, men/women	5/7	6/4	0.70
Donor age, yr	50±5	54±4	>0.99
Living/cadaveric donor	1/11	0/10	
HLA A-B-DR incompatibilities	3±0.4	3±0.4	>0.99
Time after transplantation, yr	11.2±1	10.6±0.7	0.85
Primary renal disease, n (%)			0.20
Immunologic ^a	2 (17)	5 (50)	
Nonimmunologic ^b	10 (83)	5 (50)	
Immunosuppressive treatment, n (%)			
Belatacept	0	10 (100)	<0.001
CNI	12 (100)	0	<0.001
Tacrolimus	9 (75)	0	
Cyclosporin A	3 (25)	0	
Steroid	10 (83)	9 (90)	>0.99
MPA	12 (100)	10 (100)	>0.99
Episode of biopsy proven acute rejection, n (%)	1 (8)	1 (10)	>0.99
Biologic data			
GFR, ml/min per 1.73 m ²	60±5	65±4	0.40
Proteinuria, g/24 h, median (minimum to maximum)	0.1 (0.05–0.2)	0.025 (0–0.6)	0.06
DSA score 4 (MFI<1100), n (%)	4 (33)	3 (30)	>0.99
MFI, mean±SEM	803±80	935±127	0.40

Data are presented as mean±SEM or n (percentage) unless otherwise indicated. GFR was estimated according to the Modification of Diet in Renal Disease formula. P value was calculated by two-tailed Mann-Whitney U test or Fisher exact test. MPA, Mycophenolic Acid.
^aImmunologic renal diseases include IgA nephropathy and Wegener granulomatosis.
^bNonimmunologic diseases include uropathy, nephroangiosclerosis, autosomal dominant polycystic kidney disease, diabetic nephropathy, and tubulointerstitial disease.

mainly expressed on plasmablasts after activation and that expression was significantly repressed in the presence of Belatacept. This reinforces the possibility that Belatacept could directly target CD86 on plasmablasts and may inhibit their secretion of Ig by downregulating Blimp-1 expression and/or IFN γ secretion. Other mechanisms may also be implicated in the modulation of humoral responses observed in our *in vitro* study. After 5 days of

Table 2. Summary of immunologic characteristics of KTRs

Lymphocytes Substets	KTR		P Value
	CNI	Belatacept	
No. of lymphocytes, no. per 1 mm ³	1858±178	1448±282	0.15
CD4+ proportion, % in lymphocytes	46.5±2.6	42.6±3.8	0.80
No. of CD4+, no. per 1 mm ³	849±107	624±147	0.07
CD4+CD45RA– proportion	52±7	40±5	0.35
No. of CD4+CD45RA–	425±62	231±49	0.01
Frequency of CD19+	6.6±1	5.2±1.2	0.35
No. of CD19+	123±19	100±52	0.03

Data are presented as mean±SEM.

stimulation, 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.^{36,37} Moreover, PDL1 can bind to CD80, and PDL1 expression was upregulated in the presence of Belatacept. Still, admitting that the blockade of CD28 or PDL1 signaling by Belatacept in B cells participates in the direct modulation of humoral responses *in vitro* remains to be further investigated.

Our results suggest that Belatacept modifies the pattern of expression of costimulatory molecules on the surface of B cells by several mechanisms, including (1) occupancy by Belatacept on both CD80 and CD86 ligands, (2) decrease in free expression of CD86, and (3) increased expression of PDL1. Importantly, we revealed that, after B cells were generated in the presence of Belatacept, they had impaired abilities to stimulate T cell proliferation *in vitro* without needing a continuous exposure to the drug. This result supports that the modified pattern of costimulatory receptors induced by Belatacept is functionally relevant and durably impairs B cell APCs capacities.

It has been previously suggested that Belatacept alters germinal center responses caused by Tfh priming blockade by DC.¹⁶ We hypothesize that Belatacept could also impair germinal center reactions by targeting B-Tfh interaction in human patients with transplants.

We showed that Belatacept decreased the expression of Tfh activation markers in an *in vitro* model of coculture using purified Tfh and memory B cells. This suggests that blocking access to 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.*,³⁸ which reported, in a model of Tfh-B cells coculture isolated from pediatric tonsil, a reduced proportion of Tfh in the presence of Belatacept or a selective antagonist of CD28, intimating that both molecules control proliferative capacities of human Tfh. Previous studies identified ICOS-inducible T cell costimulator ligand as the main driver for Tfh differentiation and maintenance.^{39,40} Our results bring further evidence that CD28 expression on Tfh could also be a determinant pathway for Tfh activation.

Importantly, we assessed whether the above-described *in vitro* effects of Belatacept could also be observed in KTRs treated with Belatacept.

The decreased B cell expression of CD80 that we observed by flow cytometry in these patients and particularly, on memory B

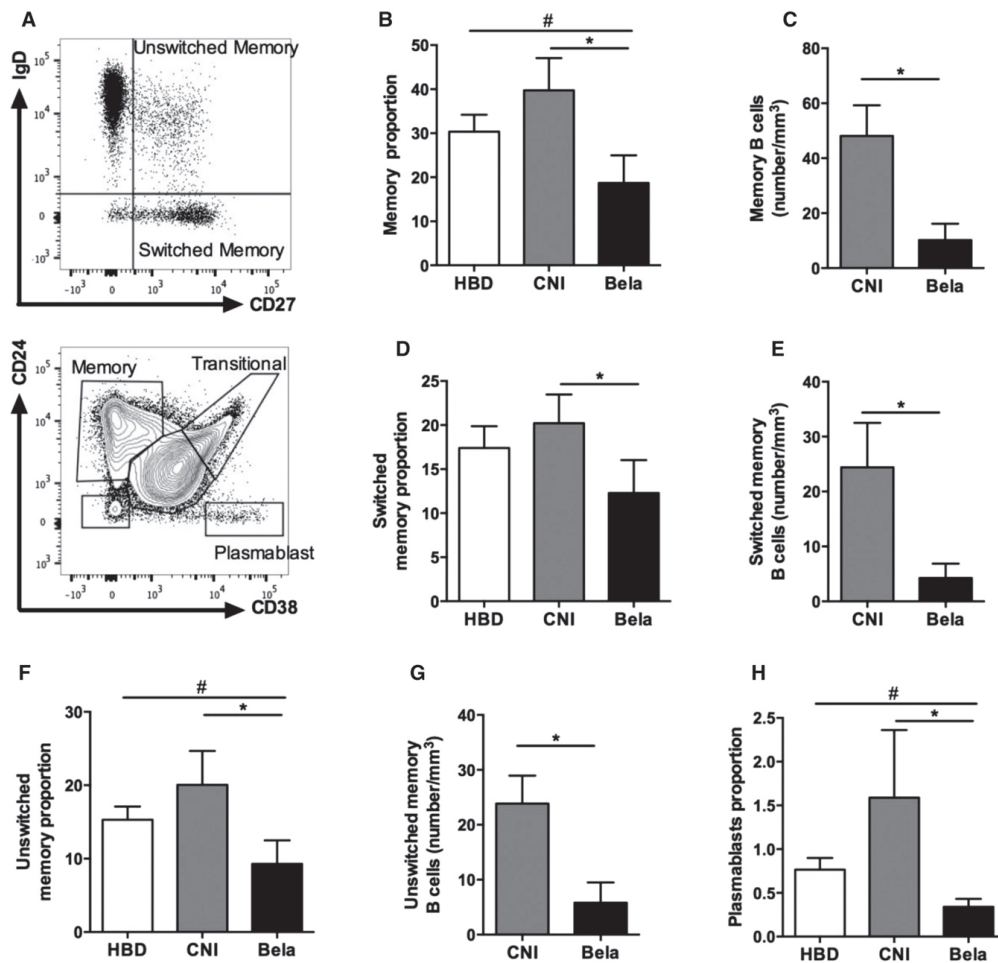


Figure 6. KTRs treated with Belatacept display lower proportion of circulating effector B cells. Blood B cells immunophenotyping of HBDs ($n=12$) or KTRs treated with CNI ($n=12$) or Belatacept ($n=10$). (A) Representative dots plots showing gating strategies for switched and unswitched memory B cells (upper panel) and memory cells (CD24^{hi}CD38^{hi}), plasmablasts (CD24^{hi}CD38^{hi}), and transitional (CD24^{hi}CD38^{hi}) B cells. (B) Proportion and (C) number of memory (CD27⁺) B cells among CD19⁺ cells. (D) Proportion and (E) number of switched memory (CD19⁺CD27⁺IgD⁻) B cells in CD19⁺ cells. (F) Proportion and (G) number of unswitched memory (CD19⁺CD27⁻IgD⁺) B cells in CD19⁺ cells. (H) Proportion of plasmablasts (CD19⁺CD24⁻CD38^{hi}) in CD19⁺ cells. Data are given as mean \pm SEM for each group. Bela, Belatacept. * $P<0.05$ versus CNI (Kruskal–Wallis test [B, D, F, and H] or Mann–Whitney U test [C, E, and G]); # $P<0.05$ versus HBD (Kruskal–Wallis test [B, F, and H]).

cells highly suggests an efficient binding of Belatacept to its receptor in physiologic condition. CD86 expression, however, was very low and did not differ between both groups of patients. We believe that this very low level of CD86 expression at basal state on circulating B cells prevents us from assessing any effect of Belatacept on CD86 ligands *in vivo*.

Notably, we showed that these patients displayed lower proportions of circulating effector B cells (*i.e.*, memory B cells, switched memory B cells, and plasmablasts) associated with diminished proportion of circulating Tfh cells compared with control patients treated with CNI. Furthermore, the circulating Tfh cells of KTRs treated with Belatacept displayed lower levels

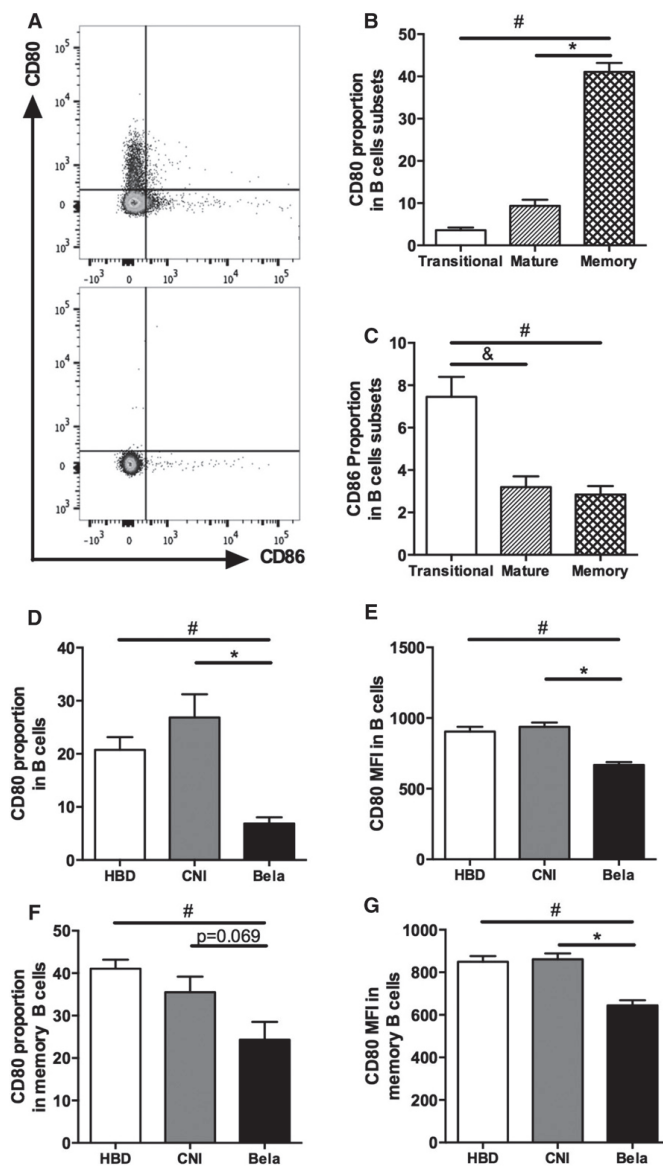


Figure 7. CD80 and CD86 expression varies according to the maturation stages of circulating B cells and KTRs treated with Belatacept display decreased CD80 expression on B cells, particularly on memory B cells. (A) Staining of CD19+ B cells with CD80 and CD86 antibodies (upper panel) and isotype control (lower panel). (B and C) Proportions of (B) CD80+ and (C) CD86+ B cells of HBDs were evaluated according to B cell subsets described in Figure 6A (n=10). Data are given as mean±SEM for each group. *P<0.05 memory versus mature B cells (Kruskal–Wallis test); #P<0.05 memory versus transitional B cells (Kruskal–Wallis test); &P<0.05 transitional versus mature B

of markers of activation as assessed by the proportion of ICOS+PD1+ Tfh in Tfh populations. Interestingly, the use of Tfh/B cells defect in the control of DSAs secretion was suggested in operational tolerant KTRs 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 KTRs.⁴¹ Altogether, 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 Belatacept plays a direct and active role at several steps of the humoral response. Belatacept may uniquely control B cell 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 us, at least in part, to account for the lesser extent of HLA sensitization observed in KTRs. They also raise new clinical perspectives in the development of immunosuppressive strategies aiming to target costimulatory molecules in the fields of both transplantation and autoimmune disease.

CONCISE METHODS

A detailed description, including information on materials and reagents, flow cytometry, and Western blotting, is in Supplemental Material.

Isolation and Culture of B Cells

Peripheral blood of HBDs was obtained from Etablissement Français du Sang (Creteil, France). PBMCs were isolated by density gradient centrifugation with lymphocyte separation

cells (Kruskal–Wallis test). (D) CD80 proportion and (E) MFI in B cells of HBDs (n=10) or KTRs treated with CNI (n=12) or Belatacept (n=10) described in Table 1. (F) CD80 proportion and (G) MFI in memory B cells of patients described above. Data are given as mean±SEM for each group. Bela, Belatacept. *P<0.05 versus CNI (Kruskal–Wallis test); #P<0.05 versus HBD (Kruskal–Wallis test).

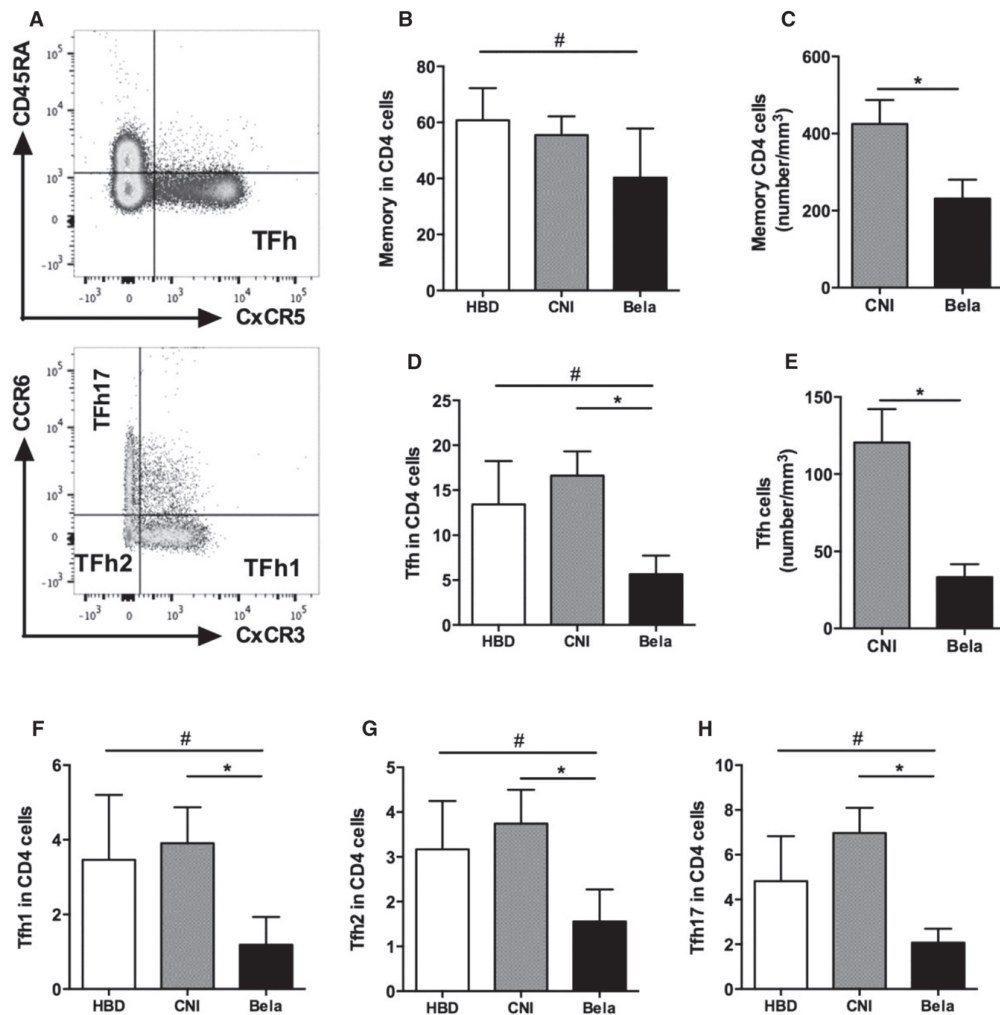


Figure 8. KTRs treated with Belatacept display decreased proportion of circulating Tfh. (A) Representative dot plot showing gating strategy of memory (CD4+CD45RA⁻) T cells and Tfh (CD4+CD45RA⁻CXCR5⁺) (upper panel) as well as Tfh subsets: Tfh17 (CCR6+CXCR3), Tfh2 (CCR6-CXCR3⁻), and Tfh1 (CCR6-CXCR3⁺; lower panel). (B) Proportion and (C) number of memory CD4 cells (CD45RA⁻ cells) in CD4⁺ cells. (D) Proportion and (E) number of Tfh (CD45RA⁻CXCR5⁺ cells) in CD4⁺ cells. (F–H) Proportions of (F) Tfh1 (CCR6-CXCR3⁺ cells), (G) Tfh2 (CCR6-CXCR3⁻), and (H) Tfh17 (CCR6+CXCR3⁻) in CD4⁺ cells. Data are given as mean \pm SEM for each group (Belatacept, $n=10$; CNI, $n=8$; HBD, $n=10$). Bela, Belatacept. * $P<0.05$ versus CNI (Kruskal–Wallis test [D and F–H] or Mann–Whitney U test [C and E]); # $P<0.05$ versus HBD (Kruskal–Wallis test [B, D, and F–H]).

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). Belatacept was added to the cell cultures at the concentration of 40 μ g/ml during 5 or 10 days.¹⁷ The controls consisted of cultures without drug.

Supplemental Material has culture details.

