Université Paris Descartes

Ecole doctorale Gc2iD/ED157

INSERM U1013

« Lymphocytes B mémoire dans la réponse humorale anti-HLA en transplantation d'organe »

Par Renaud Snanoudj

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Madame le Professeur Lucienne CHATENOUD

Présentée et soutenue publiquement le 19 novembre 2013

Devant un jury composé de :

Catherine FRIDMAN, Professeur des Universités, Présidente du Jury
Gilles BLANCHO, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Rapporteur
Philippe GRIMBERT, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Rapporteur
Jean-Luc TAUPIN, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Examinateur
Rémi SALOMON, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Examinateur
Lucienne CHATENOUD, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Directrice

Remerciements

A Madame le Professeur Lucienne Chatenoud pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir accepté de diriger ce travail toujours avec un regard positif et stimulant,

Au Docteur Sophie Candon pour son encadrement, ses conseils et sa disponibilité sans faille,

A Madame le Professeur Catherine Fridman et à Messieurs les Professeurs Gilles Blancho, Philippe Grimbert, Rémi Salomon et Jean-Luc Taupin pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse,

Au Professeur Christophe Legendre pour son soutien constant et la confiance qu'il m'accorde depuis six ans,

Au Professeur Frans Claas à Leiden ainsi qu'à son équipe pour leur accueil chaleureux et leurs conseils,

A Mesdames Laurence Vendrame, Mimouna Bensaid, et Anne Leclercq, ainsi qu'aux autres membres du Laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Necker, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et leur aide précieuse,

A mes collègues et amis du service de Transplantation Rénale de l'Hôpital Necker qui m'ont soutenu durant ce travail,

A ma famille et particulièrement Nadia, Elias et Joachim, soutiens patients et indéfectibles de la première à la dernière ligne.

RESUME
Les alloanticorps anti-HLA sont dirigés vis-à-vis de différents épitopes des molécules du système HLA. Cette immunisation survient lors d'une transplantation d'organe, de transfusions sanguines ou d'une grossesse. On retrouve aussi ces anticorps, lorsque les techniques de détection sont sensibles, en l'absence de tout évènement immunisant. En transplantation d'organe, rénale en particulier, la présence d'anticorps anti-HLA, du fait des lésions de rejet humoral qu'ils induisent, constitue une des premières causes de perte de fonction des greffons à moyen et long terme. Néanmoins, les cellules lymphocytaires qui sont la source de ces anticorps anti-HLA demeurent mal identifiées.
Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié, dans une cohorte de patients en attente de transplantation rénale, la distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B circulantes par cytométrie de flux en relation avec la nature des évènements immunisants vis-à-vis du système HLA, la présence et la diversité des anticorps anti-HLA. Nous avons étudié en parallèle les concentrations sériques de BAFF ("B cell activating factor belonging to the TNF family"), principal facteur impliqué dans la survie et la différenciation des lymphocytes B matures. Nous avons retrouvé une association entre la présence et la diversité des anticorps anti-HLA, et l'augmentation de la proportion de lymphocytes B naïfs activés Bm2, par rapport aux autres sous-populations lymphocytaires B, et indépendamment de l'existence d'évènements immunisants. Les concentrations sériques de BAFF étaient également associées positivement à la présence et à la diversité des anticorps anti-HLA. Ces données suggèrent que l'augmentation des lymphocytes B naïfs activés et des concentrations sériques de BAFF favorise le développement des anticorps anti-HLA à la suite d'un événement immunisant. A l'instar du mécanisme évoqué en auto-immunité, BAFF pourrait intervenir en présence de l'alloantigène en favorisant la survie de clones B alloréactifs.
Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'implication des lymphocytes B mémoire alloréactifs dans la réponse humorale anti-HLA. Pour détecter les lymphocytes B mémoire circulants, nous avons utilisé un test de stimulation polyclonale permettant leur différenciation en plasmablastes puis nous avons recherché et étudié la spécificité des anticorps anti-HLA produits dans les surnageants de culture. Un premier résultat important a été la possibilité de détecter, chez les patients présentant des anticorps anti-HLA, des lymphocytes B mémoire alloréactifs circulants plusieurs années après un événement immunisant. En deuxième lieu, la présence de ces lymphocytes B mémoire était associée au nombre d'évènements immunisants. En effet, les patients ayant développé, en l'absence d'événement immunisant des anticorps anti-HLA - dont nous montrons par ailleurs le caractère potentiellement pathogène - n'ont pas présenté de lymphocytes B mémoire alloréactifs circulants. Enfin, à l'aide du logiciel HLAMatchmaker, nous avons montré que les anticorps produits par les lymphocytes B mémoire étaient dirigés contre un nombre restreint d'épitopes partagés par plusieurs antigènes HLA, ce qui suggère une oligoclonalité du contingent B mémoire alloréactif. Chez les mêmes patients, les anticorps anti-HLA circulants présentaient une diversité de spécificité plus large, étant dirigés contre de multiples épitopes HLA. Ces résultats suggèrent l'existence d'au moins deux types de réponse humorale vis-à-vis des alloantigènes HLA : l'une aboutissant à la production de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes à la suite d'une réaction de centre germinatif T-dépendante, l'autre impliquant seulement des plasmocytes, possiblement issus de réponses extra-folliculaires. Les facteurs orientant vers l'un ou l'autre type de réponse sont encore mal définis mais pourraient impliquer la dose et la voie d'exposition aux alloantigènes.

MOTS CLES : transplantation rénale, transplantation d'organe, lymphocytes B, lymphocytes B mémoire, HLA, anticorps anti-HLA, BAFF

KEYWORDS : renal transplantation, organ transplantation, B cells memory B cells, HLA, anti-HLA antibodies, BAFF

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

TABLE DES MATIERES **4**

PRINCIPALES ABREVIATIONS **7**

PREMIERE PARTIE: INTRODUCTION **8**

1. REPONSE DES LYMPHOCYTES B AUX ANTIGENES PROTEIQUES **8**

1.1 LA PREMIERE PHASE (OU PHASE « PRE-CENTRE GERMINATIF ») 9

1.2 LA SECONDE PHASE (OU PHASE DU CENTRE GERMINATIF) 14

1.3 LA TROISIEME PHASE : SURVIE DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE ET RAPPEL ANTIGENIQUE 17

2. MAINTIEN DE LA MEMOIRE IMMUNITAIRE B **19**

2.1 PERSISTANCE DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE 19

2.2 ROLE DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE DANS LE MAINTIEN DE L'IMMUNITE HUMORALE DE LONGUE DUREE 21

2.3 ROLE DES PLASMOCYTES DANS LE MAINTIEN DE L'IMMUNITE HUMORALE 25

3. ANTIGENES ET REPONSE HUMORALE LORS DES TRANSPLANTATIONS D'ORGANE **31**

3.1 LES ANTIGENES HLA 31

3.2 LES METHODES DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-HLA 39

3.3 PATHOGENIE DES ANTICORPS ANTI-HLA 48

4. LES VOIES D'EXPOSITION AUX ALLOANTIGENES **54**

4.1 LA GROSSESSE 55

4.2 LES TRANSFUSIONS SANGUINES 55

4.3 LES TRANSPLANTATIONS ANTERIEURES 57

4.4 DETECTION D'ANTICORPS ANTI-HLA CHEZ DES PATIENTS VIERGES DE TOUT EVENEMENT IMMUNISANT CONVENTIONNEL 57

5. IMPLICATION DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE ET DES PLASMOCYTES DANS LA SYNTHESE DES ALLOANTICORPS .. 61