Flow Cytometry, CFSE Labeling, and Ig Production in B Cell 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

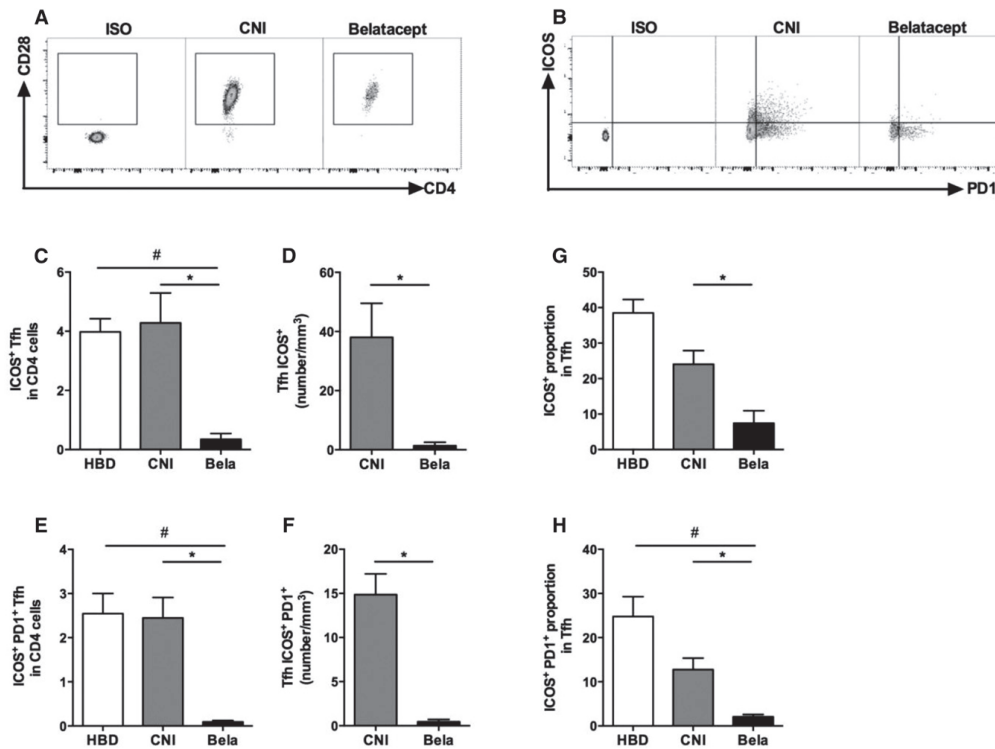


Figure 9. The circulating Tfh of KTRs treated with Belatacept display lower levels of markers of activation. PD1, ICOS, and CD28 expressions were studied on gated Tfh (CD4+CD45RA–CXCR5+) by flow cytometry. (A and B) Dot plots are shown for Fluorescence Minus One, one representative of KTRs treated with CNI, and another with Belatacept. (C) Proportion and (D) number of activated ICOS+ Tfh in CD4+ cells. (E) Proportion and (F) number of activated PD1+ICOS+ Tfh in CD4+ cells. (G and H) Proportions of (G) ICOS+ Tfh or (H) PD1+ICOS+ Tfh in Tfh. Data are given as mean±SEM for each group (Belatacept, n=6; CNI, n=6; HBD, n=6). Bela, Belatacept. *P<0.05 versus CNI (Kruskal–Wallis test [D, F, and G] or Mann–Whitney U test [C, E, and H]); #P<0.05 versus HBD (Mann–Whitney U test [C, E, and H]).

markers by multicolor flow cytometry. Cell aliquots were stained for 20 minutes with selected combinations of fluorochrome-conjugated antibodies at 4°C. Supplemental Material has details.

For the proliferation assay, 1–10×10⁶ cells of the concerned cell populations were labeled with 1 μM cell proliferation dye (eBioscience, Paris, France) 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.

Ig concentrations were measured in the culture supernatants by Luminex following the manufacturer’s protocol (Affymetrix E-bioscience; Human Isotyping procartaplex).

Western Blot Analyses of Purified B Cells

On day 5, activated B cells were lysed in RIPA buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Na-deoxycholate, and 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. Supplemental Material has details.

Isolation and Culture of CD4 Cells

CD4 cells from frozen PBMCs were purified by negative selection using the CD4 cell isolation kit II for magnetic cell separation (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). Isolated CD4 cells were then labeled with cell proliferation dye (eBioscience) and cultured with anti-CD3 (Miltenyi Biotec SAS) at the concentration of 2 μg/ml with or without B cells at a 1:1 ratio during 4 days.

In Vitro Tfh-B Cell Coculture Assays

B cells and Tfh were isolated from HBD whole blood using the MACSprep HLA B/T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec SAS). Sorting conditions were detailed in Supplemental Material. Memory

B cells (1×10^4) were cocultured with blood Tfh cells at a 1:1 ratio with endotoxin-reduced staphylococcal enterotoxin B (100 ng/ml; Sigma-Aldrich). Belatacept was added to the cell cultures at different concentrations (10 and 40 $\mu\text{g/ml}$).

Supplemental Material has details.

Patients

Two groups of first KTRs were included in the study. (1) The first group included KTRs treated with Belatacept (LEA29Y), mycophenolate mofetil, and steroids ($n=10$). We picked out patients from phase 3 clinical studies cohorts (BMS) from Henri Mondor and Bicêtre Hospitals. These patients had had stable renal function (Modification of Diet in Renal Disease >35 ml/min and proteinuria <0.5 g/g). Time between transplantation and sample analysis ranged from 8 to 14 years. (2) The second group included patients with stable graft function treated with CNIs, mycophenolate mofetil, and/or steroids ($n=12$). Patients were selected from our database, were not immunized at the time of transplantation, and were matched to patients on Belatacept 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) and those 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 HBDs was included ($n=12$).

Immunophenotyping of Blood B Cells and Tfh Cells

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. Supplemental Material has further details.

Markers of activation and costimulation 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).

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. Statistical analyses were adapted to data distribution (Kruskal–Wallis test, Mann–Whitney U test, and nonparametric paired Wilcoxon test). Continuous variables from patients and HBD groups were expressed as mean \pm SEM and compared using the Kruskal–Wallis test. Paired biologic observations from cells cultures were analyzed using Wilcoxon paired nonparametric tests (flow cytometry and Western blot data). Significance was defined as a P value of <0.05 .

ACKNOWLEDGMENTS

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

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- 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
- Terasaki PI: A personal perspective: 100-Year history of the humoral theory of transplantation. *Transplantation* 93: 751–756, 2012
- 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
- 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
- Everly MJ, Terasaki PI: The state of therapy for removal of alloantibody producing plasma cells in transplantation. *Semin Immunol* 24: 143–147, 2012
- Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blango 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
- Rostaing L, Vincenti F, Grinyo 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. *Am J Transplant* 13: 2875–2883, 2013
- Vincenti F, Tedesco Silva H, Busque S, O'Connell P, Friedewald J, Cibrik D, Budde K, Yoshida A, Cohnsey S, Weimar W, Kim YS, Lawandy 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
- Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, Rice K, Steinberg S, Gaithe L, Moal M-C, Mondragón-Ramírez 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
- Heher E, Markmann JF: The clearer BENEFITS of belatacept. *N Engl J Med* 374: 388–389, 2016
- 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 JP, Brouard S: Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int* 78: 503–513, 2010
- 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
- Leibler C, Matignon M, Pilon C, Montespan F, Bigot J, Lang P, Carosella ED, Cohen J, Rouas-Freiss N, Grimbert P, Menier C: Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naïve and transitional B cells. *Am J Transplant* 14: 1173–1182, 2014
- 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, Odum 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 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
 17. 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
 18. Koorella C, Nair JR, Murray ME, Carlson LM, Watkins SK, Lee KP: Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. *J Biol Chem* 289: 7747–7762, 2014
 19. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, Axelsson E, Fischer M, Cebolla B, Tarakhovskiy 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
 20. 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
 21. Shen P, Fillatreau S: Antibody-independent functions of B cells: A focus on cytokines. *Nat Rev Immunol* 15: 441–451, 2015
 22. Lund FE, Randall TD: Effector and regulatory B cells: Modulators of CD4 + T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10: 236–247, 2010
 23. Fillatreau S: Regulatory plasma cells. *Curr Opin Pharmacol* 23: 1–5, 2015
 24. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE: Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* 1: 475–482, 2000
 25. Bossie A, Vitetta ES: IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2a-committed LPS-stimulated murine B cells: Implications for the role of IFN-gamma in class switching. *Cell Immunol* 135: 95–104, 1991
 26. Kawano Y, Noma T, Yata J: Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J Immunol* 153: 4948–4958, 1994
 27. Lund FE: Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol* 20: 332–338, 2008
 28. Ford ML: T cell cosignaling molecules in transplantation. *Immunity* 44: 1020–1033, 2016
 29. 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
 30. 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
 31. 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
 32. 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
 33. Hathcock KS, Hodes RJ: Role of the CD28-B7 costimulatory pathways in T cell-dependent B cell responses. *Adv Immunol* 62: 131–166, 1996
 34. Marín LA, Moya-Quiles MR, Miras M, Muro M, Minguela A, Bermejo J, Ramírez P, García-Alonso AM, Parrilla P, Alvarez-López MR: Evaluation of CD86 gene polymorphism at +1057 position in liver transplant recipients. *Transpl Immunol* 15: 69–74, 2005
 35. Kin NW, Sanders VM: CD86 regulates IgG1 production via a CD19-dependent mechanism. *J Immunol* 179: 1516–1523, 2007
 36. 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
 37. Rozanski CH, Utley 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
 38. Ville S, Poirier N, Branchereau J, Charpy V, Pengam S, Nerrière-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* 27: 3577–3588, 2016
 39. Crotty S: T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 41: 529–542, 2014
 40. 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
 41. Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, Le Bot S, Cadoux M, Dugast E, Paul C, Malard-Castagnet S, Ville S, Guérif P, Souillou 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* 17: 1490–1501, 2017

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2017060679/-/DCSupplemental>.

**BRIEF COMMUNICATION**

AJT

Belatacept in renal transplant recipient with mild immunologic risk factor: A pilot prospective study (BELACOR)

Claire Leibler^{1,2} | Marie Matignon^{1,2} | Anissa Moktefi^{2,3} | Chloé Samson² |
 Anissa Zarour⁴ | Stéphanie Malard⁵ | Emmanuelle Boutin^{4,6} | Caroline Pilon² |
 Laurent Salomon⁷ | Pierre-André Natella⁴ | Antoine Durrbach⁶ | Thomas Robert⁸ |
 Florence Canoui-Poitrine^{4,9} | Philippe Grimbert^{1,2,10}

¹Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Nephrology and Renal Transplantation Department, Institut Francilien de Recherche en Néphrologie et Transplantation, Groupe Hospitalier Henri-Mondor/Albert-Chenevier, Créteil, France

²Université Paris-Est-Créteil, Département Hospitalo-Universitaire Virus-Immunité-Cancer, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France

³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pathology Department, Groupe Hospitalier Henri-Mondor/Albert-Chenevier, Créteil, France

⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Public Health Department/Clinical Research Unit (URC-Mondor), Groupe Hospitalier Henri-Mondor/Albert Chenevier, Créteil, France

⁵Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Laboratoire Régional d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, Paris, France

⁶Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Nephrology and Renal Transplantation Department, Institut Francilien de Recherche en Néphrologie et Transplantation, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁷Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Urology Department, Groupe Hospitalier Henri-Mondor/Albert Chenevier, Créteil, France

⁸Department of Nephrology, Transplantation and Emergency, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Paris, France

⁹Département Hospitalo-Universitaire A-TVB, Institut Mondor de Recherche Biomédicale - EA 7376 Clinical Epidemiology and Ageing Unit, Université Paris-Est-Créteil, Créteil, France

¹⁰Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CIC-BT 504, Créteil, France

Correspondence

Philippe Grimbert

Email: philippe.grimbert@aphp.fr

The benefit of belatacept on antibody-mediated rejection (ABMR) incidence after kidney transplant with preformed donor-specific antibodies (DSAs) has never been assessed. Between 2014 and 2016, we conducted a multicenter prospective clinical trial with 49 patients to determine kidney allograft outcome in recipients with preformed DSAs (maximal mean fluorescence intensity 500 to 3000) treated with belatacept (BELACOR trial). Immunosuppressive strategy included antithymocyte globulin, belatacept, mycophenolate mofetil, and steroids. An ancillary control group was designed retrospectively, including patients fulfilling the same inclusion criteria treated with calcineurin inhibitors. In BELACOR group, no patient exhibited acute ABMR, patient and allograft survival at 1 year was 100% and 95.4%, respectively, and the estimated glomerular filtration rate was 53.2 mL/min/1.73 m². However, the 12-month incidence of acute T cell-mediated rejection was 25.4% (14.5% to 42.4%). Comparison with the control group showed significantly higher T cell-mediated rejection incidence only in the BELACOR group ($P = .003$). Considering the DSAs, the

Abbreviations: ABMR, antibody-mediated rejection; CI, confidence interval; CMV, cytomegalovirus; CNi, calcineurin inhibitor; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; dnDSA, de novo donor-specific antibody; DSA, donor-specific antibody; EBV, Epstein-Barr virus; eGFR, estimated glomerular filtration rate; MFI, mean fluorescence intensity; MMF, mycophenolate mofetil; SAE, serious adverse event; TCMR, T cell-mediated rejection.

Claire Leibler and Marie Matignon contributed equally to the manuscript.

outcome was similar in the 2 groups except a significantly higher number of patients displayed a complete disappearance of class II DSAs in the BELACOR group ($P = .001$). Belatacept was not associated with an acute ABMR increased risk and may be considered as immunosuppressive strategy in transplant recipients with preformed DSAs (maximal mean fluorescence intensity 500 to 3000). Prospective randomized trials are needed to confirm these results.

KEYWORDS

antibody-mediated (ABMR), belatacept, clinical research/practice, clinical trial, immunosuppressant - fusion proteins and monoclonal antibodies, immunosuppression/immune modulation, kidney transplantation/nephrology, panel reactive antibody (PRA), rejection

1 | INTRODUCTION

One of the main goals after kidney transplant is avoidance of antibody-mediated rejection (ABMR), the leading cause of allograft loss.¹ ABMR is likely to occur in sensitized kidney allograft recipients with anti-HLA donor-specific antibodies (DSAs) before and after (de novo DSA [dnDSA]) transplant.² The growing number of sensitized patients before transplant has become a major challenge. Currently, the incidence is up to 30%-40% of the transplant candidates.³

Numerous strategies to improve access to kidney transplant of sensitized recipients with preformed anti-HLA DSAs have been developed, including specific graft allocation policies⁴ and immunosuppressive protocols that attempt to remove antibodies.⁵ Those protocols involved antibody clearance using apheresis (immunoadsorption or plasmapheresis),⁵ B cell-modulating therapies (high dose of intravenous immunoglobulin or rituximab)⁵ or plasma cell depletion (bortezomib),⁵ complement inhibition (eculizumab)⁵ and, more recently, IgG-inactivating agents.⁶ The principal limitation of those strategies is the high prevalence of acute and chronic ABMR (up to 30%) early after transplant associated with poor allograft survival.^{5,6} In kidney allograft recipients with preformed DSAs, induction therapy with antithymocyte globulin is strongly recommended.⁷ However, no prospective randomized clinical trial aiming to define the best maintenance immunosuppressive therapy in this immunological context is available.

Belatacept (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 [CTLA4]-Ig) is a costimulation blocker approved by the US Food and Drug Administration in June 2011 to prevent acute rejection in kidney transplant recipients displaying a low immunological risk (BENEFIT trials).⁸ In the 7-year follow-up, recipient and kidney allograft survivals after transplant were significantly better in the belatacept group compared with the calcineurin inhibitors (CNIs) group, and the incidence of dnDSAs within 7 years was significantly lower in belatacept-treated recipients.⁹ This clinical result is in accordance with former experimental data showing that belatacept inhibits T cell-dependent antibody production.¹⁰ The combined blockade of CD28:B7 and CD40:40L pathways can suppress DSA formation

in kidney-transplanted macaques.¹¹ Belatacept or anti-CD40 murine antibody with lymphodepletion could also suppress the humoral immune response and prevent ABMR.¹² Delayed introduction of CTLA4-Ig in animal allograft models collapsed the allospecific germinal center B and inhibited alloantibody production.¹³ Moreover, CTLA4-Ig was able to constrain B cell responses and heart rejection in sensitized mice.¹⁴ Taken together, these clinical and experimental results suggest that belatacept may be widely responsible for lower immune humoral responses in kidney transplant recipients.

So far, the potential benefit of belatacept on the incidence of ABMR after kidney transplantation in sensitized recipients with preformed DSAs has never been assessed. We present here the results of the first multicenter open clinical trial aiming to determine the impact of belatacept-based maintenance immunosuppressive therapy in kidney transplant recipients with preformed DSAs on the acute ABMR 12-month incidence. Results were compared with results observed in an ancillary control group that included patients fulfilling the same inclusion criteria and treated with CNIs.

2 | PATIENTS AND METHODS

2.1 | Study design

We conducted a single-arm, multicenter (CHU Henri Mondor, CHU Kremlin Bicêtre, CHU Tenon, and Assistance-Publique-Hôpitaux de Paris, France) clinical trial (the BELACOR trial) between September 2014 and September 2017. The inclusion period was 24 months from September 2014, and all patients were followed for 12 ± 3 months after transplant. All kidney transplant recipients >18 years old with preformed DSAs and maximal mean fluorescence intensity (MFI_{max}) between 500 and 3000 within 1 year of a previous transplant were included.

Exclusion criteria were as follows: idiopathic focal segmental glomerulosclerosis, cold ischemia time >30 hours, belatacept contraindication (negative recipient Epstein-Barr virus [EBV] serology), thymoglobulin, steroids, mycophenolate mofetil (MMF) or high-dose intravenous Ig contraindications or allergy, no active contraception

for women, pregnancy or breastfeeding, acute infections (bacterial or viral), and uncontrolled psychosis.

All patients gave personally signed and dated written informed consent before completing any study-related procedure. The study protocol was approved by the French National Drug Security Authority (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) and the institutional review board of Bicêtre Hospital (CPP Ile-de-France VII). The study was an investigator-initiated trial (Ph. Grimbert, MD, principal investigator) and was designed, conducted, and evaluated solely by the investigators after approval by Bristol-Myers-Squibb.

An ancillary control group was built retrospectively. Control patients had the same inclusion and exclusion criteria as the patients in the BELACOR trial except for EBV serology. All kidney allograft recipients engrafted between January 2013 and March 2017 with pretransplant DSAs who fulfilled the inclusion criteria were included in the study. A signed consent for participation was obtained from all patients included in the control group (IRB No. 00003835).

2.2 | Study endpoints

The primary endpoint was the response rate defined by no acute ABMR according to BANFF 2011 criteria within 12 months after transplant.¹⁵ Secondary endpoints were (1) subclinical ABMR incidence on protocol biopsies performed at months 3 and 12, (2) patient and allograft survival at 12 months, (3) estimated glomerular filtration rate (eGFR)¹⁶ and proteinuria:creatinine ratio (mg/mmol) at months 3 and 12, (4) clinical and subclinical T cell-mediated rejection (TCMR) frequency at months 3 and 12, and (5) preformed DSA outcome and dnDSA frequency at 12 months.

2.3 | Immunosuppressive therapy

All patients assigned to be treated with belatacept-based (Nulojix; Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) immunosuppression received doses as follows: 10 mg/kg at days 1 and 5 and at weeks 2, 4, 8, and 12 and then 5 mg/kg every 4 weeks. Induction therapy was thymoglobulin (Genzyme, Cambridge, MA) given as 3 mg/kg total dose over 4 days and steroids (methylprednisolone 500, 250, and 100 mg days 0-3). Maintenance therapy included MMF (2 g/d) and steroids (prednisone from day 4 at 20 mg/d tapered by 5 mg weekly to a final maintenance dose of 5 mg/d). MMF could be modified at physician discretion. Control group treatment was the same except for belatacept. CNIs could be cyclosporine or tacrolimus, and both could be modified at physician discretion.