5.1 TROIS SITUATIONS CLINIQUES DIFFERENTES 61

5.2 DETECTION DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE ET DES PLASMOCYTES ALLOREACTIFS 62

6. ROLE DE BAFF ET DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B EN TRANSPLANTATION 65

6.1 ROLE DE BAFF ET DE SES RECEPTEURS DANS LE DEVELOPPEMENT ET L'HOMEOSTASIE DES LYMPHOCYTES B 65

6.2 ETUDE PHENOTYPIQUE DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B PERIPHERIQUES CHEZ L'HOMME 68

6.3 ROLE DE BAFF ET DES DIFFERENTES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B EN AUTO-IMMUNITE 71

6.4 ROLE DE BAFF ET DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B EN TRANSPLANTATION 76

7. IMPORTANCE DU REJET HUMORAL ET DES ANTICORPS SPECIFIQUES DU DONNEUR EN TRANSPLANTATION RENALE 79

7.1 CIRCONSTANCES D'APPARITION DES ANTICORPS SPECIFIQUES DU DONNEUR 80

7.2 LES DIFFERENTES FORMES DE REJET HUMORAL 81

7.3 IMPLICATION DU REJET CHRONIQUE HUMORAL DANS LES PERTES TARDIVES DE GREFFONS 86

7.4 VALEUR PRONOSTIQUE DES DSA 86

PARTIE 2 – PREMIER ARTICLE 89

PARTIE 2 – SECOND ARTICLE 122

DISCUSSION 155

CONCLUSION 178

BIBLIOGRAPHIE 180

ANNEXE 1 204

ANNEXE 2 216

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les trois phases du développement de la mémoire humorale. 9

Figure 2 : Organisation des organes lymphoïdes secondaires...... 11

Figure 3 : Les 3 mécanismes de maintien de la mémoire humorale 23

Figure 4 : Résidus polymorphiques sur les molécules HLA de classe I et II 34

Figure 5 : Les 3 techniques de détection des anticorps anti-HLA 42

Figure 6 : Activation de la voie classique du complément par les anticorps anti-HLA 50

Figure 7 : Classifications Bm1-Bm5 et IgD/CD27 des lymphocytes B périphériques matures 70

Figure 8 : Rôle de BAFF dans la sélection des clones autoréactifs..... 73

Figure 9 : Histoire naturelle du rejet à médiation humorale 85

Figure 10 : Initiation et maintien de la mémoire humorale alloréactive avant transplantation 167

PRINCIPALES ABREVIATIONS

CFD : Cellules Folliculaires Dendritiques

HEVs : High Endothelial Venules

BCR : B Cell Receptor

TFH : T Follicular Helper cells

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

HLA : Human Leukocyte Antigen

DSA : Donor-Specific Antibodies

LLPCs : Long-Lived Plasma Cells

TLR : Toll-Like Receptors

BAFF : B-cell Activation Factor (appelé aussi BLyS ou B Lymphocyte Stimulator)

APRIL : A Proliferation Inducing Ligand

TACI : Transmembrane Activator 1 and Calcium-signaling modulator and cyclophilin ligand-Interactor

BCMA : B Cell Maturation Antigen

LCT : Lymphocytotoxicité

CDC : Complement Dependent Cytotoxicity

CDCXM : Complement Dependent Cytotoxicity Crossmatch

FCXM : Flow Cytometry Crossmatch

Première partie: INTRODUCTION

1. Réponse des lymphocytes B aux antigènes protéiques

Les lymphocytes B reconnaissent les antigènes sous une forme native par leur immunoglobuline de surface, qui constitue le récepteur pour l'antigène. Cet antigène peut se présenter sous forme soluble ou membranaire. Ceci diffère des modalités de reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T, qui nécessite que l'antigène soit dégradé et présenté par des cellules présentatrices « professionnelles », qui délivrent des signaux de costimulation aux lymphocytes T. Les lymphocytes B eux, peuvent rencontrer et répondre à l'antigène de manière très différente en fonction de la nature et de la taille de l'antigène, et de l'environnement où le contact a lieu.

Ce contact avec l'antigène est la première étape d'un processus qui conduit au développement de la mémoire sérologique, c'est-à-dire le maintien prolongé de titres protecteurs d'anticorps. Nous nous contenterons dans cette première partie de décrire la réponse à un antigène protéique T-dépendant. Ce processus repose sur le développement de deux principaux types de lymphocytes B : les lymphocytes B mémoire et les plasmocytes. Après une phase de développement qui précède le contact avec l'antigène et qui a lieu dans la moelle osseuse, les lymphocytes B naïfs subissent après le contact avec l'antigène un nouveau développement qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Les mécanismes de différenciation au cours de cette seconde partie ne sont encore que partiellement identifiés. On peut néanmoins individualiser 3 phases **(figure 1)** ayant plusieurs étapes en commun : la reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte B, l'internalisation de l'antigène et sa présentation par le lymphocyte B au lymphocyte T et, à des degrés divers, une collaboration T/B spécifique de l'antigène. Nos connaissances sur ces processus *in vivo* ont grandement bénéficié des études d'imagerie dynamique.

1.1 La première phase (ou phase « pré-centre germinatif »)

C'est la première étape de la réponse humorale primaire. La rencontre de l'antigène avec les lymphocytes T et B a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires, la rate et les ganglions. Pour augmenter la probabilité du contact entre un antigène et un lymphocyte spécifique à un endroit donné de l'organisme, les organes lymphoïdes secondaires possèdent une microarchitecture spécialisée permettant de faciliter les contacts cellulaires et l'activation lymphocytaire.

Figure 1 : Les trois phases du développement de la mémoire humorale.

a) 1ère phase (pré-centre germinatif) ; b et c) 2ème phase (formation du follicule lymphoïde secondaire puis du centre germinatif) ; c) 3ème phase : Rappel antigénique. *D'après ref (1).*

L'architecture des ganglions lymphatiques.

Les ganglions sont stratégiquement positionnés à des embranchements sur tout le système lymphatique. Le liquide lymphatique, qui contient des chémokines et des antigènes collectés dans l'organisme, pénètre dans les ganglions par les lymphatiques afférents et est filtré par le ganglion avant d'être émis par les lymphatiques efférents. Les ganglions lymphatiques sont organisés en trois parties distinctes, définies par l'expression de chémokines spécifiques **(figure 2)** (2).

- Sous la capsule et le sinus sous-capsulaire se trouve une couche riche en macrophages qui surplombe la zone des lymphocytes B ou cortex. Les lymphocytes B, essentiellement naïfs et exprimant une IgM de surface avant l'exposition à l'antigène, y sont organisés en agrégats appelés follicules lymphoïdes. Les follicules contiennent également les cellules folliculaires dendritiques (CFD).
- La zone des lymphocytes T ou paracortex, adjacente aux follicules, contient des vaisseaux appelés High Endothelial Venules (HEVs). Il s'agit de capillaires spécialisés qui permettent l'entrée et la sortie des lymphocytes de la périphérie, ainsi que l'entrée de cellules présentatrices d'antigène. Le paracortex contient également un « réseau de canalisations » ou « conduit network » composé d'un cœur de fibres de collagène, soutenu par des cellules fibroblastiques réticulaires, auxquelles sont souvent associées des cellules dendritiques, présentant des prolongements dans le liquide lymphatique. Ce « conduit network » permet la circulation du liquide lymphatique du sinus sous-capsulaire vers les HEVs et ainsi la diffusion de molécules solubles comme les chémokines et les antigènes (3).
- La médullaire, la partie la plus centrale du ganglion, contient des lymphocytes T et B organisés en cordons médullaires, mais également des cellules dendritiques et des macrophages.

Ainsi, au bout de 24 heures, un lymphocyte qui n'a pas rencontré d'antigène dans un ganglion recircule dans l'organisme entre les organes lymphoïdes secondaires (2).

Figure 2 : Organisation des organes lymphoïdes secondaires.

a) Ganglions lymphatiques. b) Rate. Abréviations : HEV : High Endothelial Venules ; FLPA : Feuillet Lymphoïde Péri-Artériolaire. *D'après (1) et* (4)

L'architecture de la rate

Toutes les connaissances sur les mécanismes de la présentation de l'antigène par les lymphocytes B ont été obtenues grâce aux données de microscopie intravitale multiphoton, dont l'application est plus difficile dans la rate. Néanmoins, l'organisation de la rate est très similaire à celle des ganglions, la différence majeure étant l'absence de connexion directe avec le système lymphatique **(figure 2)**. Les antigènes et les lymphocytes pénètrent et quittent la rate par la circulation sanguine. La structure lymphoïde de la rate est constituée par la pulpe blanche, la pulpe rouge étant le site de destruction des hématies. La pulpe blanche est organisée autour d'artérioles, et comporte du centre vers la périphérie :

- une zone T ou feuillet lymphoïde périartériolaire, qui comme le paracortex ganglionnaire, contient un « conduit network » associant cellules fibroblastiques réticulaires et cellules dendritiques (4) ;
- des follicules lymphoïdes contenant les lymphocytes B ;
- une zone marginale propre à la rate et qui contient des lymphocytes B mémoire IgM^+, qui, chez l'homme, à l'inverse des rongeurs, circulent et expriment un récepteur B pour l'antigène ou BCR (« B cell receptor ») muté. Ces cellules sont spécialisées dans la production rapide d'anticorps en réponse aux antigènes sanguins (5). La présentation de l'antigène par les cellules dendritiques aux lymphocytes B de la zone marginale aboutit à la génération rapide de plasmocytes qui produisent des IgM indépendamment d'une aide des lymphocytes T, et donc à la formation rapide de complexes immuns circulants contenant l'antigène (6).

Présentation de l'antigène aux lymphocytes B

Les modalités de la rencontre entre l'antigène et le lymphocyte B naïf sont fonction de la taille de l'antigène.

- Diffusion libre des antigènes

Les petits antigènes (comme des toxines de petit poids moléculaire) peuvent pénétrer sous forme soluble dans les ganglions lymphatiques par les lymphatiques afférents, puis diffuser à travers les pores du sinus sous-capsulaire qui surplombe les follicules (7). Cette diffusion se fait librement et la présentation ne nécessite ni cellules dendritiques ni migration des lymphocytes B de leur position folliculaire (8).

- Présentation par les macrophages des sinus sous-capsulaires

L'accès des plus gros antigènes (antigènes particulaires, complexes immuns, virus) aux lymphocytes B ne se fait pas directement dans les follicules. Il existe une couche de macrophages résidant directement sous le sinus sous-capsulaire, capables de capter l'antigène dans le liquide lymphatique et de le présenter intact à leur surface aux lymphocytes B (9). Les lymphocytes B folliculaires réduisent alors leur migration et établissent des contacts durables avec les macrophages des sinus sous-capsulaires (9,10). Ce contact permet aux lymphocytes B folliculaires d'acquérir et d'internaliser l'antigène, avant leur migration à la jonction des zones T et B des ganglions où ils reçoivent l'aide spécifique des lymphocytes T et initient leur activation (11).

- Présentation par les cellules folliculaires dendritiques

Les antigènes extracellulaires liés à la membrane sont retenus pendant une période prolongée dans les follicules. Les CFD sont responsables de cette rétention sous la forme de complexes immuns (12). La rétention et la présentation des complexes immuns par les CFD se fait d'une part grâce à leurs récepteurs au complément CR1/CD35 et CR2/CD21 (13), et d'autre part grâce aux récepteurs FcγRIIB pour le fragment Fc des immunoglobulines (14). La présentation de l'antigène à la surface des CFD par l'un ou l'autre des deux mécanismes augmente l'initiation de la réponse immune. Les complexes immuns préformés et les antigènes recouverts avec les fragments C3d du complément induisent tous deux une activation des lymphocytes B, probablement par une augmentation de la présentation de l'antigène par les CFD (15). L'importance de cette voie de présentation au cours de la réponse humorale primaire doit cependant être précisée. Néanmoins, les CFD peuvent également

servir de « dépôts » durables de l'antigène, et ainsi en prolonger la présentation aux lymphocytes B, ce qui est important pour une réponse efficace et durable. En effet, la réponse primaire initiale est de faible affinité. Les CFD participent également à la maturation d'affinité des lymphocytes B dans les centres germinatifs et à la sélection des clones B les plus affins, plusieurs jours après la réponse initiale (12,16).

- Présentation par les cellules dendritiques

La présentation peut également se faire par des cellules dendritiques. C'est le paracortex, site d'entrée des lymphocytes B dans les ganglions par les HEVs, qui est vraisemblablement le siège de cette présentation. En effet, il contient des cellules dendritiques résidentes capables de présenter l'antigène aux lymphocytes B de façon non dégradée, mais également des cellules dendritiques ayant récemment migré de la périphérie où elles ont collecté des antigènes (17). Le paracortex constitue l'environnement idéal dans la mesure où les lymphocytes B reçoivent l'aide des lymphocytes T-auxiliaires ou helper pour une activation maximale, leur co-localisation ayant bien été montrée. Cette activation permet aux plasmocytes extra-folliculaires de réaliser une réponse humorale rapide. De façon alternative, les lymphocytes B après activation par les lymphocytes T gagnent les follicules pour la formation du centre germinatif.

Le contact initial avec les lymphocytes T folliculaires helper (TFH)

Le premier contact du lymphocyte B avec l'antigène spécifique conduit à sa migration à la jonction T/B. Les lymphocytes B doivent capter l'antigène, le préparer et le présenter aux TFH spécifiques de l'antigène pour recevoir leur aide. L'antigène est capté par le lymphocyte B par l'intermédiaire de son immunoglobuline de surface ou BCR, puis internalisé. Il est couplé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II dans des vésicules appelées compartiments du CMH de classe II (MIIC). Ces vésicules sont transportées à la surface du lymphocyte B pour la présentation antigénique aux TFH (18,19). Les TFH sont apparus comme une nouvelle voie de différenciation des lymphocytes T auxiliaires, survenant après leur activation par les cellules dendritiques, et spécialisés dans la régulation des réponses B spécifiques. La production d'IL-21 par les TFH joue un rôle majeur dans leur fonction et l'absence d'IL-21 conduit à une nette dégradation de l'immunité B (20).
Le processus de commutation isotypique (c'est-à-dire le changement de classe d'immunoglobuline, d'une IgM vers un autre isotype) est probablement enclenché durant cette première phase, après le contact avec les TFH (21). Il s'agit d'un événement recombinant

génétique irréversible, faisant intervenir une enzyme, l'AID (« activation induced cytidine deaminase ») (22). Les cytokines orientant cette commutation et synthétisées par les TFH ont été observées dans les régions folliculaires (23) : l'IL-4 pour la commutation vers les IgG1 et les IgE ; l'IFNγ pour les IgG2a ; le TGFβ pour les IgA.

Ce contact B/TFH conduit à deux possibilités de différenciation pour les lymphocytes B :

1) ceux ayant la plus haute affinité (24) deviennent des plasmocytes extra-folliculaires sans réaction de centre germinatif (1). Ces plasmocytes, appelés aussi plasmablastes, sont de courte durée de vie (1/2 vie de 3 à 5 jours), et peuvent subir une commutation isotypique sous l'effet de cytokines, mais pas d'hypermutation somatique, ce qui explique la faible affinité des anticorps sécrétés. Ces cellules assurent donc une réponse humorale rapide (7 jours) de première ligne. Elles conservent la capacité de se diviser.

2) d'autres lymphocytes B activés s'engagent dans la voie du centre germinatif, qui aboutit au développement de la mémoire humorale sous la forme de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes. Les TFH migrent également vers l'intérieur des follicules avant l'accumulation des lymphocytes B dans les centres germinatifs.

1.2 La seconde phase (ou phase du centre germinatif).

Le cycle du centre germinatif

Les centres germinatifs **(figure 1)** sont des structures dynamiques qui se développent, à la suite du contact entre lymphocytes B et TFH, dans les régions folliculaires des organes lymphoïdes secondaires. Les centres germinatifs se forment entre J9 et J30 après le contact antigénique avec un pic entre J9 et 14. Le cycle du centre germinatif commence quand les follicules secondaires se polarisent pour former deux régions micro-anatomiques distinctes (25):

- **la zone sombre proximale**, contenant des lymphocytes B appelés centroblastes, où se produit leur expansion, leur diversification et possiblement leur commutation isotypique.
- **la zone claire distale**, contenant des lymphocytes B en phase de maturation appelés centrocytes, ainsi que le réseau des CFD chargées d'antigènes, et les TFH spécifiques. Elle est le siège du balayage ou « scanning » de l'antigène par les lymphocytes B et du contact spécifique avec les lymphocytes TFH.

Expansion clonale et diversification du BCR

L'expansion clonale des lymphocytes B spécifiques dans la zone sombre s'accompagne d'une diversification du BCR par des hypermutations somatiques, c'est-à-dire des mutations ponctuelles dans les segments des régions variables des gènes d'immunoglobuline. La commutation de classe peut avoir également lieu à cette étape comme en phase pré-centre germinatif. La sortie du cycle cellulaire coïncide avec le passage des lymphocytes B dans la zone claire.