2.4 | Procedures

Patients were included in the study at the time of transplant. At day 0, inclusion and exclusion criteria were assessed for each patient. Follow-up visits were scheduled at 3 months (M3) and 12 months (M12) after transplant. At M3 and M12, clinical data (eGFR and proteinuria), histological characteristics (kidney allograft biopsy), and DSA data were recorded in a standardized electronic case report

form (CleanWeb, Telemedicine Technologies [https://www.tentel-emed.com/]). Control group visits were similar, and all data were recorded retrospectively in our own database.

2.5 | Anti-HLA antibody screening

All sera before and after transplant (M3 and M12) were examined for the presence of circulating preformed DSAs and dnDSAs directed against donor HLA-A, HLA-B, HLA-Cw, HLA-DR, or HLA-DQ antigens by using high-resolution Luminex SAB assay technology (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) on a Luminex platform. All beads showing a normalized MFI >500 were considered positive.

2.6 | Histologic analysis

Protocol kidney allograft biopsies were performed 3 and 12 months after transplant, and specimens were analyzed as recommended according to Banff 2011 updated classification.¹⁵ Treatment of acute rejection episodes was decided by the physician. Acute ABMR episodes should be confirmed centrally by a trained pathologist (A.M.).

2.7 | Infectious prophylaxis

Participants with positive cytomegalovirus (CMV) serology before transplant or positive donors were treated with valganciclovir within 6 months after transplant. *Pneumocystis jiroveci* and *Toxoplasma gondii* prophylaxis included sulfamethoxazole/trimethoprim or pentamidine isetionate aerosol within the study.

2.8 | Statistical analysis

Sample size calculation was based on the single-arm trial design according to a Fleming 1-step plan. Response rate (no acute ABMR within 12 months) $\leq 80\%$ did not warrant further drug investigation, while response rate $\geq 90\%$ did warrant further investigation. With an α risk of .05 and β of .1, 83 patients were needed. Ancillary control group was based on an exhaustive retrospective recruitment of patients with pretransplant DSAs fulfilling inclusion criteria during the same period as the BELACOR group.

Analysis was performed according to the intent-to-treat principle. Categorical data are given as number (%), and continuous data are given as mean (SD) or median (quartile 1-quartile 3) as appropriate. Main and secondary endpoint analyses were based on modified intent-to-treat analysis including all patients except for early allograft loss (<7 days). Incidences of acute ABMR, TCMR, death, and allograft loss were expressed by using survival rate and 95% confidence interval (CI) according Kaplan-Meier methods. Survival rates and curves were compared according to group by using the log-rank test. Preformed DSA outcome, dnDSA frequency, histological data, and serious adverse events (SAEs) were expressed by using binomial proportions and 95% CI. Evolution analysis of preformed DSAs within the first year after transplant (before transplant, M3, and M12) used linear or logistic mixed models including repeated data.

Incidence and evolution of dnDSAs and histological data within the first year after transplant (M3 and M12) were analyzed by using the same methodology. Baseline characteristics, binary secondary endpoints (new-onset diabetes, CMV viremia, BK viremia) or continuous secondary endpoints (eGFR, proteinuria, and SAEs) were compared between groups. No interim analysis was planned.

The means and the proportion were compared by using Student *t* test or the Mann-Whitney *U* test and the χ^2 test or Fisher exact test. Paired means and proportions were compared by using the Wilcoxon signed-rank test and McNemar test. Values of $P < .05$ were considered statistically significant, and all tests were 2-sided. All analyses were performed using STATA version 15.0 (StataCorp, College Station, TX).

3 | RESULTS

3.1 | Patient characteristics

Fifty-one patients fulfilling the inclusion criteria were included in the BELACOR trial between September 2014 and September 2016, and 76 patients were included in the control group between

January 2013 and March 2017. The final sample size was finally reduced because the prespecified sample size of the belatacept group was not reached at the end of the scheduled inclusion period. The observed ABMR rate was lower than expected (0%; 95% CI 0%-7.25%). Therefore, despite the lower sample size than expected, the a posteriori power was satisfactory (90%). A flowchart of the patients included in the study is presented in Figure 1. In both groups, 2 patients were excluded before 1 week posttransplant because of allograft nephrectomy (vascular thrombosis), leading to 49 and 74 patients for the main modified intent-to-treat analysis in the BELACOR group and the control group, respectively. In the control group, 5 patients died within the first year after transplant, leading to 72 patients at the M3 follow-up point and 69 patients at the M12 follow-up point. Demographic and transplant characteristics in both groups are depicted in Table 1. Recipients and donors characteristics at the time of transplant were similar except for significantly more isolated class II anti-HLA DSA antibodies in the control group ($P = .02$) and more association of class I and class II in the control group ($P = .002$). Median class I and class II MFI_{max} values of preformed DSAs detected within 1 year before transplant were 957 (740-1911) and 1140 (753-1419), respectively, in the BELACOR

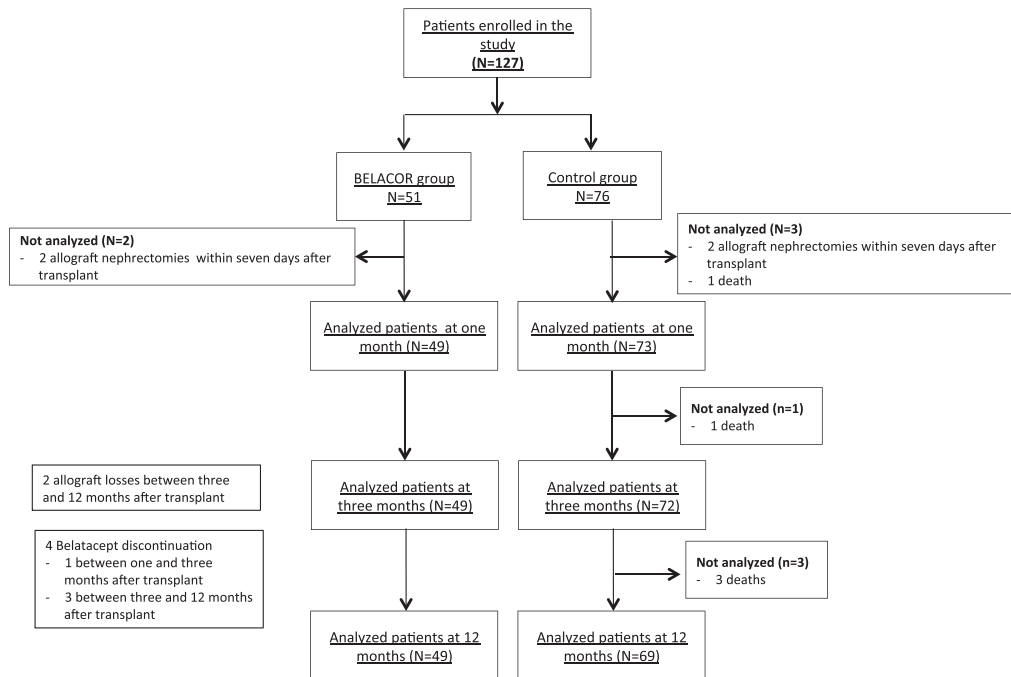


FIGURE 1 Flowchart of the patients included in the study. Fifty-one patients fulfilling inclusion criteria were included in the BELACOR trial between September 2014 and September 2016 and 76 patients were included in the control group between January 2013 and March 2017. In both groups, 2 patients were excluded before 1 week after transplant because of allograft nephrectomy (vascular thrombosis) leading to 49 patients and 74 patients for the main modified intent-to-treat analysis in the BELACOR group and the control group, respectively

TABLE 1 Patient and recipient characteristics

Variables	BELACOR group	Control group	P value ^a
Recipients, n	49	74	
Age, y, mean ± SD	51 ± 15	53 ± 14	.47
Sex, female, n (%)	15 (31)	28 (38)	.41
Dialysis, n (%)	41 (82)	65 (88)	.51
Dialysis duration, y, median [IQR]	3.6 [2.2-6.1]	4 [2.4-6.3]	.60
Initial nephropathy			
Immunological disease ^b , n (%)	9 (19)	18 (24)	
Nonimmunological disease ^c , n (%)	29 (59)	41 (56)	.74
Undetermined, n (%)	11 (22)	15 (20)	
HIV positive	4 (8)	3 (4)	.44
HCV negative	1 (2)	1 (1)	1.00
Donor			
Age, years, mean ± SD	57 ± 16	57 ± 14	.94
Living donor, n (%)	3 (6)	12 (16)	.09
Deceased donor, n (%)	46 (94)	62 (84)	
Sensitization			
Blood transfusions, n (%)	11 (22)	37 (50)	.002
Pregnancy, n (%)	10 (20)	24 (32)	.14
cPRA ^d %, median [IQR]	46 [27-72]	53 [12-79]	.74
>1 transplant, n (%)	4 (8)	12 (16)	.19
Anti-HLA donor-specific antibodies, n (%)			
Class I, n (%)	21 (43)	31 (42)	.92
Class II, n (%)	15 (31)	38 (51)	.02
Class I and class II, n (%)	13 (26)	5 (7)	.002
Crossmatch			
Flow cytometry, n	3	—	
B-crossmatch	1 (20)	—	
T-crossmatch	0 (0)	—	
Lymphocytotoxicity, n	48	—	
B-crossmatch	2 (4)	—	
T-crossmatch	0 (0)	—	
Kidney transplant			
Cold ischemia time, hours, median [IQR]	18 [14-20]	17 [15-24]	.52

HCV, hepatitis C virus.

^aComparison of secondary endpoints between the BELACOR group and control group χ^2 test or Fisher exact test for categorical variables and the Student t-test or Mann-Whitney U test for quantitative variables.

^bImmunological disease includes IgA nephropathy, Wegener granulomatosis, membranous nephropathy, focal and segmental glomerular sclerosis, HIV associated nephropathy, and systemic lupus.

^cNonimmunological disease includes uropathy, nephroangiosclerosis, autosomal dominant polycystic kidney disease, diabetic glomerulopathy, sickle cell disease, and tubulointerstitial kidney disease.

^dCalculated PRA.

group (Table 2). Among those, 19 (37%) patients presented with MFImax >1000 and 32 (63%) presented with MFImax <1000. Distribution of DSAs in the BELACOR group was 34 for class I (69%) and 28 for class II (57%), and for class II-positive DSAs, 5 (17%) patients have DP antibodies. In the control group, class I and class II MFImax values of preformed DSAs were similar to the values of the BELACOR group ($P = .12$ and $P = .72$, respectively; Table 2).

3.2 | Primary and secondary endpoints

Follow-up characteristics in both groups are presented in Table 3. In the BELACOR group, no patients exhibited clinical or subclinical acute ABMR in either for-cause or protocol kidney allograft biopsies performed at M3 and M12; the rate of clinical or subclinical acute ABMR was 0% (95% CI 0%-7.25%). In the control group, 4 patients

TABLE 2 Performed and de novo anti-HLA donor-specific antibodies (DSAs) evolution within the first year after transplant

Variables	Peak serum within 1 year before transplant			Month 3			Month 12		
	BELACOR group	Control group	P value ^a	BELACOR group	Control group	P value ^b	BELACOR group	Control group	P value ^c
Patients, n	49	74	—	49	72	—	49	69	—
Available, n (%)	49 (100)	74 (100)	—	49 (100)	71 (99)	—	49 (100)	68 (99)	—
Performed DSAs, patients, n (%)	49 (100)	74 (100)	—	21 (43)	27 (38)	—	20 (41)	24 (35)	—
Class I, n (%)	34 (69)	36 (49)	.03	16 (76)	7 (26)	.26	11 (55)	4 (17)	.35
Number									
1, n (%)	24 (71)	27 (75)		9 (56)	6 (85)		7 (64)	4 (100)	
2, n (%)	8 (23)	7 (19)		2 (13)	0 (0)		3 (27)	0 (0)	
3, n (%)	2 (6)	1 (3)	.97	1 (6)	1 (14)	.03	1 (9)	0 (0)	.33
4, n (%)	0 (0)	0 (0)		4 (25)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
5, n (%)	0 (0)	1 (3)		0 (0)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
Median [IQR]	1 [1-2]	1 [1-1.5]	.97	1 [1-3.5]	1 [1-1]	.03	1 [1-2]	1 [1-1]	.33
Mean fluorescence intensity (MFI) max, median [IQR]	957 [740-1911]	967 [708-1350]	.12	1118 [620-2497]	887 [677-940]	.12	1243 [837-1859]	785 [721-1837]	.88
Class II, n (%)	28 (57)	43 (62)	.46	14 (67)	21 (78)	.45	14 (70)	22 (92)	.56
Number									
1, n (%)	19 (68)	33 (77)		10 (71)	20 (95)		9 (64)	18 (82)	
2, n (%)	6 (21)	10 (23)		0 (0)	1 (5)		4 (29)	3 (14)	
3, n (%)	3 (11)	0 (0)	.15	2 (14)	0 (0)	.06	1 (7)	1 (5)	.77
4, n (%)	0 (0)	0 (0)		1 (7)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
5, n (%)	0 (0)	0 (0)		1 (7)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	
Median [IQR]	1 [1-2]	1 [1-1]	.15	1 [1-3]	1 [1-1]	.06	1 [1-2]	1 [1-1]	.77
MFI max, median [IQR]	1140 [753-1419]	795 [623-1111]	.72	1288 [776-2300]	1081 [754-1506]	.90	1716 [1235-2735]	903 [723-1439]	.46
De novo DSAs, patients, n (%)	—	—		7 (14)	15 (20)	.45	7 (14)	19 (28)	.50
Class I, n (%)	—	—		6 (86)	6 (40)	.07	2 (29)	6 (32)	.62
Number									
1, n (%)	—	—		1 (17)	5 (83)		2 (100)	4 (67)	
2, n (%)	—	—		3 (50)	1 (17)		0 (0)	2 (33)	
3, n (%)	—	—		2 (33)	0 (0)		0 (0)	0 (0)	

(Continues)

TABLE 2 (Continued)

Variables	Peak serum within 1 year before transplant			Month 3			Month 12			P value ^f
	BELACOR group	Control group	P value ^a	BELACOR group	Control group	P value ^b	BELACOR group	Control group	P value ^c	
Median [IQR]	—	—	—	2 [2-3]	1 [1-1]	.001	1 [1-1]	1 [1-2]	.007	
MFI _{max} , median [IQR]	—	803 [603-1056]	<.001	1700 [1516-1890]	803 [603-1056]	<.001	942 [643-1240]	729 [652-851]	.009	
Class I, n (%)	—	14 (93)	.86	6 (86)	14 (93)	.86	6 (86)	17 (90)	.12	
Number										
1, n (%)	—	10 (72)		3 (50)	10 (72)		5 (83)	14 (82)		
2, n (%)	—	3 (21)		1 (17)	3 (21)		1 (17)	3 (18)		
3, n (%)	—	0 (0)		1 (17)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		
4, n (%)	—	1 (7)		0 (0)	1 (7)		0 (0)	0 (0)		
5, n (%)	—	0 (0)		1 (16)	0 (0)		0 (0)	0 (0)		
Median [IQR]	—	1 [1-2]	.08	1.5 [1-3]	1 [1-2]	.08	1 [1-1]	1 [1-1]	.33	
MFI _{max} , median [IQR]	—	784 [563-1417]	.05	1066 [595-2796]	784 [563-1417]	.05	1586 [685-2735]	973 [659-1864]	<.001	

^aComparison of preformed DSAs between the BELACOR and the control group at month 0 (mixed linear or logistic model).

^bComparison of preformed DSA and dnDSA evolution between day 0 and M3 in the BELACOR group vs the control group (mixed linear or logistic model).

^cComparison of preformed DSA evolution and dnDSA between M3 and M12 in the BELACOR group vs the control group (mixed linear or logistic model).

TABLE 3 Follow-up characteristics

	BELACOR group	Control group	P value ^a
3-month follow-up			
Patients, n	49	72	—
Estimated glomerular filtration rate (eGFR), mL/min/1.73 m ² , median [IQR]	56 [43-67]	52 [40-67]	.48
Proteinuria:creatinine ratio, mg/mmol, median [IQR]	21 [13-40]	14 [10-28]	.03
12-month follow-up			
Patients, n	49	69	—
New-onset diabetes, n (%)	4 (8)	6 (8)	1.00
Cytomegalovirus viremia, n (%)	7 (14)	3 (4)	.09
BK viremia, n (%)	12 (24)	7 (10)	.03
eGFR, mL/min/1.73 m ² , median [IQR]	53 [39-67]	49 [37-66]	.67
Proteinuria:creatinine ratio, mg/mmol, median [IQR]	21 [15-47]	12 [5-24]	<.001

^aComparison of secondary endpoints between the BELACOR group and the control group χ^2 test or Fisher exact test for categorical variables and the Student t-test or Mann-Whitney U test for quantitative variables.

presented with clinical and subclinical ABMR; the rate was 5.81% (2.22%-14.77%). No difference has been observed between the 2 groups ($P = .12$) (Figure 2A).

After 12 months, in the BELACOR group, no patient died (death rate 0% [0%-7.25%]) and 2 allograft losses were reported (allograft loss rate 5.6% [1.4%-21.4%]). Patient and allograft survival rates in the BELACOR group at 1 year were 100% and 95.4%, respectively.

Causes of allograft loss were 1 thrombotic microangiopathy recurrence 3 months after transplant and 1 plasma cell-rich acute rejection 4 months after transplant. In the control group, 5 patients died (death rate 6.78% [2.88%-15.52%]) and none had lost their allograft (allograft loss rate 0% [0%-4.86%]). Causes of deaths were hemorrhagic shock in 3 patients, acute respiratory distress syndrome in 1 patient, and unknown in 1 patient. The incidence rates for death

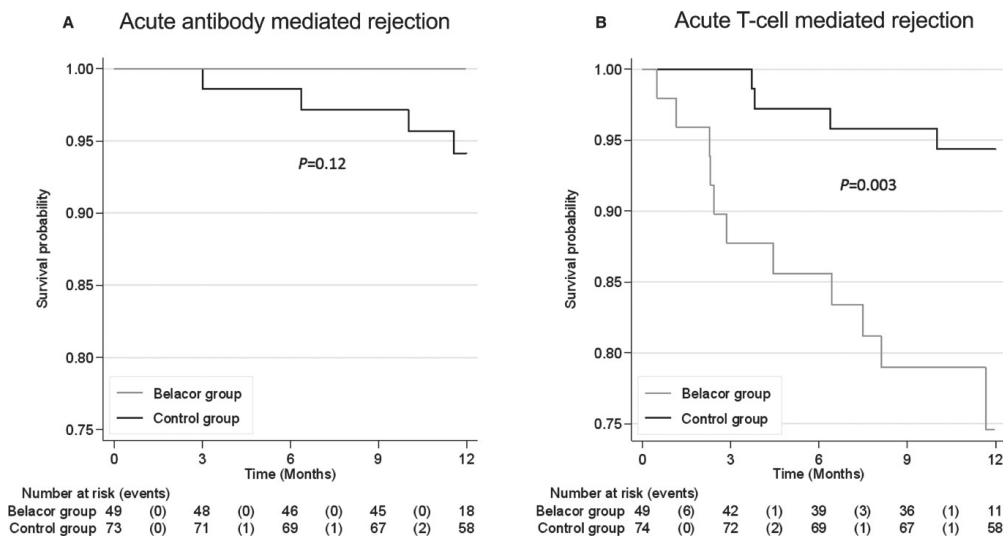


FIGURE 2 A, Preformed class I and class II donor-specific antibody (DSA) outcomes (maximum mean fluorescence intensity [MFI_{max}]) in the BELACOR group; B, preformed class I and class II DSA outcomes (MFI_{max}) in the control group. In the BELACOR group (2.A), class I and class II MFI_{max} decreased significantly between 1 year before transplant peak and 12 months after transplant (-822 [-1595 to -595], $P < .001$, and -647 [-836 to 0], $P = .002$, respectively). In the control group (2.B), class I and class II MFI_{max} decreased significantly between 1 year prior transplant peak and 12 months after transplant (-888 [-1233 to -638], $P < .001$, and -508 [-786 to 83], $P = .009$), respectively)

and allograft loss were similar for the 2 groups ($P = .07$ and $P = .05$, respectively) (Figure 3).

After 3 and 12 months, eGFR was similar in the 2 groups ($P = .48$ and $P = .67$, respectively), while proteinuria:creatinine ratio was significantly lower in the control group ($P = .03$ and $P < .001$, respectively). However, those values remained clinically insignificant.

In the BELACOR group, at 12 months, 12 episodes of clinical and subclinical acute TCMR including borderline were reported in 11 patients. Acute TCMR were grade IA in 6 patients, grade IB in 1 patient, grade IIA in 1 patient, and borderline changes in 3 patients. One patient presented with 2 episodes of acute TCMR within 12 months after transplant. Median delay of acute TCMR was 0.35 (0.19-0.62) years after transplant. Incidence was 25.4% (14.5%-42.4%). All patients were treated with high-dose steroids. Thymoglobulin was used in 5 (42%) patients. In the control group, 4 episodes of clinical and subclinical TCMR were reported in 4 patients. Acute TCMR were grade IIA in 1 patient, and borderline changes occurred in 3 patients. Median delay of acute TCMR was 0.42 (0.31-0.68) year after transplant. Incidence of acute TCMR was significantly lower in the control group: 5.64% (2.15%-14.33%); $P = .003$. All patients were treated with high-dose steroids.

Histological analysis on protocol biopsies performed at M3 and M12 are depicted in Table 4. At 3 months, in the BELACOR group, 2 patients presented with acute TCMR grade IA, and in the control group, 2 patients presented with acute borderline changes. At 12 months, microvascular inflammation including isolated glomerulitis grade 1 and isolated peritubular capillaritis grade 1 were found in 1 patient and 3 patients, respectively, in the BELACOR group. In the control group, microvascular

inflammation was depicted in 4 patients. No transplant glomerulopathy was observed in any groups. No significant difference in kidney allograft biopsies data was observed between the 2 groups at any time.

The number of patients displaying disappearance of class I preformed DSAs was similar in the 2 groups (27/34 [74%] and 23/28 [82%]; $P = .91$ in the BELACOR and control groups, respectively), while significantly more patients displaying a complete disappearance of class II DSAs were observed in the BELACOR group (29/36 [81%] and 18/43 [42%]; $P = .001$ in the BELACOR and control groups, respectively). Class I and class II MFI_{max} between 1 year prior transplant peak and 12 months after transplant decreased significantly in both groups: -822 (-1595 to -595 , $P < .001$) and -647 (-836 to 0 , $P = .002$), respectively, in the BELACOR group and -888 (-1233 to -638 , $P < .001$) and -508 (-786 to 83 , $P = .009$), respectively, in the control group (Figure 4). The dip MFI_{max} was similar in both groups either in class I ($P = .86$) or in class II ($P = .31$). Preformed DSA evolution within the first year after transplant (number, MFI_{max}) was similar for the 2 groups (Table 2). The dnDSA incidence was higher within 12 months after transplant in the control group with 7 (14%) patients in the BELACOR group and 19 (28%) in the control group ($P = .08$). Evolution of dnDSAs between M3 and M12 is presented in Table 2. Class I dnDSA number rose significantly more in the control group than in the BELACOR group ($P = .007$). Class I dnDSA MFI_{max} decreased significantly more in the BELACOR group between M3 and M12 ($P = .009$), while class II MFI_{max} decreased significantly more in the control group ($P < .001$); however, those values remained in the same clinical ranges.

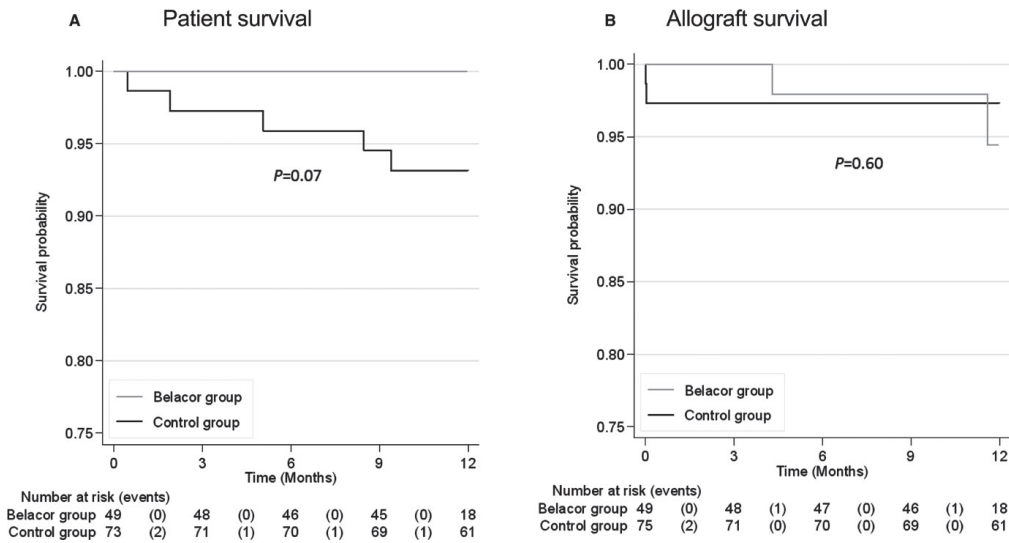


FIGURE 3 A, Clinical and subclinical antibody-mediated rejection (ABMR) within 12 months after transplant in both groups (Kaplan-Meier analysis); B, clinical and subclinical acute T cell-mediated rejection (TCMR) within 12 months after transplant in both groups (Kaplan-Meier analysis). Rate of clinical or subclinical acute ABMR was similar in both groups (3.A) (0% [0%-7.25%] in the BELACOR group and 5.81% [2.22%-14.77%] in the control group; $P = .12$). Rate of clinical and subclinical acute TCMR was significantly higher in the BELACOR group (3.B) (25.4% [14.5%-42.4%] vs 5.64% [2.15%-14.33%] in the control group; $P = .003$)

TABLE 4 Kidney allograft biopsy data (month 3 and month 12)

Variables	Month 3			Month 12		
	BELACOR group	Control group	P value ^a	BELACOR group	Control group	P value ^b
Patients, n	49	72		49	69	
Biopsy specimens available, n (%)	47 (96)	64 (89)	.12	44 (90)	50 (72)	.60
Cause of biopsies						
Systematic biopsy	41 (87)	—		42 (95)	—	
For-cause biopsy	6 (13)	—		2 (5)	—	
Acute rejection						
Antibody-mediated rejection	0 (0)	2 (3)	.85	0 (0)	3 (5)	.97
T cell-mediated rejection	2 (4)	2 (3)	—	0 (0)	1 (2)	—
Grade IA	2 (100)	—		0 (0)	—	
Grade IB	0 (0)	—		0 (0)	—	
Grade IIA	0 (0)	—		0 (0)	—	
Grade IIB	0 (0)	—		0 (0)	—	
Grade III	0 (0)	—		0 (0)	—	
Acute primary lesions						
Glomerulitis, n (%)	2 (4)	2 (3)	—	1 (2)	2 (4)	—
Grade, 1/2/3	2/0/0	1/1/0		1/0/0	1/0/1	
Peritubular capillaritis, n (%)	2 (4)	1 (2)	—	3 (7)	2 (4)	—
Grade, 1/2/3	2/0/0	1/0/0		3/0/0	0/1/1	
Interstitial inflammation, n (%)	6 (14)	1 (2)	.04	2 (5)	1 (2)	.37
Grade, 1/2/3	3/2/1	1/0/0		2/0/0	1/0/0	
Tubulitis, n (%)	8 (17)	4 (6)	.10	3 (7)	6 (12)	.08
Grade, 1/2/3	6/2/0	4/0/0		1/2/0	5/1/0	
Vasculitis, n (%)	1 (2)	1 (2)	—	0 (0)	0 (0)	—
Grade, 1/2/3	0/1/0	1/0/0		0/0/0	0/0/0	
Thrombotic microangiopathy	2 (5)	—	—	1 (2)	—	—
Chronic primary lesions						
Chronic glomerulopathy, n (%)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)	—
Interstitial fibrosis, n (%)	13 (30)	32 (50)	.04	19 (43)	32 (65)	.87
Grade, 1/2/3	12/1/0	29/2/1		14/4/1	22/8/2	
Tubular atrophy, n (%)	8 (17)	18 (28)	.16	21 (48)	27 (55)	.51
Grade, 1/2/3	8/0/0	16/1/1		17/3/1	22/5/0	
Vascular						
cv, n (%)	16 (34)	22 (34)	.97	21 (48)	16 (33)	.27
Grade, 1/2/3	13/1/2	18/3/1		8/10/3	11/4/1	
ah, n (%)	21 (45)	28 (44)	.84	16 (36)	19 (39)	.59
Grade, 1/2/3	16/5/0	26/2/0		15/1/0	13/5/1	
C4d positive, n (%)	2 (4)	0 (0)	—	1 (2)	2 (4)	—
Grade, 1/2/3	2/0/0	0/0/0		0/0/1	1/1/0	

^aComparison of kidney allograft biopsies data in the BELACOR group vs control group at M3 (mixed linear or logistic model).

^bComparison of evolution of kidney allograft biopsies data between M3 and M12 in the BELACOR group vs control group (mixed linear or logistic model).

3.3 | Safety and tolerability

In the BELACOR group, 82 SAEs were reported in 31 (63%) patients. In the control group, 172 SAEs were reported in 48 patients

(Table 5). Median delay after transplant was significantly lower in the control group (0.25 [0-0.5] year) than in the BELACOR group (0.31 [0.16-0.66] year) ($P = .003$). Investigators considered 20 (24%) episodes as treatment (belatacept) related. Patients in the control

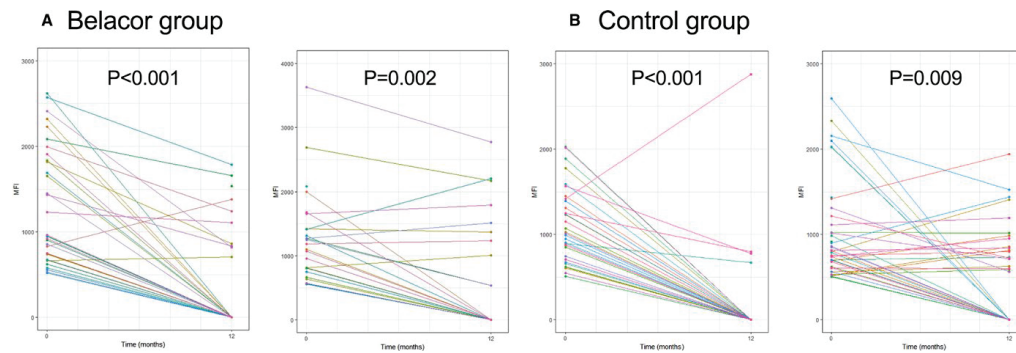


FIGURE 4 Patient (A) and kidney allograft (B) survival within 12 months in both groups (Kaplan-Meier analysis). Patient survival within 12 months after transplant (A) was similar in both groups: death rate in BELACOR group was 0% [0%-7.25%] and in the control group 6.78% [2.88%-15.52%] ($P = .07$). Allograft survival within 12 months after transplant (B) was also similar in both groups with an allograft loss rate in the BELACOR group of 5.6% [1.4%-21.4%] and in the control group 0% [0%-4.86%] ($P = .05$) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

group presented with significantly more infections ($P = .008$) and cardiovascular disorder ($P = .003$), while patients in the BELACOR group presented with significantly more BK viremia and blood and pulmonary disorders ($P = .03$, $P = .01$, and 0.005 , respectively) (Tables 3 and 5). One localized B cell posttransplant lymphoproliferative disorder occurred 12 months after transplant in 1 EBV-positive recipient in the BELACOR group. Evolution with specific treatment was favorable.

4 | DISCUSSION

We have provided here results of the first single-arm clinical trial with an ancillary control group built retrospectively aiming to determine the impact of a belatacept-based immunosuppressive strategy on 12M kidney transplant outcome in recipients with preformed DSA MFI_{max} 500-3000 within 1 year before transplant.

Our primary objective was to assess the response rate defined by no acute ABMR within 12 months and we did not observe any episode of acute ABMR within 12 months after transplant in patients treated with belatacept. It has been established that acute ABMR incidence directly correlates with DSA MFI_{max} before transplant and rises significantly from 0.9% in MFI_{max} <465 to 18.7% in those with MFI_{max} 466-3000.¹⁷ We provide evidence that belatacept could significantly reduce such incidence in patients exhibiting peak preformed DSAs within the same range without any episodes of clinical or subclinical acute ABMR in both for-cause or protocol biopsies performed 3 and 12 months after transplant. Incidence of ABMR in the control group was lower than expected and comparable to the that in the BELACOR group. The absence of difference between the BELACOR and the control group may indicate whether there was an absence of difference regarding ABMR or a lack of power for detecting a small difference in the direction of higher ABMR in the control group. Indeed, the observed sample size of the 2 groups

($n = 49$ vs $n = 76$) could be considered as sufficient (ie, with a power of at least 80%) to detect a statistical difference between groups of at least 15% in ABMR occurrence. However, there is a deep lack of available data to confirm the study cited above and to address the question specifically for patients exhibiting DSAs with MFI between the detection threshold and 1000. Risk of acute ABMR in those patients remains hard to judge. As half of patients have low-titer DSAs, we could not exclude false-positives. However, DSAs with low MFI without any sensitized event have been detected in 63% of a large cohort of male blood donors without risk of immunization and are called "natural" alloantibodies of unknown etiology.¹⁸ Causes of antibodies could include cross-reactivity to epitopes of several bacterial, fungal, or viral antigens and autoreactivity against HLA antigens. Pathogenicity of those antibodies is now well recognized with a significant higher rate of acute ABMR within 1 year after transplant.¹⁹

We observed in both groups a significant decrease in class I and class II DSA MFI_{max} within 12 months after transplant. Surprisingly, a significantly higher number of patients displaying a complete disappearance of class II DSAs was observed in the BELACOR group compared with the control group. We previously reported in kidney transplant recipients from the BENEFIT trials an increasing proportion and absolute number of CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells, known to be associated with operational tolerance.²⁰ Moreover, we recently showed that belatacept may uniquely control B cell responses by modulating both their antigen-presenting capacities leading to the impairment of T follicular helper-B cell crosstalk and the production of antibodies by effector B cells.²¹ These *in vivo* data were obtained in kidney transplant recipients without pretransplant DSAs treated with belatacept.²¹ Whether the results observed in the BELACOR trial are related to the ability of belatacept to modulate memory B cell response remains to be established. In both groups, dnDSA incidence was higher than previously described,¹² although the incidence was higher in the control group compared with the BELACOR group. However, patients included in former studies exhibited a

TABLE 5 Serious adverse events

SAEs, patients	BELACOR group, n = 49	Control group, n = 74	P value
Patients, n (%)	31 (63)	48 (65)	.86
Number, n (%)	82 (100)	172 (100)	
Number per patient, median [IQR]	2 [1-3]	2.5 [1-4.5]	.09
Delay from transplant, year, median [IQR]	0.31 [0.16-0.66]	0.25 [0-0.5]	.003
Treatment related, n (%)	20 (24)	—	
SAE type			
Kidney allograft pyelonephritis, n (%)	24 (29)	44 (26)	.54
Acute T cell-mediated rejection, n (%)	12 (15)	4 (5)	.003
Infections, other, n (%)	4 (5)	29 (17)	.008
Pulmonary infection, n (%)	1 (1)	8 (5)	.28
New-onset diabetes after transplant, n (%)	3 (4)	17 (10)	.09
Acute kidney injury, n (%)	14 (17)	21 (12)	.29
Blood disorder, n (%)	4 (5)	0 (0)	.01
Cardiovascular disorder, n (%)	2 (2)	25 (14)	.003
Pulmonary disorder, n (%)	6 (7)	1 (1)	.005
Other, n (%)	12 (15)	27 (16)	.83
B cell posttransplant lymphoproliferative disorder	1 (1)	—	
Mediterranean Kaposi	1 (2)	—	

SAE, serious adverse event.

low immunological risk profile defined by no pretransplant DSAs and a low PRA. In low-immunological risk kidney allograft recipients, dnDSA incidence is up to 15% within 5 years.²² The patients included in both groups were all engrafted with pretransplant DSAs and are likely to exhibit a B cell memory response that could favor the occurrence of posttransplant dnDSAs.

We also observed a significantly higher incidence of acute TCMR with a higher number of steroid-resistant rejection leading to allograft loss in 1 case in the BELACOR group compared with the control group. Phase 3 clinical trials have already reported significantly

higher incidence and severity of acute TCMR in belatacept-treated patients with significantly better kidney allograft function compared with CNi-based therapy at the end of follow-up.⁹ However, <10% of acute rejections were steroid resistant.⁸ This higher acute TCMR incidence may be explained by susceptibility differences of immune cells to belatacept-inhibiting effects. Cytotoxic T memory lymphocytes do not express CD28 and are not dependent on this molecule for activation. Thus, it was recently shown that glucocorticoid-resistant cellular rejection occurring under belatacept was predominantly mediated by cytotoxic (CD8) memory T cells less susceptible to costimulatory blockade.²³ Alloreactive Th17 T cells have also been incriminated in this process, as they seemed resistant to belatacept inhibition in vitro and in vivo²⁴ or resulted from incomplete CD80/86 blockade at the tissue level.²⁵ The high incidence of acute TCMR observed in our cohort of pretransplant sensitized recipients is therefore not surprising because the proportion of cytotoxic memory T cells is likely to be higher in sensitized recipients.²⁶ This result highlights the potential interest already published of an immunosuppressive strategy combining CNIs and belatacept early after transplant (9 months), the high-risk period of acute TCMR, or switching CNIs to belatacept 6 months to 1 year after transplant in order to limit the incidence of T cell-mediated immune events in sensitized recipients and the development of dnDSAs.²⁷

The next remarkable finding was related to the different SAE profile observed in the 2 groups. Patients from the BELACOR group exhibited significantly less infection excluding kidney allograft pyelonephritis and less cardiovascular disorder. In contrast, we observed a higher proportion of patients with BK viremia compared with the control group. Surprisingly, a high incidence of BK viremia (72%) has also been reported in a retrospective cohort of kidney transplant recipients that combined belatacept and thymoglobulin induction.²⁸ This result is likely to be related to the association of belatacept and depletive induction strategy because the incidence of BK viremia in transplant recipients receiving belatacept and nondepletive induction strategy (basiliximab) was not significantly different than the incidence observed in different control groups treated with CNIs.²⁷ Such a hypothesis remains to be confirmed by a prospective analysis aiming to compare belatacept and CNIs with polyclonal induction therapy.