Mécanismes d'action de l'activation-induced cytidine deaminase (AID)

L'hypermutation somatique et la commutation isotypique font intervenir la même enzyme: l'AID (26–28). L'hypermutation somatique introduit à un rythme rapide des mutations somatiques dans tout l'exon réarrangé de la région V du gène des immunoglobulines et induit ainsi l'expression de récepteurs BCR mutés à la surface des lymphocytes B des centres germinatifs, augmentant leur affinité pour l'antigène. L'ADN double brin est rendu accessible à l'AID par une transcription localisée qui déroule l'hélice d'ADN. L'AID agit sur l'ADN monocaténaire et convertit par désamination les résidus cytidine en uridine. Les enzymes de réparation de l'ADN (UNG ou Uracile-DNA-glycosylase et APE-1 ou Apuric/aPyrimidic-Endonuclease-1) suppriment l'uracile pour former un résidu apyrimidique (UNG) puis excisent le ribose pour former une coupure monocaténaire (APE-1) (26,28).

L'hypermutation somatique se produira par mutation de transition (C en T ou G en A) lorsque l'uracile générée par l'AID sera reconnue comme un T par les ADN polymérases, ou par mutation de transversion (transformation d'une base purique en pyrimidique) après génération d'un site abasique par l'UNG. Un autre processus de diversification appelé conversion génique est déclenché par des coupures monocaténaires de l'ADN, suivies d'une réplication utilisant comme matrice pour la réparation des pseudogènes homologues. Enfin, si des coupures monocaténaires sont converties simultanément en coupures bicaténaires échelonnées flanquant des gènes des régions S (régions de « switch » ou commutation), la machinerie de réparation bicaténaire peut rejoindre les deux bouts en créant une commutation de classe (27).

« Balayage » de l'antigène par les lymphocytes B sur les CFD

Comme mentionné plus haut, les antigènes sous la forme de complexes immuns peuvent être retenus pendant une période prolongée dans les follicules par les CFD (12). Des études d'imagerie directe ont permis pour la première fois une visualisation dynamique du contact

entre les lymphocytes B et les CFD dans la zone claire du centre germinatif (29). Ces études ont bien mis en évidence dans les centres germinatifs une activité de balayage intense par les lymphocytes B du réseau de CFD recouvertes d'antigènes sous la forme de complexes immuns. C'est l'étape où les variants B sont le plus en contact avec les antigènes pour tester les propriétés de liaison de leur BCR muté. L'affinité du BCR pour l'antigène influence la capture de l'antigène et sa présentation par le lymphocyte B via le CMH de classe II.
Il a récemment été montré que, lors des divisions cellulaires du centre germinatif, la ségrégation des compartiments MIIC était asymétrique, et que seule une cellule fille héritait du compartiment MIIC indivisible, comportant l'antigène et le CMH de classe II (30). Les cellules n'ayant pas hérité du MIIC ont donc besoin de muter leur BCR pour augmenter son affinité pour l'antigène, le capter et assurer leur propre survie par la présentation aux TFH. La cellule fille qui aura hérité du MIIC continuera à recevoir l'aide des TFH sans nécessité de capter à nouveau l'antigène.

Contact spécifique avec les lymphocytes TFH

Après cette phase de balayage, seuls quelques lymphocytes B sont capables d'induire un contact stable, de type synapse immunologique, avec les TFH (29). La capacité de présentation antigénique aux lymphocytes TFH, plus que la compétition pour l'antigène, a récemment été montrée comme étant le processus majoritaire et limitant de sélection des lymphocytes B ayant des variants de haute affinité dans les centres germinatifs (25,31).
En fonction de l'affinité du BCR pour l'antigène et de la capacité de présentation aux TFH, chaque cycle de centre germinatif peut ainsi avoir 4 issues :
1) l'apoptose du lymphocyte B en cas de perte de la fixation antigénique par le BCR.
Au contraire, un signal antigène/BCR positif aboutit au contact avec un lymphocyte TFH spécifique (29). Ce contact peut conduire à :
2) la réentrée du lymphocyte B dans la zone sombre où un nouveau cycle de centre germinatif est initié, et où le processus de diversification du BCR peut se poursuivre (31). Alternativement, les lymphocytes B ayant eu une maturation d'affinité suffisante peuvent sortir du centre germinatif :
3) soit comme lymphocytes B mémoire soit
4) soit comme plasmocytes pour les cellules ayant la plus forte capacité de présentation antigénique. Ces plasmocytes sécrètent des anticorps de haute affinité. Une partie de ces cellules reste dans les organes lymphoïdes secondaires, mais la majeure partie gagne la moelle osseuse. Les plasmocytes qui réussissent à s'établir dans une niche médullaire où ils reçoivent

des signaux de survie, auront une durée de vie prolongée (LLPCs ou long-lived plama cells) et participeront à la mémoire immunitaire humorale par la sécrétion prolongée d'anticorps de haute affinité.

1.3 La troisième phase : survie des lymphocytes B mémoire et rappel antigénique

Devenir des lymphocytes B mémoire

Un des deux types cellulaires issus du centre germinatif est constitué des lymphocytes B mémoire ayant réalisé leur commutation isotypique. Un second type de lymphocytes B mémoire, les lymphocytes B mémoire IgM ayant eu une maturation d'affinité et émergeant de la réaction de centre germinatif, persistent pendant de longues périodes *in vivo*. Les lymphocytes B mémoire IgG^+ dominent la réponse secondaire du fait de leur capacité de s'activer en présence d'anticorps sériques neutralisants. Cependant, lorsque les lymphocytes B mémoire IgG^+ disparaissent et lorsque le titre d'IgG circulantes diminue, les lymphocytes B mémoire IgM^+ prennent le relai pour assurer une réponse humorale secondaire. Ceci pourrait permettre de renouveler le pool des lymphocytes B mémoire (32).

Dans l'étude de Dogan et coll., un marquage de l'AID a permis de suivre pendant des périodes prolongées le devenir des lymphocytes B mémoire (33). De façon surprenante, la réponse primaire vis-à-vis de certains antigènes particulaires peut durer de façon très prolongée, jusqu'à 8 mois après l'immunisation. Lors d'un rappel antigénique, les lymphocytes B IgG^+ conduisent une différentiation extra-folliculaire en plasmocytes alors que les B mémoire IgM^+ induisent une nouvelle réaction de centre germinatif (33). Des structures de type centre germinatif peuvent donc conduire à la production de différentes couches de lymphocytes B mémoire ayant des fonctions effectrices différentes en cas de rappel avec l'antigène.

Les facteurs qui interviennent dans la survie des lymphocytes B mémoire et notamment le rôle de la persistance de l'antigène sont discutés au chapitre 2.1.

Le rappel de la mémoire B

En cas de réexposition à l'antigène **(figure 1)**, les principales cellules présentatrices d'antigène sont les lymphocytes B mémoire ayant eu une maturation d'affinité eux-mêmes. La forte affinité du BCR contribue à sa sensibilité à de petites quantités d'antigènes solubles qui ne suffiraient pas à induire une réponse primaire. Par ailleurs, la présence d'anticorps circulants contribue à améliorer la présentation de l'antigène sous forme de complexes immuns aux lymphocytes B mémoire. Le rappel nécessite un contact spécifique avec les lymphocytes TFH «mémoire», qui apportent une régulation spécifique rapide des réponses B mémoire (34). Ce contact spécifique induit une expansion clonale accélérée, en 2 à 3 jours, à la fois des lymphocytes B et des TFH mémoire. La différentiation et la prolifération de plasmocytes de haute affinité se produit rapidement.

De plus, les lymphocytes B mémoire peuvent également bénéficier à ce stade de l'aide des lymphocytes TFH « mémoire » (34,35). Cette aide augmenterait la capacité des B mémoire à proliférer, à se renouveler et à augmenter le pool des plasmocytes de haute affinité. Il a été montré récemment que certains lymphocytes B mémoire ayant un phénotype de centre germinatif pouvaient initier une nouvelle réaction de centre germinatif lors d'un rappel avec certains antigènes, notamment particulaires (33). Il n'est pas bien déterminé si ces centres germinatifs secondaires sont la continuation ou la ré-expansion de centres germinatifs primaires. On ne sait pas non plus si un nouveau processus de maturation d'affinité a lieu dans ces centres germinatifs secondaires. A l'issu de la réponse humorale secondaire, un nombre supérieur de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes persiste, mais leur origine (centre germinatif secondaire et/ou réponse mémoire extra-folliculaire) demeure inconnue.