Our study has some limitations. Indeed, the prespecified sample size was not reached, but the low threshold of the 95% CI of the main endpoint (response rate) was higher than the prespecified threshold indicating a positive result. Second, the control group was retrospectively built. But patients included in the control group fulfilled the same inclusion criteria, were engrafted during almost the same period, and were followed in the same way as patients in the BELACOR group.

In conclusion, belatacept was not associated with an increased risk of acute ABMR and may be considered as immunosuppressive strategy in kidney allograft recipients with preformed DSAs exhibiting a mild MFI_{max} (500-3000). However, the incidence of acute TCMR was significantly higher with a significant proportion of steroid-resistant rejections, suggesting the potential benefit of CNIs in the early posttransplant period. Contrasting with previous results from phase 3 clinical trials, belatacept did not significantly prevent

the occurrence of dnDSAs within the first year after transplant in recipients with preformed DSA MFlmax (500-3000). Further prospective randomized studies are mandatory to confirm these encouraging preliminary results.

ACKNOWLEDGMENTS

The BELACOR trial was supported and funded by the Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP). The study was also conducted with the support of Bristol-Myers-Squibb. The authors are solely responsible for the final content and interpretation of this manuscript.

DISCLOSURE

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

REFERENCES

- Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin Immunol*. 2012;24(2):115-121.
- Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, et al. Antibody-mediated rejection due to preexisting versus. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1912-1923.
- Süsal C, Fichtner A, Tönshoff B, Mehrabi A, Zeier M, Morath C. Clinical relevance of HLA antibodies in kidney transplantation: recent data from the Heidelberg transplant center and the collaborative transplant study. *J Immunol Res*. 2017;2017:5619402.
- Stewart DE, Kucheryavaya AY, Klassen DK, Turgeon NA, Formica RN, Aeder MI. Changes in deceased donor kidney transplantation one year after KAS implementation. *Am J Transplant*. 2016;16(6):1834-1847.
- Sethi S, Choi J, Toyoda M, Vo A, Peng A, Jordan SC. Desensitization: overcoming the immunologic barriers to transplantation. *J Immunol Res*. 2017;2017:6804678.
- Jordan SC, Lorant T, Choi J, et al. IgG endopeptidase in highly sensitized patients undergoing transplantation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):442-453.
- Noël C, Abramowicz D, Durand D, et al. Daclizumab versus antithymocyte globulin in high-immunological-risk renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1385-1392.
- Larsen CP, Grinyó 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(12):1528-1535.
- Vincenti F. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2016;374(26):2600-2601.
- Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant*. 2005;5(3):443-453.
- Pearson TC, Trambley J, Odom K, et al. Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation*. 2002;74(7):933-940.
- Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2014;14(1):59-69.
- Young JS, Chen J, Miller ML, et al. Delayed cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4-immunoglobulin treatment reverses ongoing alloantibody responses and rescues allografts from acute rejection. *Am J Transplant*. 2016;16(8):2312-2323.
- Chen J, Yin H, Xu J, et al. Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am J Transplant*. 2013;13(9):2280-2292.
- Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 kidney meeting report: current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant*. 2017;17(1):28-41.
- Levey AS, Coresh J, Greene T, et al. Expressing the Modification of Diet in Renal Disease Study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. *Clin Chem*. 2007;53(4):766-772.
- Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1398-1406.
- Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee JH, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation*. 2008;86(8):1111-1115.
- Sicard A, Amrouche L, Suberbielle C, et al. Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology. *Am J Transplant*. 2014;14(1):193-201.
- Leibler C, Matignon M, Pilon C, et al. Kidney transplant recipients treated with belatacept exhibit increased naive and transitional B cells. *Am J Transplant*. 2014;14(5):1173-1182.
- Leibler C, Thiolat A, Hénique C, et al. Control of humoral response in renal transplantation by belatacept depends on a direct effect on B cells and impaired T follicular helper-B cell crosstalk. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(3):1049-1062.
- Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1157-1167.
- Kitchens WH, Haridas D, Wagener ME, et al. Integrin antagonists prevent costimulatory blockade-resistant transplant rejection by CD8(+) memory T cells. *Am J Transplant*. 2012;12(1):69-80.
- Krummey SM, Cheeseman JA, Conger JA, et al. High CTLA-4 expression on Th17 cells results in increased sensitivity to CTLA-4 coinhibition and resistance to belatacept. *Am J Transplant*. 2014;14(3):607-614.
- de Graav GN, Bergan S, Baan CC, Weimar W, van Gelder T, Hesselink DA. Therapeutic drug monitoring of belatacept in kidney transplantation. *Ther Drug Monit*. 2015;37(5):560-567.
- Poggio ED, Augustine JJ, Clemente M, et al. Pretransplant cellular alloimmunity as assessed by a panel of reactive T cells assay correlates with acute renal graft rejection. *Transplantation*. 2007;83(7):847-852.
- Adams AB, Goldstein J, Garrett C, et al. Belatacept combined with transient calcineurin inhibitor therapy prevents rejection and promotes improved long-term renal allograft function. *Am J Transplant*. 2017;17(11):2922-2936.
- Wojciechowski D, Chandran S, Yang JYC, Sarwal MM, Vincenti F. Retrospective evaluation of the efficacy and safety of belatacept with thymoglobulin induction and maintenance everolimus: a single-center clinical experience. *Clin Transplant*. 2017;31(9). <https://doi.org/10.1111/ctr.13042>

How to cite this article: Leibler C, Matignon M, Moktefi A, et al. Belatacept in renal transplant recipient with mild immunologic risk factor: A pilot prospective study (BELACOR). *Am J Transplant*. 2019;19:894-906. <https://doi.org/10.1111/ajt.15229>

Costimulatory blockade molecules and B-cell-mediated immune response: current knowledge and perspectives

Claire Leibler^{1,2,3,4}, Allan Thiolat^{2,4}, Rebecca A. Elsner³, Khalil El Karoui^{1,2}, Chloe Samson² and Philippe Grimbert^{1,2}

¹Service de Néphrologie et Transplantation, Pôle Cancérologie-Immunité-Transplantation-Infectiologie, Paris-Est Creteil, France; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U955, Equipe 21 and Université Paris-Est, Créteil, France; and ³Department of Immunology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

There is an urgent need for therapeutic agents that target humoral alloimmunity in solid organ transplantation. This includes sensitized patients with preformed donor-specific human leukocyte antigen antibodies and patients who develop *de novo* donor-specific antibodies, both of which are associated with acute and chronic antibody-mediated rejection and allograft loss. In the last decade, both experimental and clinical studies highlighted the major impact of costimulation molecules in the control of immune responses both in the field of transplantation and autoimmune disease. Although these molecules have been initially developed to control the early steps of T-cell activation, recent evidence also supports their influence at several steps of the humoral response. In this review, we aim to provide an overview of the current knowledge of the effects of costimulatory blockade agents on humoral responses in both autoimmune and allogeneic contexts. We first present the effects of costimulatory molecules on the different steps of alloantibody production. We then summarize mechanisms and clinical results observed using cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA4)-Ig molecules both in transplantation and autoimmunity. Finally, we present the potential interest and implications of other costimulatory family members as therapeutic targets, with emphasis on combinatorial approaches, for the optimal control of the alloantigen-specific humoral response.

Kidney International (2019) ■, ■-■; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.10.028>

KEYWORDS: acute rejection; co-stimulatory blockade; humoral response; lymphocytes

Copyright © 2019, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Correspondence: Philippe Grimbert, Service de Néphrologie et Transplantation, Pôle Cancérologie-Immunité-Transplantation-Infectiologie et unité Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U955, Centre Hospitalier Universitaire Henri Mondor and Université Paris-Est-Créteil, France. E-mail: philippe.grimbert@aphp.fr

⁴CL and AT contributed equally to this work.

Received 9 July 2018; revised 17 September 2018; accepted 18 October 2018

Kidney International (2019) ■, ■-■

Antibody-mediated rejection (AMR) is now a well-recognized major contributor to graft loss in kidney transplant recipients. It accounts for up to two-thirds of death-censored graft failures beyond the first year of transplantation and is the leading cause of late transplant failure.^{1,2} AMR is likely to occur in sensitized kidney allograft recipients with anti-human leukocyte antigen (HLA) donor-specific antibodies (DSAs) before and after transplantation.^{3,4} Although our understanding of the mechanisms behind DSA development is far from complete, pathogenesis as well as clinical and histological features of DSA-mediated graft injury have been more extensively analyzed during the last decade.⁵ Indeed experimental studies have shed light on the natural history of acute and chronic AMR.⁶ 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, following a breakdown of B-cell tolerance,⁷ nonpolymorphic autoantigens.⁸ Binding of circulating DSAs to directly accessible graft endothelial cells can trigger the activation of classical complement pathway, a central process in the pathophysiology of acute AMR.⁹ By contrast, the pathogenesis of chronic AMR appears to be mainly related to antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.¹⁰ Binding of the Fc fragment of DSA complexes to innate immune cells causes their activation and inflammation, leading to smoldering endothelial cell damage.¹¹ In turn, chronic vascular inflammation promotes the progressive development of typical vascular lesions, that is, transplant glomerulopathy, allograft vasculopathy, and lamination of the peritubular capillary basement membrane.¹²

Improving long-term graft survival by targeting various aspects of the humoral immune response is a major goal in modern transplantation. To prevent both acute and chronic AMR, *de novo* DSA synthesis needs to be prevented or limited. Currently, conventional immunosuppressive protocols involve a short-term induction therapy with basiliximab or thymoglobulin, followed by a life-long maintenance immunosuppression combining anticalcineurine, antiproliferative drugs such as mycophenolate mofetil or mammalian target of rapamycin inhibitors, and steroids. Although, these drugs target the different

1

signaling pathways leading to alloantibody production by B cells, around 15% to 30% of renal transplant recipients still develop *de novo* DSAs.^{13–16} Therefore they are not effective enough to inhibit *de novo* DSA production, and new strategies need to be defined.

Additionally, currently up to 30% to 40% of transplant candidates are already sensitized, limiting their donor options and putting them at a higher risk for AMR. Therefore, immunosuppressive protocols were tested to attempt to remove antibodies in sensitized allograft patients to expand their chance of receiving a compatible transplant and increasing graft survival.¹⁷ These included numerous attempts to boost conventional immunosuppression, or to inhibit or remove B cells, plasma cells (PCs), antibodies, or complement¹⁸ or a combination of these through the use of B-cell depleting agents (e.g., rituximab and anti-CD20), i.v. Ig, and plasmapheresis. Unfortunately, once DSAs are established, no current therapies can reliably reverse their pathogenic effects: DSA titers were incompletely reduced, and rebound of antibody production after treatment could be observed leading to an overall increased risk of AMR and graft loss in some patients. Moreover these controlled trials have used different treatment protocols and have been underpowered and of low quality.^{19,20} These results strengthened the need to identify new molecules and optimal immunosuppressive strategies to target humoral immune responses.

Recent findings have highlighted the major impact of costimulation (co-stim) molecules for the control of immune responses. Targeting the second signal of T-cell activation with co-stim blockade to inhibit activation, or checkpoint inhibitors to increase it, has been a revolutionary medical advance of the last decade. Unexpectedly, experimental data and clinical studies suggested co-stim molecules also play a large role in controlling humoral immune responses in both autoimmune and allogeneic settings. This review aims to describe immune mechanisms leading to DSA production and how co-stim blockade can modulate humoral immunity. We next consider clinical evidence for co-stim-mediated control of humoral immune responses in transplantation and autoimmune diseases with a focus on the first clinically released drug, cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA4)-Ig. Finally, we discuss the potential involvement of the individual family members and suggest original combinatory strategies to optimally control allogeneic humoral responses.

IMMUNE MECHANISMS LEADING TO DSA PRODUCTION: ROLE OF COSTIMULATORY MOLECULES

General mechanisms

DSAs are high affinity antibodies, typically IgG isotypes, mostly directed against donor HLA molecules. These characteristics imply that DSA generation results from a T-cell-dependent B-cell response. This type of humoral response, which primarily develops within secondary lymphoid organs (spleen or lymph nodes), involves 2 distinct events that are separated both spatially and temporally (Figure 1). Early events include, in parallel, the activation or priming of allogeneic T cells by dendritic cells and allogeneic B cells by the

antigen in the secondary lymphoid organs (i.e., lymph nodes and spleen).²¹ Both activated B and T cells then migrate to the border of B-cell follicles and T-cell zones, respectively, where they undergo cognate interactions. These interactions lead to the development of the germinal center (GC) response. GC B cells will cyclically increase their affinity to the antigen and expand oligo-clonally.^{22,23} At one point, memory B cells and long-lived PCs will be generated, but the exact signals that stop GC cycle and drive one or the other fate are unknown.²⁴

T follicular-B-cell crosstalk

T follicular helper cells (Tfh) are now recognized to play a major role in the development of humoral responses.^{25–27} Tfh are T helper cells specialized in helping GC B cells through cell-to-cell contact and the production of cytokines including interleukin-21 (IL-21). Their differentiation requires the transcription factor Bcl-6 and they can be defined by inducible costimulatory molecule (ICOS) expression with high CXC chemokine receptor-5 (CXCR5) and program death-1 (PD-1) expression.²⁸ Experimental models and human studies suggest that targeting Tfh, and particularly Tfh-B-cell crosstalk, might be fundamental to control *de novo* humoral immune responses in transplantation. In several nonhuman primate models, Kwun *et al.*^{29,30} showed that GC size and frequency were positively correlated with DSA production and incidence of humoral rejection. Studies of Tfh-B-cell crosstalk are limited in humans due to the difficulties to access human lymph nodes.^{31,32} Circulating blood subsets of “Tfh” were identified.³³ They share some, but not all, phenotypic characteristics with lymph node Tfh. These cells were found to express CXCR5, ICOS, and PD-1 but at a lower level than lymph node Tfh, and they do not express the transcription factor Bcl-6, known to be required for Tfh formation (in mice and humans).³⁴ They can also interact with B cells, secrete IL-21 *ex vivo*, and induce plasmablast differentiation and antibody secretion *in vitro*. The origins and role of this T-cell population are still debated, and whether they can directly reflect ongoing follicular Tfh-B-cell interactions remains to be fully determined. However, increased proportions of these circulating Tfh-like subsets were shown to precede seroconversion in human vaccination studies.³⁵ Chenouard *et al.*³⁶ recently showed that following kidney transplant, increased blood Tfh frequency preceded HLA sensitization in calcineurin inhibitor-treated patients. Conversely, operational-tolerant recipients, a unique and rare clinical situation in which kidney graft function is preserved without immunosuppression, displayed lower DSA incidence, lower frequencies, and lower functional ability of circulating Tfh compared with control graft patients.

Interestingly, 2 of the main markers used to identify and characterize Tfh functions, ICOS and PD-1, belong to the co-stim molecule family. ICOS is known to be critical for Tfh formation in mice,³⁷ and PD-1 was found to regulate the functional capacity of human blood Tfh.³⁸ This highlights

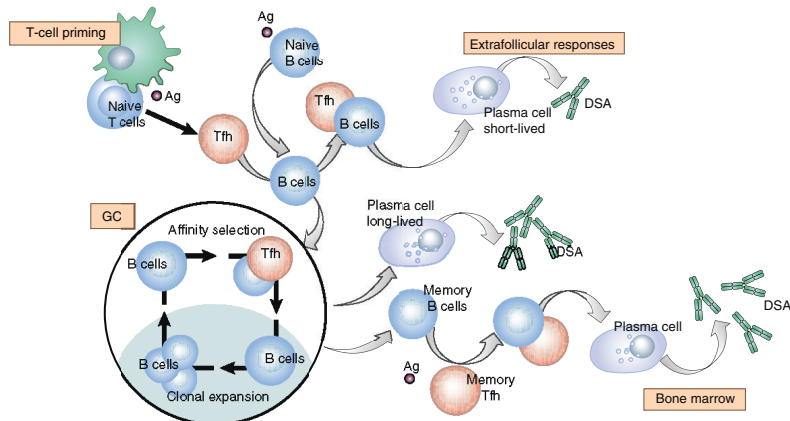


Figure 1 | Cellular mechanisms involved in antibody-mediated rejection. Antigen (Ag) recognition initiates priming of T cells and B cells. T cells begin to differentiate into T follicular helper cells (Tfh) as they move to the T-cell zone B-cell follicle border, where cognate T-B interactions lead to the development of the germinal center (GC). Two zones can be anatomically observed, the dark zone where B cells proliferate very rapidly and the light zone where Tfh-B-cell interactions are thought to primarily take place. Affinity maturation occurs in the GC in a cyclical manner alternating between mutating the B-cell receptor and acquiring Tfh help. Throughout this process, memory B cells and long-lived plasma cells are formed. DSA, donor-specific antibody.

that a better understanding of the function of co-stim molecules on human Tfh and their role in Tfh-B-cell crosstalk may be crucial for future therapies.

Role of co-stimulatory molecules in Tfh generation, Tfh-B cell crosstalk and B cell responses

Family of co-stim molecules. Co-stim molecules have historically been shown to be fundamental for T-cell priming by dendritic cells (DCs). They are a complex set of stimulatory and inhibitory molecules that are responsible for the fine-tuning of T-cell activation.³⁹⁻⁴¹ After antigen recognition and engagement of the T-cell receptor, the interaction of antigen-presenting cells (APCs) co-stim molecules with their ligands on T cells provides the additional signal required to fully achieve T-cell activation. CD40 on APC binds to its T-cell ligand CD40L, resulting in the up-regulation of B7 molecules (CD80/CD86) and other co-stim molecules on APC.⁴² CD28, which is constitutively expressed on T cells, then binds to its ligands CD80 and CD86 on APC leading to T-cell activation. Co-stim pathways also trigger the expression of inhibitory receptors that are responsible for turning off or shutting down the system to prevent uncontrolled activation. The inhibitory receptors share the same ligands as their stimulatory counterparts and thus the competition for ligands is a further mechanism of fine-tuning T-cell activation. For example, the inhibitory receptor CTLA4 is induced by T-cell activation and binds to the B7 molecules CD80 and CD86 on APC with higher affinity than to CD28. Thus its expression prevents further stimulatory CD28 ligation from the APC (T-cell-extrinsically) and produces a T-cell intrinsic inhibitory signal.

Role of co-stim molecules in Tfh generation and function. It has recently been proven that co-stim molecules also play an important role in the different steps of Tfh differentiation and

function (Figure 2a). Due to their complexity and involvement at different stages of this process (Figure 2b), the use of genetically deficient animal models was crucial to demonstrate their functions.

ICOS, a critical mediator of Tfh-cell generation and function. ICOS plays an important role at each stage of Tfh development and function. At an early stage, after DC priming, ICOS-ICOS ligand (ICOS-L) interactions participate in the up-regulation of Epstein-Barr virus-induced-2 leading to development of Tfh precursors.⁴³ Further chemokine receptor changes allow them to migrate to the B-cell follicle border.^{28,37,44} Interactions between ICOS on Tfh and ICOS-L on bystander B cells induce the activation of the proteasome inhibitor-3 kinase pathway, which is essential for Tfh localization in the GC.⁴⁵ There, B cells offer repeated antigen presentation and costimulation through ICOS to promote full development of Tfh cells by inducing expression of the transcription factor Bcl-6.³⁷ ICOS may also play a role in Tfh differentiation or survival by regulating the induction of the transcription factor c-Maf, potentially through expression of IL-21.^{46,47} In the GC, ICOS-L is responsible for the entanglement between Tfh and GC B cells, a crucial feature to select B-cell clones with the highest affinity for the antigen.⁴⁸ Therefore, in mice, ICOS plays an important role in multiple stages of humoral immunity. Accordingly in humans, patients with ICOS deficiency have severely damaged GC and reduced blood CXCR5⁺ CD45RO⁺ memory cells. Therefore, ICOS signaling is also likely to play a fundamental role for Tfh differentiation in humans.⁴⁹

PD-1, a complex role in Tfh function. PD-1 is another key marker that defines Tfh phenotype. On non-Tfh T cells, PD-1 is a marker of exhaustion. PD-1 signaling down-regulates the

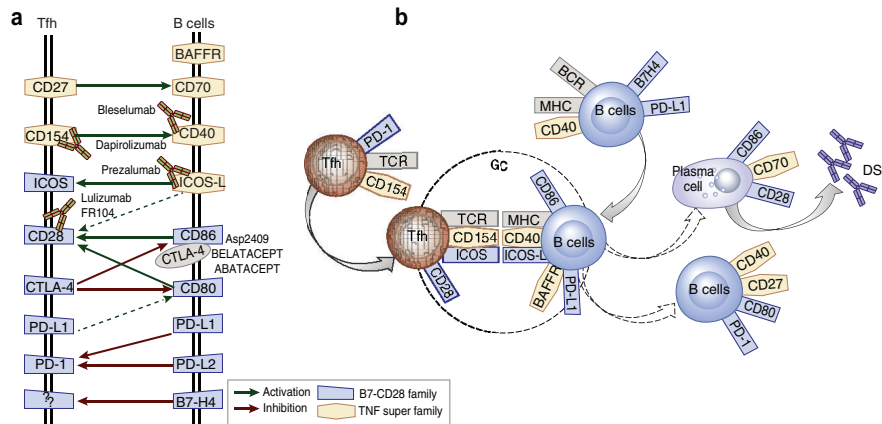


Figure 2 | Co-stimulatory molecules. (a) Co-stimulatory molecule expression and interaction patterns between T follicular helper (Tfh) and B cells are shown to illustrate the complexity of their interactions. Red molecules indicate tumor necrosis factor superfamily, and blue molecules are B7 family members. Green arrows indicate stimulatory interactions and red indicate inhibitory interactions. Some drugs that target these interactions are also shown. (b) Key molecules of the germinal center (GC) Tfh-B-cell interactions are depicted. An emphasis is made on the timing of expression of these molecules through the different stages of B-cell differentiation leading to DSA production. BAFFR, B-cell-activating factor receptor; BCR, B cell receptor; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen-4; DSA, donor-specific antibody; ICOS, inducible T-cell costimulator; ICOS-L, ICOS ligand; MHC, major histocompatibility complex; PD-1, program death 1; PD-L1, PD-1 ligand; TCR, T-cell receptor.

activation of effector T cells by dampening CD28 signaling.^{50,51} However, the precise role of PD-1 in Tfh homeostasis and function is more complex. Good-Jacobson *et al.*⁵² showed that PD-1-deficient mice displayed increased number of Tfh with decreased abilities to secrete cytokines (IL-4 and IL-21). On the B-cell side, PD-1-deficient mice had increased GC B-cell mortality, decreased number of PCs, and overall decreased Ig production. However the remaining PC produced higher affinity antibodies than in PD-1-sufficient mice.⁵² Recently, Shi *et al.*⁵³ studied why PD-1 represses Tfh formation while it is also highly expressed on Tfh. They found that PD-1 signaling helps to restrain Tfh in the GC by repressing CXCR3 expression that would distract Tfh and potentially allow them to migrate out of the GC.⁵³ Thus PD-1 functions in Tfh formation and GC localization.

CD28-CTLA4, additional players in regulating Tfh differentiation. The role of CD28 for T-cell activation has been known for a long time. Recently it is also has been found that continuous CD28 expression is required for Tfh differentiation.⁵⁴ Along parallel lines, CTLA4, the inhibitory competitor of CD28, restrains Tfh responses and inhibits their B-cell stimulatory function. Specifically, deletion of CTLA4 on Tfh increased GC B cells and serum antibody titers.^{55,56}

B-cell intrinsic role of co-stimulatory molecules. Co-stimulatory molecules also play a role in regulating B-cell responses directly. CD40 signaling in B cells, triggered by its interaction with CD40L on Tfh, is a well-known example of a co-stimulatory pathway directly influencing B-cell fate by a cell-intrinsic mechanism. The combinatory signals of CD40 and IL-21 in activated B cells induce the expression of Bcl-6, a major

transcription factor required in GC B cells.⁵⁷ In GC B cells, Luo *et al.*⁵⁸ recently showed that CD40 ligation in conjunction with B-cell receptor signaling was required to induce c-Myc, a major transcription factor for GC B-cell maintenance and survival. Moreover, it was demonstrated that CD40 was required on B cells intrinsically in the generation of antigen-specific GC B cells, high-affinity class-switched antibody production, and also for antigen-specific Tfh formation, suggesting that CD40-CD40L signaling is also bidirectional.⁵⁹⁻⁶¹ Furthermore, CD40 signaling intrinsically regulates B-cell homeostatic maintenance.⁶² In contrast to GC B cells, CD40 ligation alone is sufficient to activate naïve B cells *in vitro*.

Although the CD28-CTLA4/CD80-CD86 pathway has been thought to mainly control T-cell activation, recent evidence suggests that they might also play a direct role on B cells. Both long-lived PCs, that survive in the bone marrow and participate in sustaining long-term antibody levels, and short-lived PCs, reexpress CD28 in mice and humans,⁶³ due to the loss of the B-cell master regulator Pax5 during terminal differentiation.⁶⁴ Two teams have independently shown a role for CD28 in PC function. However, its exact function is still debated. Rozanski *et al.*⁶⁵ showed that specific CD28 deficiency in the B-cell lineage was sufficient to decrease antigen-specific IgG titers by 10-fold after immunization, even with adequate T-cell help. They further showed a PC-intrinsic function of CD28 that supports the survival of long-lived PC in the bone marrow leading to increase antibody titers⁶⁵ through a Blimp-1 dependent mechanism.⁶⁶ However, Njau *et al.*⁶⁷ found increased frequencies of PC and antibody production in CD28-deficient PC.

The current evidence supports that targeting co-stim molecules likely acts both on the T cells as well as on B cells (including PCs) to modulate the Tfh–B-cell crosstalk. Thus, further development of strategies targeting these molecules will be important to further our ability to modulate humoral responses.

CO-STIM BLOCKADE IMMUNE MECHANISMS ON B-CELL RESPONSES: THE CTLA4-IG EXPERIENCE

Drugs targeting co-stim receptors have been developed in the past 2 decades to prevent T-cell-mediated allograft rejection, or to control the activation of autoreactive T cells in auto-immune settings (Figure 3). A thorough compilation of the relevant co-stim molecules, drugs that target them, and clinical trials can be found in Table 1. The CD28/CTLA4/B7 axis was the first pathway to be therapeutically inhibited. The use of a recombinant CD28-Ig to bind CD80/CD86 and block natural CD28 signaling was ineffective due to its low affinity for its B7 ligands leading to the development of another recombinant protein: the CTLA4-Ig (abatacept).⁴¹ This fusion protein comprises the extracellular domain of human CTLA-4, which has a higher affinity for CD80 and CD86 than CD28 does, fused with a fragment of the Fc portion of human IgG1, to increase its half-life. Because the majority of the first experimental and clinical data are related to the use of CTLA4-Ig (abatacept) and its higher affinity version belatacept (or LEA29Y)⁶⁵ in autoimmunity and transplantation, we will focus first on what was learned from these studies.

Although belatacept has been mainly developed to target DC-priming of T cells, preclinical models have interestingly shown that the use of belatacept inhibited humoral responses in transplantation settings. Follicle size, GC proportion, and IL-21 secretion were decreased in belatacept-treated primate

recipients, suggesting a specific role of belatacept on Tfh–B-cell crosstalk.

The studies by Chen *et al.*⁶⁹ and Young *et al.*⁷⁰ further showed, in murine models, that delayed CTLA4-Ig could inhibit ongoing humoral response, even if priming of allogenic T cells had already occurred. Indeed, introduction of CTLA4-Ig treatment 14 days after sensitization inhibited alloantibody production and collapsed GC responses. These results suggested that CTLA4-Ig action on B-cell stimulatory capacities were important, independently of T-cell priming by DCs. Recently, in a murine skin transplant model, Badell *et al.*⁷¹ showed that belatacept inhibited the function of adoptively transferred allogenic Tfh leading to decreased sensitization.

We further studied mechanisms underlying Belatacept action on humoral response in humans.⁷² We showed that belatacept inhibited Tfh–B-cell crosstalk *in vitro* by decreasing the proportion of activated PD-1⁺ICOS⁺ Tfh cells, decreasing Tfh proliferation, and decreasing the differentiation of B cells into plasmablasts. We confirmed that belatacept-treated kidney-graft recipients displayed lower frequencies of circulating Tfh and terminally differentiated B cells than control recipients did, suggesting that belatacept might also target and inhibit Tfh–B-cell crosstalk *in vivo*.

Previously, belatacept was mainly thought to alter B-cell responses by blocking T-cell priming. We unraveled an additional B-cell intrinsic mechanism. We showed it could directly inhibit the Ig production of activated B cells *in vitro*, without any T-cell intervention. The direct effect of belatacept on B cells may imply a signaling through CD86, which was interestingly highly expressed in plasmablasts. It induced signal transducer and activator of transcription 3 activation in stimulated B cells but not in the Akt/nuclear factor κB

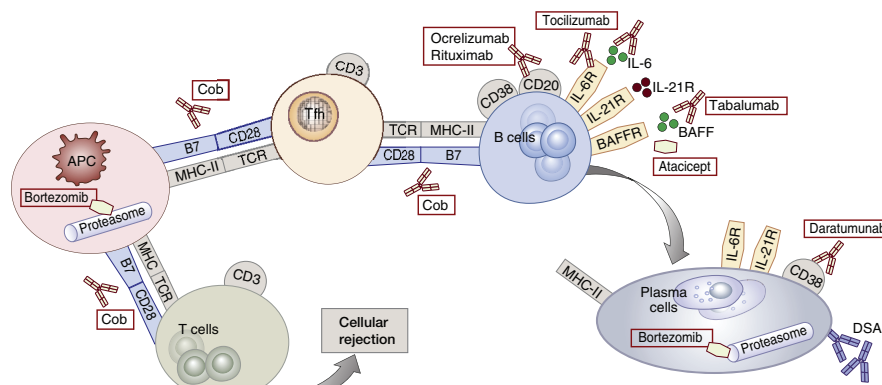


Figure 3 | Immunosuppressant agents and classes in kidney transplantation. This diagram is a summary of our discussion of the potential therapeutic targets and their effects on different cells key to humoral responses. New data show that the costimulatory blockade (Cob) targets multiple stages of cell-cell interactions. In contrast to T follicular helper–B-cell interactions, relatively few drugs target plasma cells. Furthermore, bortezomib and anti-CD38, which do affect plasma cells, actually have much broader effects. Therapeutic compounds are depicted in red font. APC, antigen-presenting cell; BAFF, B-cell-activating factor; BAFFR, BAFF receptor; DSA, donor-specific antibody; IL: interleukin; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor.

Table 1 | B-cell targeting therapies

Pathway	Name		Agent	Target
	INNs	Commercial		
Cytokine IL-6	Tocilizumab	Roactemra	Humanized mAbs	IL-6-R
	Clazakizumab (BMS-945429)		Humanized mAbs	IL-6
BAFF	Belimumab	Benlysta	Human mAbs	BAFF
	Atacicept		TACI-Ig	BAFF
	Blisibimod		Selective antagonist	BAFF
	Tabalumab		Human mAbs	BAFF
	VAY736		Human mAbs	BAFFR
Costimulatory molecules CD28/CD80-CD86	Abatacept	Orencia	CTLA4-Ig	CD80/CD86
	Belatacept	Nulojix	CTLA4-Ig	CD86/CD80
CD40/CD154	ASP2409		CTLA4-Ig	CD86
	Lulizumab		Humanized mAbs	CD28
	FR104		Nanobodies	CD28
	Ruplizumab (BG9588)		Humanized mAbs	CD154
	Dapirolizumab (CDP7657)		Humanized mAbs	CD154
	MEDI4920		Nanobodies	CD154
	Bleselumab (ASKP1240)		Human mAbs	CD40
	CFZ533		Human mAbs	CD40
	Prezalumab (AMG 557)		Human mAbs	ICOS-L
	MEDI-570		Humanized mAbs	ICOS
Other target B cells	Rituximab	MabThera	Chimeric mAbs	CD20
	Daratumumab	Darzalex	Human mAbs	CD38
	Basiliximab	Simulec	Humanized mAbs	CD25
	Bortezomib	Velcade	Inhibitor	Proteasome

BAFF, B-cell-activating factor; BAFFR, BAFF receptor; CTLA4, cytotoxic T lymphocyte antigen-4; ICOS, inducible T-cell costimulator; ICOS-L, ICOS ligand; IL, interleukin; IL-6-R, interleukin-6 receptor; INN, international nonproprietary name; mAbs, monoclonal antibodies; TACI, transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor.

pathway, similar to CTLA4-Ig-mediated reverse signaling described in DCs.^{73,74}

The current evidence supports that targeting co-stimulatory molecules likely acts both on the T cells as well as on B cells (including PCs) to modulate the Tfh–B-cell crosstalk. Thus, further development of strategies targeting these molecules will be important to further our ability to modulate humoral responses.

Belatacept use in transplantation: 1 step toward a better control of humoral responses

Belatacept was initially developed as anticalcineurine-sparing strategies to prevent their nephrotoxicity. Phase II and III clinical studies, Belatacept Evaluation of Nephroprotection and Efficacy as First-line Immunosuppression (BENEFIT) and Study of Belatacept in Subjects Who Are Undergoing a Renal Transplant (BENEFIT-EXT), which evaluated belatacept efficiency in nonsensitized kidney graft recipients showed an increase in (i) overall survival, (ii) in graft survival leading to a 43% reduction in the risk of death or graft loss, and (iii) an improved graft function when recipients were treated with belatacept as compared to anticalcineurine regimens.⁷⁵ Several hypotheses could be drawn to explain this clinical efficiency,⁷⁶ including improved patient's compliance to monthly infused treatment and anticalcineurine-sparing toxicity.

Importantly, these studies also highlighted that belatacept-treated recipients had a drastic reduction of DSA incidence.

The cumulative rate for the development of DSAs was 4.6% in the belatacept group versus 17.8% in the control group, 84 months after transplantation.⁷⁵ The lower incidence of HLA sensitization may account for the decreased risk of humoral rejection and clinical efficiency with belatacept treatment.

Animal models also confirmed that belatacept specifically inhibited humoral responses and T-dependent antibody production. Belatacept inhibited anti-sheep red blood cell antibodies secretion more efficiently than its predecessor abatacept in a murine model.⁶⁸ Furthermore, in nonhuman primate kidney transplant model, belatacept treatment was the only treatment able to prevent DSA formation,⁷⁷ whereas combinatory treatment with anti-CD3, tacrolimus (anticalcineurine), and alefacept (anti-CD2) were ineffective at preventing DSA formation and AMR.

Overall, belatacept effects on humoral responses led, for the first time, to improved clinical results as compared to the reference therapy (anticalcineurine + mycophenolate mofetil + corticosteroid) in nonsensitized kidney recipients that led to its US Food and Drug Administration approval in 2011. To more specifically inhibit CD28-mediated stimulatory pathway, while leaving CTLA-4 inhibitory signaling intact (especially on Tfh), a new generation of CD28 blockade agents was engineered: a pegylated Fab' antibody fragment antagonist of CD28, CD28-Fc (FR104).^{78–80} In a nonhuman primate transplantation model, CD28-Fc seems to have an even more potent effect in controlling Tfh–B-cell crosstalk

than belatacept⁸¹: IL-21 gene expression was decreased in FR104-treated animal biopsies at 1 month. FR104 also inhibited Tfh proliferation more potently than belatacept in an *in vitro* model of Tfh–B-cell coculture. In a murine skin transplant model, anti-CD28 led to superior inhibition of donor-targeted Tfh, GC B cells, and DSA production than CTLA4-Ig did.⁷¹ Also promising, evaluation of its effects in human transplantation settings is warranted.

CTLA4-Ig in autoimmune disease

Though the previously described therapies were initially designed to target T cells, in light of their newly recognized effects on humoral responses, it is important to reconsider their mechanism of action in autoimmune diseases. Whereas generation of DSAs is the driving process of AMR pathogenesis, the precise roles of autoantibody in the pathophysiology of autoimmune diseases is still poorly understood. One reason for this is that in transplantation settings, the source of the initial exposure to the antigens and the pathophysiological mechanisms of T- and B-cell-mediated damage are known. However, at the time of diagnosis of an autoimmune disease, the progression and evolution of the immunological processes underlying it are unknown. Moreover, “autoimmune diseases” refers to a variety of conditions with very different pathological contexts and pathogenesis.

Based on the finding that CD28-deficient mice were resistant to arthritis in a model of collagen-induced arthritis,⁸² targeting autoreactive T cells with CTLA4-Ig demonstrated striking reduction of disease manifestations in lupus disease⁸³ and collagen-induced arthritis⁸² mouse models. According to the timing of administration, CTLA4-Ig administration either prevented the development of or was able to ameliorate collagen-induced arthritis.^{82,84}

The promising preclinical results in murine models of lupus, especially for the treatment of arthritis, spurred the initial human clinical trials of CTLA4-Ig. They mainly focused on the treatment of patients with psoriasis⁸⁵ and rheumatoid arthritis. Successful clinical trials with abatacept (human CTLA4-Ig) led to abatacept approval by the US Food and Drug Administration for the treatment of rheumatoid arthritis in 2005.⁸⁶ These trials showed a reduction in autoantibody production, but it is unknown whether it is a direct effect of CTLA4-Ig treatment on the humoral response or an indirect effect of reduced disease. CTLA4-Ig has been reported to inhibit antibody responses in humans in the context of autoimmunity. Antibody titers induced after vaccination with the monovalent pandemic 2009 influenza A H1N1 virus vaccine was severely reduced in abatacept-treated rheumatoid patients as compared to control patients treated with methotrexate (9% vs. 58%).⁸⁷

Using the NZB/NZW.F1 experimental murine model of systemic lupus erythematosus (SLE), it was observed that administration of murine CTLA4-Ig prolonged survival and prevented autoantibody production.⁸³ However, clinical trials of abatacept in SLE patients have not shown any clear efficacy.⁸⁸ In lupus nephritis, abatacept did not clearly improve

the outcome, despite some evidence of biological activity, including decreased anti-double-stranded DNA antibody, C3, and C4 levels, but the results were inconsistent.^{89–91} Collectively, a more thorough understanding of both the pathophysiology of individual autoimmune diseases and the precise mechanisms of function of abatacept is needed for a more targeted approach to treatment.

OTHER CO-STIM BLOCKADE AGENTS

Although CD28 was the first co-stim pathway to be therapeutically targeted, current knowledge involving other co-stim pathways in T-cell activation led to the development of novel co-stim blockade agents. They have mainly been tested in animal models. We will review their potential impact on humoral responses in light of recent advances of functional mechanisms.