La plupart des plasmocytes de haute affinité issus de l'activation des B mémoire quittent les organes lymphoïdes secondaires pour des tissus inflammatoires (synoviale au cours de la polyarthrite rhumatoïde, greffon en rejet chronique…) ou pour la moelle osseuse. Une petite proportion reste dans les organes lymphoïdes secondaires. Les plasmocytes qui réussissent à s'établir dans ces niches se différencient de façon terminale en plasmocytes au repos. La résolution de l'inflammation dans un tissu conduit à la destruction de la niche et à l'apoptose des plasmocytes. Dans la moelle essentiellement et les organes lymphoïdes secondaires de façon minoritaire (36) les plasmocytes deviennent des plasmocytes à longue durée de vie.

2. Maintien de la mémoire immunitaire B

Les lymphocytes B mémoire et les plasmocytes sont les deux constituants cellulaires de la mémoire immunitaire B. Ils assurent à l'individu une protection durable contre les agents infectieux. Les plasmocytes, suite à une exposition initiale à l'antigène ou à une vaccination, maintiennent un titre d'anticorps protecteur pendant de longues périodes, parfois plusieurs décennies. Les lymphocytes B mémoire répondent rapidement en cas de réexposition à l'antigène en se différenciant en plasmocytes à courte et à longue durée de vie. Les mécanismes qui permettent la survie prolongée de ces deux types cellulaires sont néanmoins encore imparfaitement compris, notamment la question du renouvellement des plasmocytes médullaires à longue durée de vie.

2.1 Persistance des lymphocytes B mémoire

On peut trouver chez l'homme des lymphocytes B mémoire spécifiques près de 50 ans après un événement immunisant tel que la vaccination anti-variolique (37) ou une infection naturelle virale (38). L'équipe de JC Weill et CA Raynaud a montré que ces lymphocytes B mémoire spécifiques étaient détectables dans la circulation mais surtout dans la rate qui en constitue un réservoir (37). Plusieurs mécanismes ont été évoqués.

Il a d'abord été proposé que ce maintien soit dépendant de la persistance de l'antigène après l'événement immunisant. Il s'agit d'un sujet débattu depuis de nombreuses années. La survie des lymphocytes B mémoire n'est pas constamment dépendante de la persistance de l'antigène. Il a été montré qu'après vaccination, des lymphocytes B mémoire et un contingent de TFH spécifiques du même antigène vaccinal sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques de drainage, avec des complexes formés par des molécules CMH de classe II et des peptide spécifiques, suggérant la présence de l'antigène vaccinal à la phase mémoire de la réponse (35). On sait que les CFD sont capables de retenir et présenter des antigènes entiers pendant de longues périodes, et peuvent donc contribuer à la persistance de l'antigène (25).

Expérimentalement, il avait été observé que des lymphocytes B mémoire issus d'une réponse humorale primaire transférés (avec des lymphocytes T) à un hôte naïf, avaient en effet une durée de vie limitée en l'absence de l'antigène immunisant (39,40). La présence de l'antigène chez l'animal receveur au moment du transfert permettait le maintien à long terme du contingent B mémoire ainsi que le développement de réponses secondaires de rappel (39,40).

Maruyama et coll. ont ultérieurement mis au point un modèle murin dans lequel la spécificité pour l'antigène des lymphocytes B mémoire produits lors d'une réponse primaire, peut être modifiée par recombinaison génétique conditionnelle, de façon à tester leur dépendance vis-à-vis du premier antigène immunisant pour leur survie et le développement de réponses secondaires. A l'opposé des résultats précédemment cités, dans cet élégant modèle, les lymphocytes B mémoire se maintiennent en l'absence du nouvel antigène, ne prolifèrent pas et sont tout à fait capables d'initier des réponses secondaires (41). De plus, Anderson et coll. ont montré que des souris transgéniques incapables de sécréter des immunoglobulines et donc de former des complexes immuns pouvant être présentés à la surface des CFD, avaient la capacité comme les souris contrôle de développer et maintenir des lymphocytes B mémoire (42). De façon contradictoire, deux études soulignent le rôle du BCR dans le maintien des lymphocytes B mémoire. Des souris chimériques transgéniques ayant des CFD n'exprimant pas le récepteur au complément *Cr2* qui leur permettrait de capturer, retenir et présenter les complexes immuns, mais des lymphocytes B normaux, ont des réponses secondaires clairement diminuées, ce qui montre la nécessité d'une présentation de l'antigène par les CFD aux lymphocytes B (43). De plus, en utilisant un modèle murin de délétion conditionnelle de la phospholipase Cγ 2, un composant essentiel de la signalisation du BCR, celle-ci était nécessaire au développement et au maintien des lymphocytes B mémoire. Les souris invalidées avaient une réduction très importante des centres germinatifs et du nombre des lymphocytes B mémoire, avec une franche altération des réponses humorales secondaires (44). Ainsi le rôle respectif de l'antigène, du BCR, des récepteurs au complément, des CFD dans le maintien des lymphocytes B mémoire reste un sujet ouvert, qui nécessite encore des investigations. Il faut préciser que deux facteurs de survie essentiels des lymphocytes B matures, BAFF (« B-cell activating factor ») et APRIL (« A proliferation inducing ligand »), dont les propriétés seront détaillées au chapitre 6, n'ont pas d'impact sur la survie des lymphocytes B mémoire B (45,46).

La rate est un réservoir de lymphocytes B mémoire et contrôle leur maintien et leur homéostasie (29,47,48). Ainsi les lymphocytes B mémoire de la zone marginale $IgM^{+}CD27^{+}$, conférant une immunité antibactérienne, déclinent rapidement après splénectomie et disparaissent, ce qui explique le risque accru d'infections bactériennes et l'hyporéactivité vis-à-vis de vaccins polysaccharidiques contre le pneumocoque chez les sujets splénectomisés (47,48). Cependant, la splénectomie conduit également à la réduction mais pas à la disparition des lymphocytes B mémoire ayant commuté leur isotype, suggérant que d'autres organes lymphoïdes comme les ganglions constituent également un réservoir de lymphocytes B mémoire (49).

A l'opposé, les travaux de Randall et coll. ont montré qu'une mémoire lymphocytaire B fonctionnelle pouvait être observée en l'absence d'organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, Plaques de Peyer) chez les souris. Les réponses sont alors induites dans des structures lymphoïdes ectopiques (dites tertiaires) comme le péritoine ou les bronches (50,51). En résumé, le maintien des lymphocytes B mémoire ne semble pas reposer sur un seul mécanisme mais sur plusieurs, cette complexité favorisant probablement la stabilité de ce compartiment.