CD40/CD154

The CD40/CD154 (CD40L) pathway seemed among the most promising therapeutic targets in preclinical murine and nonhuman primate models of transplantation. It belongs to the tumor necrosis factor superfamily (Figure 2). As discussed in the co-stim blockade immune mechanisms on B-cell responses section, in contrast to other co-stim pathways where the ligands on the APC mainly amplify T-cell activation signaling pathways, activation of CD40 on B cells by CD40L is crucial for T-cell-dependent B-cell activation and at several steps of their differentiation.⁵⁸ Consequently, the blockade of this pathway has drastic consequences on humoral responses. In humans, the genetic deficiency of CD40L leads to a severe immune disorder: hyper IgM syndrome. Patients who are genetically deficient in CD40L are severely immunocompromised; they lack GC reactions and produce decreased levels of class-switched antibodies,^{92–94} demonstrating the importance of CD40/CD40L in immune responses.

In numerous experimental models of transplantation, inhibition of the CD40/CD40L pathway led to remarkably increased graft survival.^{95,96} Interestingly, using anti-CD154 (anti-CD40L) therapy has drastic consequences in reducing DSA production in mouse models: treatment with anti-CD154 was able to terminate ongoing GC reactions⁶⁹ and effectively reduced alloantibody production following renal transplantation in rhesus macaques.⁷⁷ Finally, blocking this pathway is a potent means to induce tolerance, in other words, stable graft function without any continuous immunosuppressive therapies, in experimental models.⁹⁷

However, human clinical trials evaluating the safety and efficiency of anti-CD154 reagents had to be prematurely stopped due to severe thromboembolic complications, related to CD154 expression on human platelets.⁹⁸ Anti-human CD40, ASKP1240, has now been developed as a safe and efficient alternative.^{99,100}

Importantly, anti-CD40 is also very potent in controlling humoral responses. In nonhuman primates, it inhibited the production of antibodies against tetanus toxoid in a dose-dependent manner, with a complete inhibition of anti-tetanus

toxoid IgG generation at the highest dose.¹⁰⁰ These results suggest it also effectively blocks GC and the production of high affinity antibodies in this model. Moreover, production of DSAs was abolished in ASKP1240-treated monkeys in a model of pancreatic islet transplantation.⁹⁹ ASKP1240 appears to be a promising candidate for immunosuppression in clinical transplantation. Several clinical trials in humans are ongoing.^{101,102}

PD-1/PD-L1

PD-1/PD-L1 is a major inhibitory pathway of T-cell activation. The use of PD-1 inhibitors to boost T-cell immunity has revolutionized the treatment and prognosis of several metastatic cancers.¹⁰³ As discussed in the Immune mechanisms leading to DSA production: role of costimulatory molecules section, Tfh cells express high levels of PD-1 but its function on this specific T-cell subset is complex. It dampens T-cell-receptor and CD28 signaling and the accumulation of Tfh. However, it also influences Tfh migration and the stringency of B-cell affinity exiting the GC.^{52,53} Therefore, in contrast to CTLA4-Ig, which mainly blocks T cells from receiving costim signals, administering PDL1-Ig is hypothesized to induce an inhibitory signal through PD-1 on T cells. Because PDL1-Ig is designed to mimic a stronger PD-1 signal, it may also inadvertently increase the affinity of B cells that effectively seed a GC. PDL1-Ig efficacy to prevent organ rejection was studied in some experimental models.^{104,105} PDL1-Ig, used in combination with anti-CD154, greatly increased organ survival to 140 days versus 40 days and 13 days with the anti-CD154 or PDL1-Ig alone, respectively. Its impact on humoral response has not been assessed yet and will be critical information.

ICOS/ICOS-L

The ICOS-ICOS-L pathway is essential for Tfh differentiation, GC development, and maintenance.^{37,48} However, robust antigen delivery by cognate B cells may overcome ICOS-L requirement on B cells using compensatory signals.¹⁰⁶ Thus targeting the ICOS/ICOS-L pathway in autoimmunity or organ transplantation should be closely monitored.

To target this pathway, 2 therapeutic strategies have been developed and are in preclinical studies: the use of recombinant ICOS-Ig protein, and the anti-ICOS-blocking antibody. ICOS-Ig was designed to out-compete binding of surface-bound ICOS on T cells to its cognate receptor ICOS-L on APC, thus preventing the delivery of co-stim signal from APC to T cells (Figure 2). ICOS-Ig was subsequently found to prevent the binding of ICOS-L to CD28. Preclinical studies evaluating ICOS-Ig efficacy on preventing allograft rejection produced disappointing results. In kidney transplanted nonhuman primates, compared with untreated animals, the use of ICOS-Ig alone as a short-term treatment did not modify overall survival.¹⁰⁷ Furthermore, coadministration of ICOS-Ig with belatacept did not improve graft survival as compared to belatacept alone. More recently, coadministration of ICOS-Ig with anti-CD40 also did not improve survival

as compared to anti-CD40 alone in a model of cardiac transplantation in nonhuman primates.¹⁰⁸

The use of anti-ICOS, however, seemed to more effectively block humoral responses in preclinical models. It led to a decreased production of DSAs in a model of islet xenotransplantation.¹⁰⁹ Moreover, in combination with anti-CD40 in a model of chronic cardiac humoral rejection, anti-ICOS led to decreased DSAs titer and ameliorated histology as compared to anti-CD40 alone.¹¹⁰ Hence, anti-ICOS treatment may be a promising candidate for clinical trials. It may be particularly effective when used in combinatory therapies, as compensatory pathways may overrule its requirement. Optimal combinatory therapies still need to be defined and tested in humans.

B7-H4

B7-H4 is a new receptor of the B7 family, mainly expressed on B cells,¹¹¹ however, its ligand is unknown.¹¹² B7-H4 triggering on B cells in the context of Epstein-Barr virus infection led to increased expression of Fas-L inducing their apoptosis¹¹³ and reduced the proliferation of Epstein-Barr virus-transformed lymphoma B cells.¹¹⁴ B7-H4 also appeared to play a role in modulating autoimmune disease. B7-H4-deficient lupus-prone mice have more severe disease and increased production of autoantibodies.¹¹⁵ Inhibiting B7-H4 in a model of cardiac transplantation increased DSA production without any influence on graft survival.¹¹⁶ Conversely, injection of B7-H4 recombinant protein led to ameliorated disease in a lupus-prone model.¹¹⁵ Moreover in a murine pancreatic islet transplantation model, overexpression of B7-H4 on donor cells led to increased graft survival and prolonged euglycemia.¹¹⁶⁻¹¹⁸ In both models, B7-H4 seems to interact and synergize with the CD28-CTLA4/B7 pathway: overexpression of B7-H4 increased CTLA4-Ig-mediated graft survival,¹¹⁸ and conversely blocking B7-H4 in CD28-deficient mice decreased graft survival.¹¹⁹ B7-H4 targeting may give interesting results when used in conjunction with CTLA4-Ig-CD28-Fc regimen.

CD27/CD70

Compared with other tumor necrosis factor- α family members, few studies have evaluated the impact of targeting this pathway in transplantation. However, it has been shown that CD27/CD70 plays a major role in B-cell hematopoiesis and differentiation.¹²⁰ Indeed, CD27 is expressed on early B-cell progenitors.¹²¹ In humans, CD27 is mainly known as a memory B-cell marker.¹²² CD70 is transiently expressed on activated B cells but more permanently on PCs.¹²³ Blocking CD70 signaling *in vitro* leads to decreased B-cell activation and Ig production.¹²⁴ CD70 pathway may also synergize with the CD40 pathway.^{124,125}

In experimental models, blocking CD70 led to increased cardiac graft survival.¹²⁶ However, clinical efficacy relied on the use of a depleting antibody.¹²⁷ Another study suggested that anti-CD27 therapy might efficiently control memory humoral responses in presensitized cardiac transplantation

leading to increased graft survival.¹²⁸ Hence, targeting CD27/CD70 may lead to interesting results toward controlling humoral responses.¹²⁹

FUTURE STRATEGIES

Single agent-based therapy may not be sufficient to reach the ultimate goal of controlling humoral responses that most likely rely on redundant mechanisms. Moreover, multiple barriers exist toward effectively targeting humoral responses. These include (i) cellular barriers and niches that prevent drug penetration, such as GC in secondary lymphoid organs or plasmablast niches in bone marrow, (ii) the complementarity and redundancy of certain pathways, and (iii) potentially variable effects of the drugs at different stages of the immune response, the basic mechanisms of which are still incompletely understood. Due to these complexities, a combinatorial approach to co-stim blocking may be more effective, and defining the best combinations is the ultimate goal.

Combination of co-stim blockades

Co-stim pathways are closely related.³⁹ For example, different ligands share the same receptor (Figure 2) and signaling of a given pathway influences the others. Hui *et al.*⁵⁰ recently showed that PD-L1-induced signaling of PD-1 inhibited T-cell activation through CD28 signaling. We also showed that using belatacept modifies the expression of other co-stim molecules, particularly PD-L1, *in vitro*.⁷²

This implies that targeting 1 co-stim pathway may lead to the induction of a new equilibrium of all co-stim molecule expression and function. These changes have to be studied and taken into account when designing future therapeutic strategies.

With the use and development of new molecules directly targeting B and PCs in the autoimmune, transplantation, or hematological fields, the main challenge will be to design the best complementary strategies (Figure 3).

Co-stim blockade agents and other B-cell targeting therapies

Bortezomib, a broad-spectrum proteasome inhibitor, inhibits alloantibody production in patients with kidney transplantation through induction of apoptosis in PCs.¹⁵⁰ In the context of AMR, proteasome inhibitor seems to reduce the titers of immunodominant DSAs by 50%, especially for early AMR.¹³¹ A similar, although transient, reduction rate has also been observed for preformed anti-HLA antibodies in a prospective trial of proteasome inhibitor-based desensitization.¹³² Interestingly, Woodle *et al.*¹³² also reported a low rate of *de novo* DSA production (12.5%) in the 43% of desensitized patients. In another study of 18 patients undergoing clonal deletion with donor-specific transfusion followed by treatment with bortezomib, rabbit antithymocyte globulin, rituximab, and steroids, 4 patients developed *de novo* DSAs, whereas 4 could be weaned off immunosuppression.¹³³ Similar results were reported in a small series of pediatric heart transplant cases, where bortezomib has been associated

with a marked reduction in *de novo* DSAs and resolution of AMR.¹³⁴ More recently a randomized trial of bortezomib in late AMR failed to demonstrate that bortezomib could prevent glomerular filtration rate loss, improve histologic or molecular disease features, or reduce DSAs.¹³⁵ The limited benefit of bortezomib could be related to the nonselective nature of proteasome inhibition. In a preclinical model, Kwun *et al.*³⁰ evaluated the combination of a proteasome inhibitor (bortezomib) to deplete bone marrow PC, in conjunction with 2 co-stim blockade agents (belatacept and anti-CD40 [or 2C10]) to target GC, in a model of presensitized nonhuman primate kidney transplantation. This strategy increased allograft survival and led to sustainable decreased DSA titers.³⁰ Hence targeting B cells at different maturation stages might be useful.

Daratumumab binds with high affinity to human CD38 engaging diverse mechanisms of action, including complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity, antibody-dependent cellular phagocytosis, programmed cell death, modulation of enzymatic activity, and immunomodulatory activity.¹³⁶ Daratumumab monotherapy induced at least a partial response in around 30% of heavily pretreated and refractory patients with multiple myeloma, with a favorable safety profile.¹³⁷ While CD38-targeting antibodies were initially developed to kill malignant PCs, these monoclonal antibodies may also abrogate the production of autoantibodies in autoimmune disorders. Indeed, daratumumab was effective in the treatment of refractory autoimmune hemolytic anemia. Similarly, daratumumab reduced total and allergen-specific IgE levels by depleting IgE-producing PCs, and this suggests potential value of CD38 antibodies in the management of severe allergy.¹³⁸

Both drugs targeting terminally differentiated B cells and particularly PCs might be particularly interesting to use in combination therapies when these cells play a detrimental role: in the context of antibody-mediated rejection or in presensitized patients.

Co-stim blockade agents and cytokine inhibitors

Another therapeutic possibility would be to combine co-stim blockade with cytokine inhibitors. In this context, we will consider the 3 major cytokines implied in B-cell functions: IL-21, B-cell-activating factor (BAFF), and IL-6.

IL-21 is an important cytokine secreted by Tfh. It sustains terminally differentiated B-cell generation. Blocking the IL-21 pathway in conjunction with co-stim blockade might be an efficient means to control humoral responses. In an *in vitro* model, in which lymphocytes of the graft recipient are stimulated with donor antigens, blocking IL-21R led to a decrease in plasmablast differentiation.¹³⁹ In preclinical models of islet transplantation, infusion of soluble IL-21R to neutralize IL-21, or the IL-21 blocking antibody, doubled CTLA4-Ig-mediated graft survival.¹⁴⁰

The B-cell-stimulating molecules, BAFF and APRIL (a proliferation-inducing ligand), are critical factors in the maintenance of the B-cell pool and humoral immunity. BAFF

and APRIL bind to transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor, and B-cell maturation antigen, while BAFF additionally binds to a third receptor, BAFF-R; all 3 receptors are expressed by B lineage cells.¹⁴¹ BAFF maintains B-cell homeostasis by acting as a survival and fitness factor for B cells from the transitional stage of development onward, while APRIL appears to act at a later stage, modulating the function and survival of antigen-experienced B cells.^{142–145} BAFF is elevated in various autoimmune diseases including SLE, rheumatoid arthritis, and Sjögren syndrome, and BAFF elevation is associated with autoantibody production.¹⁴⁶ Several therapeutics targeting BAFF as a treatment for autoimmune diseases have been developed.¹⁴⁷ The US Food and Drug Administration approved belimumab, a monoclonal anti-BAFF antibody, for the treatment of SLE in 2011, and atacept, blisibimod, and tabalumab, a recombinant soluble transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor receptor, and 2 selective antagonists of BAFF, respectively, are currently being tested in phase III trials for the therapy of SLE.

Recently Kwun *et al.*²⁹ tested the ability of atacept to prevent alloantibody production and prolong allograft survival after kidney transplantation in nonhuman primates. They showed that atacept prevented early DSA formation and AMR development in an induced AMR model, although more T-cell rejection findings were observed. Whether targeting BAFF and APRIL could be useful for prevention or treatment or both of AMR in humans remains to be established.

IL-6 also plays a major role in B-cell differentiation into PCs or memory B cells. Moreover, IL-6 is needed for the long-term survival of PCs.^{148–150} Blocking IL-6 with tocilizumab (anti IL-6R) seems to be an efficient method to block unwanted immune responses in autoimmunity,^{151,152} thus several studies have evaluated its role in the prevention of graft rejection. Jordan *et al.*¹⁴⁹ recently reviewed the role of anti-IL-6 therapy on AMR in transplantation models. Briefly, tocilizumab significantly reduced the risk of AMR in presensitized kidney transplant recipients.¹⁵³ However, it was ineffective at treating AMR. A new generation of IL-6–blocking agents, an anti-IL-6–blocking antibody, is being developed and tested (Clazakizumab in Highly-HLA Sensitized Patients Awaiting Renal Transplant [NCT03380962]). Several preclinical observations suggest that the combined use of co-stim blockade with IL-6 blockade might be highly beneficial for graft survival. In combination with co-stim blockade (anti-CD154 and CTLA4-Ig), both genetic deficiency in IL-6 and treatment with anti-IL-6 blocking antibodies led to increased graft survival in multiple transplantation models.^{154,155} This association must be better understood and may improve transplant outcomes in humans but needs to be evaluated.

CONCLUSIONS

Co-stim molecules are now well-recognized therapeutic targets for controlling immune activation. They are central to

allo- and auto-reactive T-cell responses and thus are viable targets for inhibiting graft rejection and auto-reactive T cells. There are now strong arguments that co-stim pathways may also play active roles in controlling the pathways leading to DSAs and autoantibody production. Both experimental models and clinical data in solid organ transplantation indicate that CTLA4-Ig may uniquely control B-cell responses. It modulates both their stimulatory capacities, leading to the impairment of Tfh–B-cell crosstalk, and the production of antibodies by effector B cells. Other costimulatory molecules including CD40/CD40-L, ICOS/ICOS-L, PD-1/PD-L1 are also involved in Tfh function, Tfh–B-cell crosstalk, and PC homeostasis and may be promising therapeutic options.

Effective control of the humoral responses during transplantation may require targeting of both B-cell APC function and antibody production. Now with the expansion of tools that can target both functions and the demonstration of increased effectiveness of combination strategies, real improvement in graft survival may be within reach.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

REFERENCES

- Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence: attributing causes of kidney transplant loss. *Am J Transplant.* 2012;12:388–399.
- Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant.* 2009;9:2520–2531.
- Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21:1398–1406.
- Aubert O, Loupy A, Hidalgo L, et al. Antibody-mediated rejection due to preexisting versus de novo donor-specific antibodies in kidney allograft recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:1912–1923.
- Djamali A, Kaufman DB, Ellis TM, et al. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches. *Am J Transplant.* 2014;14:255–271.
- Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, et al. Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Rep.* 2015;7:51.
- Thaunat O, Graff-Dubois S, Fabien N, et al. A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int.* 2012;81:207–219.
- Li L, Wadia P, Chen R, et al. Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and “antibodyome” measures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:4148–4153.
- Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26:457–467.
- Yuan FF, Watson N, Sullivan JS, et al. Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. *Transplantation.* 2004;78:766–769.
- Smith RN, Colvin RB. Chronic alloantibody mediated rejection. *Semin Immunol.* 2012;24:115–121.
- Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant.* 2010;10:510–517.
- Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *Am J Transplant.* 2009;9:2532–2541.
- Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. 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.* 2012;12:1157–1167.