2.2 Rôle des lymphocytes B mémoire dans le maintien de l'immunité humorale de longue durée

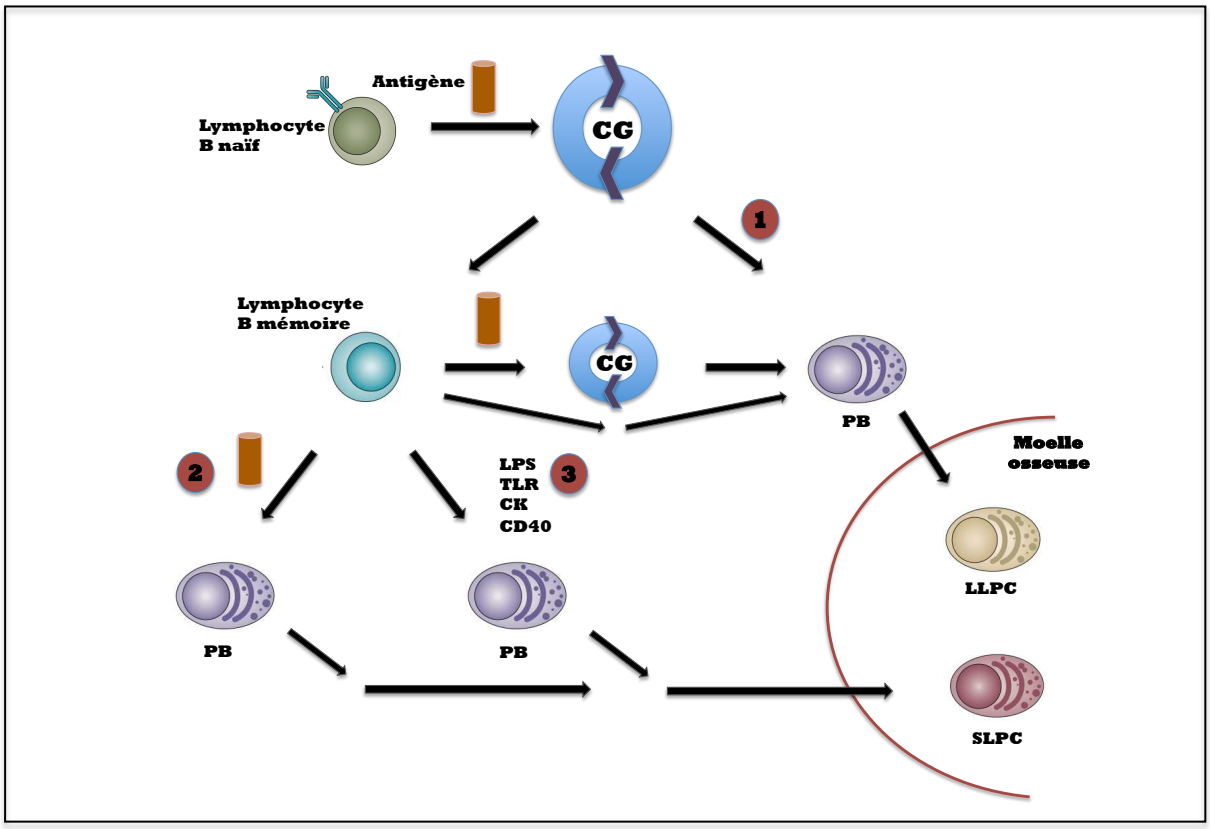
S'il paraît acquis que les lymphocytes B mémoire ont une longue durée de vie, leur rôle dans le maintien à long terme de la mémoire immunitaire humorale, c'est-à-dire le maintien d'un titre constant d'anticorps sériques spécifiques, n'est pas clairement établi. Leur implication passerait par le renouvellement du pool des LLPCs. En effet, trois grandes théories non exclusives du maintien de la mémoire sérologique sont encore débattues **(figure 3)** :

- la génération constante de plasmocytes à courte et/ou longue durée de vie à partir des lymphocytes B mémoire au cours d'une réaction immune chronique vis-à-vis de l'antigène persistant ;
- le renouvellement des LLPCs par des lymphocytes B mémoire différenciés en plasmocytes sous l'effet d'une stimulation non spécifique bystander (aide non spécifique des lymphocytes T, cytokines, stimulation agoniste des Toll-Like Récepteurs ou TLR) ;
- la survie indéfinie des LLPCs qui constituent une population mémoire (49,52) et qui maintiennent un titre constant d'anticorps de haute affinité, sans nécessité de renouvellement par les lymphocytes B mémoire.

En effet, les lymphocytes B mémoire, quand ils sont réactivés, ont une capacité plus importante à se différencier en plasmocytes que les lymphocytes B naïfs activés (53,54). Ainsi l'immunité humorale de longue durée pourrait être due à une réactivation chronique des lymphocytes B mémoire grâce à la persistance de l'antigène, générant de façon constante de nouveaux plasmocytes, comme dans les expériences de transfert adoptif de lymphocytes B mémoire en présence ou non de l'antigène immunisant (54). Mais cette hypothèse ne peut expliquer le maintien de taux d'anticorps constants sur des très longues durées au cours des situations cliniques où l'antigène est absent (comme dans la vaccination antivariolique).

De façon alternative, il a également été postulé, suite à des observations *in vitro*, que l'activation chronique des lymphocytes B mémoire par des dérivés de produits microbiens (LPS, agonistes des TLR) ou par une activation non spécifique dite « bystander » des lymphocytes T via la liaison CD154/CD40L et certaines cytokines, aboutissait à leur différenciation en plasmocytes, en l'absence de l'antigène (53). En effet, *in vitro*, les lymphocytes B humains mémoire, à la différence des lymphocytes B, naïfs se différencient en plasmocytes en présence de l'oligonucléotide CpG, un agoniste des TLR9, et d'interleukine 15, de façon indépendante de la stimulation du BCR. Un effet similaire était observé en présence d'une coopération avec des lymphocytes T auxiliaires non spécifiques, consistant à cultiver les lymphocytes B mémoire en présence d'un clone T auxiliaire alloréactif activé. Dans ces conditions, le clone T ne reconnait pas les lymphocytes B mais apporte une coopération T « bystander » en l'absence de l'antigène (53). Mais dans cette hypothèse, la demi-vie des anticorps sériques devrait être indépendante de l'antigène. Or, il a bien été montré chez l'homme une grande disparité des demi-vies des anticorps anti-infectieux en fonction des différents virus (38). De plus, dans un modèle de délétion conditionnelle de la chaîne β du CMH de classe II, la différenciation des lymphocytes B mémoire en plasmocytes nécessite l'expression de ces molécules de classe II. Ce résultat suggère un mécanisme dépendant de l'antigène plutôt qu'un effet « bystander » opéré par des cytokines ou des agonistes des TLR (55). Les lymphocytes B mémoire n'expriment pas le récepteur à l'IL-21 nécessaire pour leur différenciation en plasmocytes mais son expression augmente plus vite qu'à la surface des lymphocytes B naïfs en cas d'activation (56). L'IL-21 peut avoir des effets différents *in vitro* sur des lymphocytes B activés murins : elle bloque la prolifération et induit l'apoptose de lymphocytes B activés par du LPS ou du CpG, un agoniste des TLR-9, ou au contraire délivre un signal positif de costimulation à des lymphocytes B activés via un signal BCR (57). Ces observations sont en faveur du rôle prédominant de l'antigène pour activer les lymphocytes B par rapport au rôle d'une activation « bystander » induite par le LPS/TLR. Enfin, dans les situations où l'antigène est absent (des années après une vaccination anti-variolique par exemple), le maintien de la mémoire sérologique ne peut probablement n'être que le fait des LLPCs.

Figure 3 : Les 3 mécanismes de maintien de la mémoire humorale



Formation au décours de la réaction de centre germinatif (CG) de plasmablastes qui migrent dans la moelle osseuse et s'établissent en tant que LLPCs (long-lived plasma cells) (1). Différenciation constante des lymphocytes B mémoire en plasmablastes qui gagnent la moelle osseuse et s'établissent en tant que SLPC (short-lived plasma cells), sous l'effet de la présence permanente de l'antigène (2) ou d'une stimulation bystander (3) par les lipopolysaccharides (LPS), les agonistes des Toll-like récepteurs (TLR), ou d'une aide lymphocytaire T sous forme de cytokines et d'un signal CD40L/CD40.

L'exploration du rôle éventuel des lymphocytes B mémoire dans le renouvellement des plasmocytes repose sur deux types d'observations :

1) la recherche d'un effet d'une déplétion des lymphocytes B mémoire sur le nombre de plasmocytes ou le titre d'anticorps sériques.

2) la recherche d'une corrélation entre la fréquence des lymphocytes B mémoire spécifiques et le titre des anticorps sériques.