15. Rostaing L, Kamar N. Can we prevent donor-specific antibodies from developing after ABO-incompatible kidney transplantation? *Kidney Int.* 2014;85:245–247.
16. Thauinat O, Koenig A, Leibler C, et al. Effect of immunosuppressive drugs on humoral allo-sensitization after kidney transplant. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:1890–1900.
17. Süsal C, Opelz G. Transplantation: desensitization and survival in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13:196–198.
18. Everly MJ, Terasaki PI. The state of therapy for removal of alloantibody producing plasma cells in transplantation. *Semin Immunol.* 2012;24:143–147.
19. Roberts DM, Jiang SH, Chadban SJ. The treatment of acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients—a systematic review. *Transplantation.* 2012;94:775–783.
20. Wan SS, Ying TD, Wyburn K, et al. The treatment of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: an updated systematic review and meta-analysis. *Transplantation.* 2018;102:557–568.
21. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:149–159.
22. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity.* 2007;27:190–202.
23. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell.* 2010;143:592–605.
24. Shlomchik MJ, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunity Rev.* 2012;247:52–63.
25. Qi H. T follicular helper cells in space-time. *Nat Rev Immunol.* 2016;16:612–625.
26. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol.* 2015;16:142–152.
27. Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, et al. Follicular helper T cells. *Annu Rev Immunol.* 2016;34:335–368.
28. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 2014;41:529–542.
29. Kwun J, Page E, Hong JJ, et al. Neutralizing BAFF/APRIL with atacicept prevents early DSA formation and AMR development in T cell depletion induced nonhuman primate AMR model. *Am J Transplant.* 2015;15:815–822.
30. Kwun J, Manook M, Page E, et al. Crosstalk between T and B cells in the germinal center after transplantation. *Transplantation.* 2017;101:704–712.
31. Schroder PM, Ezekian B, Ford M, et al. Commentary: belatacept does not inhibit follicular T cell-dependent B-cell differentiation in kidney transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:1615.
32. Walters GD, Vinuesa CG. T follicular helper cells in transplantation. *Transplantation.* 2016;100:1650–1655.
33. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, et al. Human blood CXCR5(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity.* 2011;34:108–121.
34. Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity.* 2013;39:758–769.
35. Bentebibel S-E, Lopez S, Obermoser G, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med.* 2013;5:176ra32.
36. Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, et al. Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help. *Am J Transplant.* 2017;17:1490–1501.
37. Choi YS, Kageyama R, Eto D, et al. ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6. *Immunity.* 2011;34:932–946.
38. Sage PT, Francisco LM, Carman CV, et al. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol.* 2013;14:152–161.
39. Ford ML. T cell costimulatory molecules in transplantation. *Immunity.* 2016;44:1020–1033.
40. Schildberg FA, Klein SR, Freeman GJ, et al. Coinhibitory pathways in the B7-CD28 ligand-receptor family. *Immunity.* 2016;44:955–972.
41. Esensten JH, Helou YA, Chopra G, et al. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity.* 2016;44:973–988.
42. Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:445–480.
43. Li J, Lu E, Yi T, et al. EB12 augments Tfh cell fate by promoting interaction with IL-2-queching dendritic cells. *Nature.* 2016;533:110–114.
44. Haynes NM, Allen CDC, Lesley R, et al. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1-high germinal center-associated subpopulation. *J Immunol.* 2007;179:5099–5108.
45. Xu H, Li X, Liu D, et al. Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility. *Nature.* 2013;496:523–527.
46. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol.* 2009;10:167–175.
47. Kroenke MA, Eto D, Locci M, et al. Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol.* 2012;188:3734–3744.
48. Liu D, Xu H, Shih C, et al. T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction. *Nature.* 2015;517:214–218.
49. Bossaller L, Burger J, Draeger R, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol.* 2006;177:4927–4932.
50. Hui E, Cheung J, Zhu J, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017;355:1428–1433.
51. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science.* 2017;355:1423–1427.
52. Good-Jacobson KL, Szumilas CG, Chen L, et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nat Immunol.* 2010;11:535–542.
53. Shi J, Hou S, Fang Q, et al. PD-1 controls follicular T helper cell positioning and function. *Immunity.* 2018;49:264–274.e4.
54. Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife.* 2014;3:e03180.
55. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, et al. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity.* 2014;41:1026–1039.
56. Wang CJ, Heuts F, Ovcinnikovs V, et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:524–529.
57. Linterman MA, Beaton L, Yu D, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med.* 2010;207:353–363.
58. Luo W, Weisel F, Shlomchik MJ. B cell receptor and CD40 signaling are rewired for synergistic induction of the c-Myc transcription factor in germinal center B cells. *Immunity.* 2018;48:313–326.e5.
59. Watanabe M, Fujihara C, Radtke AJ, et al. Co-stimulatory function in primary germinal center responses: CD40 and B7 are required on distinct antigen-presenting cells. *J Exp Med.* 2017;214:2795–2810.
60. Lumsden JM, Williams JA, Hodes RJ. Differential requirements for expression of CD80/86 and CD40 on B cells for T-dependent antibody responses in vivo. *J Immunol.* 2003;170:781–787.
61. Lee BO, Moyron-Quiroz J, Rangel-Moreno J, et al. CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary B cell responses. *J Immunol.* 2003;171:5707–5717.
62. Schwartz MA, Kolhatkar NS, Thouvenel C, et al. CD4+ T cells and CD40 participate in selection and homeostasis of peripheral B cells. *J Immunol.* 2014;193:3492–3502.
63. Bahlis NJ, King AM, Kolonias D, et al. CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood.* 2007;109:5002–5010.
64. Delogu A, Schebesta A, Sun Q, et al. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity.* 2006;24:269–281.
65. 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.

66. Rozanski CH, Utley A, Carlson LM, et al. CD28 promotes plasma cell survival, sustained antibody responses, and BLIMP-1 upregulation through its distal PYAP proline motif. *J Immunol.* 2015;194:4717–4728.
67. 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.
68. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant.* 2005;5:443–453.
69. Chen J, Yin H, Xu J, et al. Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am J Transplant.* 2013;13:2280–2292.
70. Young JS, Chen J, Miller ML, et al. Delayed CTLA4-Ig treatment reverses ongoing alloantibody responses and rescues allografts from acute rejection. *Am J Transplant.* 2016;16:2312–2323.
71. Badell IR, La Muraglia GM, Liu D, et al. Selective CD28 blockade results in superior inhibition of donor-specific T follicular helper cell and antibody responses relative to CTLA4-Ig. *Am J Transplant.* 2018;18:89–101.
72. Leibler C, Thiolat A, Hénique C, et al. Control of humoral response in renal transplantation by belatacept depends on a direct effect on B cells and impaired T follicular helper-B cell crosstalk. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29:1049–1062.
73. Kowalczyk A, D'Souza CA, Zhang L. Cell-extrinsic CTLA4-mediated regulation of dendritic cell maturation depends on STAT3. *Eur J Immunol.* 2014;44:1143–1155.
74. Koorella C, Nair JR, Murray ME, et al. Novel regulation of CD80/CD86-induced phosphatidylinositol 3-kinase signaling by NOTCH1 protein in interleukin-6 and indoleamine 2,3-dioxygenase production by dendritic cells. *J Biol Chem.* 2014;289:7747–7762.
75. Vincenti F, Rostaing L, Grinyo J, et al. Belatacept and long-term outcomes in kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2016;374:333–343.
76. Heher E, Markmann JF. The clearer BENEFITS of belatacept. *N Engl J Med.* 2016;374:388–389.
77. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am J Transplant.* 2014;14:59–69.
78. Poirier N, Blanco G, Vanhove B. CD28-specific immunomodulating antibodies: what can be learned from experimental models? *Am J Transplant.* 2012;12:1682–1690.
79. Poirier N, Dilek N, Mary C, et al. FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab antibody, prevents alloimmunization and allows calcineurin inhibitor minimization in nonhuman primate renal allograft. *Am J Transplant.* 2015;15:88–100.
80. Poirier N, Chevalier M, Mary C, et al. Selective CD28 antagonist blunts memory immune responses and promotes long-term control of skin inflammation in nonhuman primates. *J Immunol.* 2016;196:274–283.
81. Ville S, Poirier N, Brancheau J, et al. Anti-CD28 antibody and belatacept exert differential effects on mechanisms of renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:3577–3588.
82. Knoerzer DB, Karr RW, Schwartz BD, et al. Collagen-induced arthritis in the BB rat: prevention of disease by treatment with CTLA-4-Ig. *J Clin Invest.* 1995;96:987–993.
83. Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science.* 1994;265:1225–1227.
84. Webb LM, Walmsley MJ, Feldmann M. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol.* 1996;26:2320–2328.
85. Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest.* 1999;103:1243–1252.
86. Ford ML, Adams AB, Pearson TC. Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:14–24.
87. Ribeiro AC, Laurindo IM, Guedes LK, et al. Abatacept and reduced immune response to pandemic 2009 influenza A/H1N1 vaccination in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013;65:476–480.
88. Merrill JT, Burgos-Vargas R, Westhovens R, et al. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life-threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: results of a twelve-month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3077–3087.
89. Wofsy D, Hillson JL, Diamond B. Comparison of alternative primary outcome measures for use in lupus nephritis clinical trials. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1586–1591.
90. ACCESS Trial Group. Treatment of lupus nephritis with abatacept: the Abatacept and Cyclophosphamide Combination Efficacy and Safety Study. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:3096–3104.
91. Furie R, Nicholls K, Cheng T-T, et al. Efficacy and safety of abatacept in lupus nephritis: a twelve-month, randomized, double-blind study. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:379–389.
92. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science.* 1993;259:990–993.
93. DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, et al. CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;361:541–543.
94. Korthäuer U, Graf D, Mages HW, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature.* 1993;361:539–541.
95. Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med.* 1999;5:686–693.
96. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, et al. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229:152–172.
97. Pinelli DF, Ford ML. Novel insights into anti-CD40/CD154 immunotherapy in transplant tolerance. *Immunotherapy.* 2015;7:399–410.
98. Kawai T, Andrews D, Colvin RB, et al. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med.* 2000;6:114.
99. Watanabe M, Yamashita K, Suzuki T, et al. ASKP1240, a fully human anti-CD40 monoclonal antibody, prolongs pancreatic islet allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant.* 2013;13:1976–1988.
100. Okimura K, Maeta K, Kobayashi N, et al. Characterization of ASKP1240, a fully human antibody targeting human CD40 with potent immunosuppressive effects. *Am J Transplant.* 2014;14:1290–1299.
101. Goldwater R, Keirns J, Blahunka P, et al. A phase 1, randomized ascending single-dose study of antagonist anti-human CD40 ASKP1240 in healthy subjects. *Am J Transplant.* 2013;13:1040–1046.
102. Rostaing L, Malvezzi P. Costimulation blockade in kidney transplantation: beyond belatacept. *Transplantation.* 2016;100:2516–2518.
103. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:252–264.
104. Gao W, Demirci G, Strom TB, et al. Stimulating PD-1-negative signals concurrent with blocking CD154 co-stimulation induces long-term islet allograft survival. *Transplantation.* 2003;76:994–999.
105. Dudler J, Li J, Pagnotta M, et al. Gene transfer of programmed death ligand-1Ig prolongs cardiac allograft survival. *Transplantation.* 2006;82:1733–1737.
106. Weinstein JS, Bertino SA, Hernandez SG, et al. B cells in T follicular helper cell development and function: separable roles in delivery of ICOS ligand and antigen. *J Immunol.* 2014;192:3166–3179.
107. Lo DJ, Anderson DJ, Song M, et al. A pilot trial targeting the ICOS-ICOS-L pathway in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15:984–992.
108. O'Neill NA, Zhang T, Braileanu G, et al. Pilot study of delayed ICOS/ICOS-L blockade with α CD40 to modulate pathogenic alloimmunity in a primate cardiac allograft model. *Transplant Direct.* 2018;4:e344.
109. Nabeyama K, Yasunami Y, Toyofuku A, et al. Beneficial effects of costimulatory blockade with anti-inducible costimulator antibody in conjunction with CTLA4Ig on prevention of islet xenograft rejection from rat to mouse. *Transplantation.* 2004;78:1590–1596.
110. Guillonnet C, Aubry V, Renaudin K, et al. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation.* 2005;80:546–554.
111. Chen L, Lu Y, Wang F, et al. Expression of co-stimulatory molecule B7-H4 in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2013;154:25–30.
112. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:515–548.
113. Song H, Park G, Kim Y-S, et al. B7-H4 reverse signaling induces the apoptosis of EBV-transformed B cells through Fas ligand up-regulation. *Cancer Lett.* 2008;266:227–237.

114. Park GB, Song H, Kim Y-S, et al. Cell cycle arrest induced by engagement of B7-H4 on Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphoma cell lines. *Immunology*. 2009;128:360–368.
115. Xiao ZX, Zheng X, Hu L, et al. Immunosuppressive effect of B7-H4 pathway in a murine systemic lupus erythematosus model. *Front Immunol*. 2017;8:1765.
116. Ou D, Wang X, Metzger DL, et al. Suppression of human T-cell responses to β -cells by activation of B7-H4 pathway. *Cell Transplant*. 2006;15:399–410.
117. Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. Local expression of B7-H4 by recombinant adenovirus transduction in mouse islets prolongs allograft survival. *Transplantation*. 2009;87:482–490.
118. Wang X, Hao J, Metzger DL, et al. Endogenous expression of B7-H4 improves long-term murine islet allograft survival. *Transplantation*. 2013;95:94–99.
119. Yamaura K, Watanabe T, Boenisch O, et al. In vivo function of immune inhibitory molecule B7-H4 in alloimmune responses. *Am J Transplant*. 2010;10:2355–2362.
120. Nolte MA, Arens R, van Os R, et al. Immune activation modulates hematopoiesis through interactions between CD27 and CD70. *Nat Immunol*. 2005;6:412–418.
121. Kouro T, Medina KL, Oritani K, et al. Characteristics of early murine B-lymphocyte precursors and their direct sensitivity to negative regulators. *Blood*. 2001;97:2708–2715.
122. Weisel F, Shlomchik M. Memory B cells of mice and humans. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:255–284.
123. Tarte K, Zhan F, De Vos J, et al. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood*. 2003;102:592–600.
124. Arens R, Nolte MA, Tesselar K, et al. Signaling through CD70 regulates B cell activation and IgG production. *J Immunol*. 2004;173:3901–3908.
125. Jacquot S, Kobata T, Iwata S, et al. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses: enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *J Immunol*. 1997;159:2652–2657.
126. Yamada Y, Ochiai T, Boskovic S, et al. Use of CTLA4Ig for induction of mixed chimerism and renal allograft tolerance in nonhuman primates: CTLA4Ig for induction of mixed chimerism. *Am J Transplant*. 2014;14:2704–2712.
127. Sharif A, Shabir S, Chand S, et al. Meta-analysis of calcineurin-inhibitor-sparing regimens in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:2107–2118.
128. Dai H, Chen J, Shao W, et al. Blockade of CD27/CD70 pathway to reduce the generation of memory T cells and markedly prolong the survival of heart allografts in presensitized mice. *Transpl Immunol*. 2011;24:195–202.
129. Svachova V, Sekerkova A, Hruha P, et al. Dynamic changes of B-cell compartments in kidney transplantation: lack of transitional B cells is associated with allograft rejection. *Transpl Int*. 2016;29:540–548.
130. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, et al. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009;9:201–209.
131. Walsh RC, Alloway RR, Girmata AL, et al. Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection. *Kidney Int*. 2012;81:1067–1074.
132. Woodle ES, Shields AR, Ejaz NS, et al. Prospective iterative trial of proteasome inhibitor-based desensitization. *Am J Transplant*. 2015;15:101–118.
133. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A, et al. Clonal deletion with bortezomib followed by low or no maintenance immunosuppression in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2010;90:221–222.
134. Morrow WR, Frazier EA, Mahle WT, et al. Rapid reduction in donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies and reversal of antibody-mediated rejection with bortezomib in pediatric heart transplant patients. *Transplantation*. 2012;93:319–324.
135. Eskandary F, Regele H, Baumann L, et al. A randomized trial of bortezomib in late antibody-mediated kidney transplant rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29:591–605.
136. van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T, et al. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev*. 2016;270:95–112.
137. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387:1551–1560.
138. Blankestijn MA, van de Donk NW, Sasser K, et al. Could daratumumab be used to treat severe allergy? *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139:1677–1678.e3.
139. de Leur K, Dor FJ, Dieterich M, et al. IL-21 receptor antagonist inhibits differentiation of B cells toward plasmablasts upon alloantigen stimulation. *Front Immunol*. 2017;8:306.
140. Petrelli A, Carvello M, Vergani A, et al. IL-21 is an antitolerogenic cytokine of the late-phase alloimmune response. *Diabetes*. 2011;60:3223–3234.
141. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:491–502.
142. Schneider P, MacKay F, Steiner V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*. 1999;189:1747–1756.
143. Moore PA, Belvedere O, Orr A, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*. 1999;285:260–263.
144. Wallweber HJA, Compaan DM, Starovasnik MA, et al. The crystal structure of a proliferation-inducing ligand, APRIL. *J Mol Biol*. 2004;343:283–290.
145. Thompson JS, Bixler SA, Qian F, et al. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*. 2001;293:2108–2111.
146. Pers J-O, Daridon C, Devauchelle V, et al. BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1050:34–39.
147. Stohl W. Therapeutic targeting of the BAFF/APRIL axis in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18:473–489.
148. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16:448–457.
149. Jordan SC, Choi J, Kim I, et al. Interleukin-6, a cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection: therapeutic implications of IL-6 receptor blockade. *Transplantation*. 2017;101:32–44.
150. Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014;345:1058–1062.
151. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet*. 2013;381:1541–1550.
152. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest*. 2011;121:3375–3383.
153. Vo AA, Choi J, Kim I, et al. A phase I/II trial of the interleukin-6 receptor-specific humanized monoclonal (tocilizumab) + intravenous immunoglobulin in difficult to desensitize patients. *Transplantation*. 2015;99:2356–2363.
154. Shen H, Goldstein DR. IL-6 and TNF- α synergistically inhibit allograft acceptance. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1032–1040.
155. Zhao X, Boenisch O, Yeung M, et al. Critical role of proinflammatory cytokine IL-6 in allograft rejection and tolerance. *Am J Transplant*. 2012;12:90–101.

Résumé

La réponse humorale, médiée par la synthèse d'anticorps dirigés contre les molécules HLA du donneur (DSA), est l'une des principales causes de perte du greffon en transplantation rénale. La compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de ces phénomènes de rejet comme le développement d'outils thérapeutiques permettant de mieux les contrôler est donc un objectif primordial. Parmi les agents immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale, Le belatacept, protéine de fusion bloquant le signal 2 de costimulation des lymphocytes, a également montré sa capacité à prévenir de manière plus efficace la sécrétion de DSA par différents mécanismes associant une action directe sur les plasmablastes ainsi que sur la coopération entre lymphocytes B (LB) et lymphocytes T folliculaires helper (Tfh). Cette coopération cellulaire entre LB et TFH se produit au sein des centres germinatifs (GC), siège de la différenciation lymphocytaire B.

Au cours de cette thèse, nous avons souhaité étudier l'impact du Belatacept sur la formation et la maturation des CG humains. Dans le cadre de ce projet, nous avons mis en place un modèle expérimental innovant basé sur la constitution de CG humain dans un modèle de souris immunodéficientes. Nous avons pu démontrer que contrairement à d'autres agents immunosuppresseurs comme les inhibiteurs de la Calcineurine, le Belatacept inhibait la formation de ces CG.

Ces résultats ouvrent la voie à d'autres études et notamment celles permettant d'étudier d'autres molécules immunosuppressives afin de permettre un contrôle plus optimal des réponses humorales dans le domaine de la transplantation ainsi que dans celui des maladies auto-immunes.

Summary

The humoral response, mediated by alloantibodies directed against donor HLA molecules (DSA), is one of the main causes of graft loss in kidney transplantation. Understanding the physiopathological mechanisms involved during humoral rejection as the development of therapeutic tools are therefore the main objective in the field of solid organ transplantation. Among the immunosuppressive agents used in renal transplantation, belatacept, a monoclonal antibody targeting T costimulatory molecules has also shown its ability to more effectively prevent the secretion of DSA by different mechanisms including a direct action on plasma cells but also on B lymphocytes (LB) and follicular helper T lymphocytes (Tfh) cooperation This cellular cooperation occurs within germinal centers (GC), the seat of B lymphocyte differentiation.

During my Ph.D., we aimed to study the impact of Belatacept on the formation and maturation of human CGs. As part of this project, we have set up an innovative experimental model based on the development of human GC in immunodeficient mice. We demonstrate that unlike other IS agents such as Calcineurin inhibitors, Belatacept inhibits the formation of these CGs.

These results open new strategies to study other immunosuppressive molecules for better control of humoral responses in the field of transplantation and autoimmune diseases.