Les plasmocytes ayant été longtemps considérés comme des cellules à courte durée de vie, la nécessité de renouveler leur pool était considérée comme évidente. Chez la souris, il a été montré que les plasmocytes sont capables de survivre et de produire des anticorps pendant 1 an, soit le tiers de l'espérance de vie d'une souris, en l'absence de lymphocytes B mémoire détruits par irradiation (58). Même si ces plasmocytes ont une longue durée de vie, leur nombre décline avec une demi-vie d'environ 100 jours, ce qui suppose un renouvellement dans l'objectif de maintenir un taux d'anticorps constant. Dans une autre étude, des souris transgéniques exprimant le CD20 humain subissaient une déplétion spécifique des lymphocytes B mémoire par un anticorps anti-CD20 humain, (et non une irradiation qui affecte aussi le compartiment plasmocytaire) et maintenaient à l'inverse un nombre constant de plasmocytes 4 mois après la déplétion B (59). Chez l'homme on observe chez des patients traités par le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, la persistance parfois pendant plusieurs années de titres spécifiques d'anticorps en dépit d'une déplétion B prolongée (60,61). En ce qui concerne la vaccine, le traitement par rituximab n'induit pas de diminution du titre d'anticorps spécifiques (37). A l'inverse, l'utilisation d'une chimiothérapie avec autogreffe dans le lupus conduit à la destruction complète des plasmocytes médullaires, et s'accompagne cette fois-ci d'une éradication des anticorps protecteurs contre le tétanos, la diphtérie, les oreillons et la rougeole (62).

Concernant le second point, plusieurs études ont comparé le titre des IgG spécifiques à la fréquence des lymphocytes B mémoire. Là encore, les résultats sont contradictoires. Amana et coll. ont suivi l'évolution du titre d'anticorps dirigés contre six antigènes viraux et deux antigènes non réplicatifs (tétanos et diphtérie) chez 45 sujets observés pendant de longues durées (jusqu'à 26 ans) (38). La seule corrélation entre titre des anticorps et fréquence des lymphocytes B mémoire spécifiques concernaient la rougeole, les oreillons et la rubéole (les sujets avaient été infectés et non vaccinés) mais ni la vaccine, ni EBV (Epstein-Barr Virus) et VZV (Varicella-Zoster Virus) - deux virus du groupe des *herpesviridae*, en dépit de leur persistance dans l'organisme -, ni les vaccinations anti-tétanique ou diphtérique. Néanmoins, concernant les trois premiers virus, il existait une forte variation en fonction de l'antigène conférant une faible valeur prédictive à la fréquence des lymphocytes B mémoire quant au

titre des anticorps sériques. D'autres études de corrélation sont négatives chez l'homme avec l'antigène HBs (63), la toxine tétanique (64), la vaccine (37) ou des autoantigènes (65,66).
Même si ces résultats chez l'homme peuvent paraître indirects et contradictoires, il ressort néanmoins majoritairement de ces études que la mémoire immunitaire humorale est maintenue non pas par l'activation chronique des lymphocytes B mémoire, mais par des plasmocytes. Les plasmocytes et les lymphocytes B mémoire sont donc deux contingents indépendants de la mémoire humorale à l'état stable (36). Il faut tout de même nuancer l'interprétation de ces résultats, dans la mesure où les lymphocytes B mémoire ne sont quantifiés que dans le sang, et non dans les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions, la rate (37), ou les tissus lymphoïdes des muqueuses (67). La distribution hétérogène des lymphocytes B mémoire dans différents sites anatomiques combinée avec leur hétérogénéité phénotypique (49) rend peu probable que leur nombre en circulation soit représentatif du statut « B mémoire » d'un individu.

2.3 Rôle des plasmocytes dans le maintien de l'immunité humorale

Les plasmocytes : des cellules productrices au repos

Les plasmocytes à longue durée de vie sont des cellules au repos en termes de prolifération et de migration. Ils synthétisent les anticorps qui contribuent à la mémoire humorale, en abaissant le seuil de déclenchement de la réponse humorale secondaire par la formation des complexes immuns. Depuis leur description initiale en 1947 (68), les plasmocytes ont été considérés comme des produits de différenciation des lymphocytes B à courte durée de vie en raison de leur survie très limitée en culture *ex vivo*. Une autre raison est la survie très limitée des plasmocytes extra-folliculaires dans les organes lymphoïdes secondaires, lors de la réponse à l'antigène, liée à leur apoptose *in situ* (69,70). Benner et coll. ont néanmoins identifié en 1974 chez la souris la moelle osseuse comme un réservoir essentiel des cellules synthétisant des anticorps, 10% des cellules générées par une réponse immunitaire persistant dans la moelle (71). La question restait de savoir si ces cellules étaient à longue durée de vie ou en renouvellement constant à partir d'autres lymphocytes B. Plusieurs équipes ont par la suite démontré que les plasmocytes pouvaient être à longue durée de vie chez la souris et le rat, en éliminant, par irradiation ou cytotoxicité, les lymphocytes B, précurseurs présumés des plasmocytes, et en démontrant néanmoins que les plasmocytes survivaient (69,72,73).
Le lien entre plasmocytes et mémoire immunitaire humorale n'a été établi qu'à la fin des années 90 par le groupe de Radbruch (52). En utilisant le marquage à la bromodeoxyuridine

(Brd-U, traceur s'incorporant à l'ADN) pour discriminer, chez la souris, les plasmocytes à courte et à longue durée de vie, il a été observé qu'au cours d'une réponse immune, 70% des plasmocytes synthétisant un anticorps spécifique gagnaient la moelle au cours du 1er mois, 30% au cours du second mois, et y persistaient sans proliférer en l'absence de l'antigène pendant 2 mois supplémentaires. L'utilisation d'un anticorps anti-CD20 monoclonal a confirmé l'indépendance de ce réservoir plasmocytaire par rapport au compartiment des lymphocytes B mémoire (59).

Chez l'homme, il n'y a pas d'évidence directe de l'existence de plasmocytes à longue durée de vie (LLPCs ou « long-lived plasma cells ») mais plusieurs observations sont en faveur de cette hypothèse, en particulier, la stabilité du titre de certains anticorps pendant des décennies (38) et la stabilité du titre de certains anticorps (spécifiques de la toxine tétanique, d'antigènes du pneumocoque ou de la rougeole) après une déplétion des lymphocytes B naïfs et mémoire induite par l'administration d'anticorps anti-CD20 (60,61,74,75).

L'arrêt du cycle cellulaire semble être une nécessité pour que les plasmocytes s'établissent en tant que cellule mémoire fonctionnelle dans la moelle osseuse et synthétisent des anticorps, comme le montre l'invalidation des inhibiteurs de CDK (« cyclin-dependent kinase ») chez la souris (76). Chez l'homme, l'analyse directe des plasmocytes médullaires censés contenir des LLPCs montre une population au repos du fait de l'absence d'expression de Ki67 (77). Leur synthèse d'immunoglobulines *in vitro* n'est pas inhibée par l'hydroxyurée, un inhibiteur de prolifération, contrairement à celle des plasmablastes dérivés des amygdales ou circulants (78).

Plasmocytes à courte durée de vie ou à longue durée de vie : facteurs impliqués dans leur génération

Les plasmocytes sont retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires et dans la moelle osseuse. Dans les premiers, les plasmocytes sont plus souvent à courte durée de vie alors que les plasmocytes médullaires sont majoritairement à longue durée de vie. De plus, les plasmocytes peuvent être d'origine extra-folliculaire – ils ont alors majoritairement à courte durée de vie – ou émerger du centre germinatif (21,79). Les plasmocytes extra-folliculaires sont issus de l'expansion clonale et de la différenciation rapides de lymphocytes B ayant réagi vis-à-vis d'un antigène et s'étant différenciés en plasmocytes, qui synthétisent des immunoglobulines d'isotype IgM ou autre. Les plasmocytes issus des centre germinatifs migrent majoritairement dans la moelle alors que seule une petite proportion reste dans la rate (79). Bien que le microenvironnement médullaire dénommé « niche » apporte des signaux

nécessaires à la survie à long terme des plasmocytes par le biais du stroma, de cytokines et de chémokines, il apparaît que les plasmocytes sont également programmés pour une survie prolongée avant d'entrer dans ces niches médullaires. Certains auteurs ont en effet mis en évidence au sein des mêmes sites anatomiques médullaires à la fois des plasmocytes à courte et longue durée de vie (80), mais aussi différentes populations de précurseurs plasmocytaires, dont la différenciation aboutira à des plasmocytes de courte ou longue durée de vie. Chez la souris, les précurseurs des plasmocytes à courte durée de vie expriment à la fois les marqueurs CD138 et CD44, alors que les précurseurs des LLPCs sont soit $CD138^+$ soit $CD44^+$ (81). La conclusion de ces travaux est que les cellules qui migrent dans la moelle sont en fait à un stade intermédiaire de différenciation et non des plasmocytes totalement matures. La survie serait donc un facteur intrinsèque, mais qui nécessite pour s'exprimer une interaction avec l'environnement comme le montre par exemple l'effet du blocage des molécules d'adhésion VLA-4 et LFA-1 sur la survie des plasmocytes (82).

Facteurs extrinsèques impliqués dans la régulation de la survie des plasmocytes à longue durée de vie

La durée de vie des plasmocytes est clairement régulée de façon extrinsèque, car elle dépend, du moins *in vitro*, de facteurs solubles et cellulaires, dont l'organisation pourrait constituer une niche de survie *in vivo* (36). Cette niche est censée limiter le nombre de plasmocytes à longue durée de vie, limitant ainsi le titre des IgG sériques totales. En culture, des plasmocytes isolés meurent pour la presque totalité par apoptose au bout de 3 jours. De nombreuses études ont donc été réalisées pour identifier les facteurs favorisant la survie des plasmocytes *in vitro*. Certains de ces facteurs ont été identifiés, mais il n'a pas été possible de décrire précisément l'organisation spatiale et temporelle des niches *in vivo* ni de les reproduire *in vitro*.

Rôles de BAFF et APRIL, et de leurs récepteurs

Contrairement aux autres lymphocytes B, la survie des plasmocytes ne dépend plus du signal transmis par le BCR qui n'est plus exprimé à leur surface, ni de la présence de l'antigène. Elle dépend de signaux délivrés lors de l'interaction de deux facteurs solubles, BAFF (B-cell activation factor, appelé aussi BLyS ou B Lymphocyte Stimulator) et APRIL (A Proliferation Inducing Ligand), avec leurs récepteurs BAFF-R, TACI (Transmembrane Activator 1 and

Calcium-signaling modulator and cyclophilin ligand-Interactor) and BCMA (B Cell Maturation Antigen) exprimés par les plasmocytes (46). Le rôle de ces facteurs dans l'homéostasie des lymphocytes B matures, l'auto-immunité et l'allo-immunité sera abordé au chapitre 6. Concernant l'effet sur les plasmocytes, les signaux délivrés par BAFF et APRIL compensent la perte du signal de survie fournie par le BCR, les deux voies de signalisation se rejoignant. Néanmoins, cet effet est complexe, et dépend non seulement de la cytokine – BAFF ou APRIL – mais aussi du récepteur impliqué.

BAFF intervient dans le développement du répertoire B naïf et dans la survie des lymphocytes B du centre germinatif. APRIL intervient plutôt dans la survie des lymphocytes B différenciés (83,84). La maturation des lymphocytes B est normale chez les souris invalidées pour le gène codant APRIL (APRIL$^{-/-}$). APRIL est nécessaire pour la survie des lymphocytes B ayant subi une commutation isotypique et aussi pour la formation et la survie des plasmablastes. Cependant, à long terme, les LLPCs s'accumulent dans la moelle osseuse des souris APRIL$^{-/-}$ suggérant une probable redondance entre BAFF et d'APRIL dans ce processus. BAFF et APRIL sont en fait chacun suffisants pour la survie des LLPCs, mais le seul moyen d'éradiquer ces plasmocytes est de neutraliser les deux cytokines à la fois, par des anticorps bloquants (46) ou chez les souris BCMA$^{-/-}$ (81). BCMA est le récepteur commun à BAFF et APRIL, exprimé par les plasmocytes médullaires et spléniques mais pas par les autres lymphocytes B. Notons que ce double blocage a pour effet la disparition de toutes les cellules de la lignée B, exceptés les lymphocytes B mémoire (46).

En ce qui concerne les autres récepteurs, les interactions BAFF/BAFF-R ne jouent pas de rôle dans la survie des plasmocytes. A l'opposé, la signalisation via TACI et BCMA semble plus importante. TACI est lui important pour la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (85). Néanmoins, TACI ne semble être impliqué que dans la différenciation en plasmablastes. Les souris invalidées pour TACI ont en effet des réponses humorales de longue durée normales.

Migration des plasmocytes et « homing » dans la moelle osseuse

A la suite de leur formation dans la rate, les ganglions lymphatiques ou d'autres structures lymphoïdes, les plasmocytes migrent dans la moelle osseuse, où 80% de la production des anticorps sont assurés. La rate, elle, apparaît comme un réservoir mineur des LLPCs, la majorité des plasmocytes spléniques apparaissant de courte durée de vie (73). Les signaux décidant de la rétention ou de la migration des plasmocytes hors des organes lymphoïdes

secondaires ne sont que partiellement identifiés. L'invalidation génétique ou le blocage *in vivo* des intégrines ß2 ou du récepteur-1 pour le sphingosine-1-phosphate (S1P1) induisent une accumulation de plasmablastes dans la rate ou les ganglions lymphatiques, et préviennent l'établissement des plasmocytes dans la moelle osseuse (86,87). De plus, lorsque les lymphocytes B se différencient en plasmocytes ils modifient leur profil d'expression de récepteurs aux chémokines : CCR7 et CXCR5 ne sont plus exprimés, alors que CXCR4 est maintenu et que le niveau de réponse à son ligand CXCL12/SDF-1 (« stromal cell derived factor ») est augmenté (88). CXCL12 est exprimé par les cellules stromales médullaires, mais aussi par la pulpe rouge splénique et les cordons médullaires des ganglions lymphatiques. Les cellules stromales exprimant également VCAM1 (« vascular cell adhesion molecule-1 »), par laquelle elles interagissent avec les plasmocytes qui expriment le ligand VLA-4, sont peu nombreuses, ce qui limite le pool de plasmocytes qui peuvent être retenus dans la moelle. Ces cellules stromales spécifiques sont $IL7^-$ et $PECAM^-$ par opposition aux cellules stromales impliquées dans la lymphopoïèse B (89). Par conséquent, CXCL12/CXCR4 et VCAM-1/VLA-4 sont considérés actuellement comme les deux principales voies impliquées dans le « homing » médullaire des plasmocytes et leur orientation vers un profil de cellule à longue durée de vie.

Rôle des facteurs solubles

La difficulté de maintenir les plasmocytes en culture *in vitro* a conduit à de nombreuses études sur les facteurs solubles ou cellulaires permettant d'augmenter cette survie. Ainsi, l'IL-6, l'IL-5, le TNFα, CXCL12 et la liaison de CD44 augmentent la survie des plasmocytes *in vitro* (90). Les souris déficientes en IL-6 présentent néanmoins un nombre normal de plasmocytes et sont capables de maintenir une réponse anticorps spécifique durable. Concernant l'IL-10, les lymphocytes B mémoire humains se différencient et prolifèrent de façon augmentée en présence d'IL-10 *in vitro* (91). Cependant, il n'y a pas d'argument pour une implication de l'IL-10 dans la différenciation des plasmocytes *in vivo* dans des modèles murins. L'IL-21 est un membre de la famille de l'IL-2/IL-4/IL-15 et est une cytokine très importante dans la génération des lymphocytes TFH (92), la formation des centres germinatifs, la génération des plasmocytes (93), et la survie des lymphocytes B mémoire (94). Si le rôle de l'IL-21 est majeur pour la différenciation des lymphocytes B mémoire et des plasmocytes, son rôle dans le maintien des LLPCs n'est pas établi.

Rôle des cellules stromales médullaires

En dépit de l'action synergique de ces facteurs solubles *in vitro*, la survie des plasmocytes n'est que modérément augmentée à 1 semaine de culture, ce qui indique l'implication d'autres facteurs non solubles. A l'opposé, les cellules stromales médullaires en tant que cellules nourricières ou « feeder » des plasmocytes augmentent significativement leur survie *in vitro* jusqu'à quatre semaines mais ne permettent pas une survie plus prolongée (95). Ce rôle de soutien des cellules stromales passe par l'expression de VLA-4 en association avec la fibronectine et la sécrétion d'IL-6 (95,96). Les cellules stromales sont donc probablement des constituants essentiels des niches de survie médullaires, soit en favorisant directement la survie des plasmocytes, soit en recrutant d'autres types de cellules. *In vivo* dans la moelle osseuse, les plasmocytes sont colocalisés presque constamment avec les cellules stromales exprimant VCAM1 et CXCL12. L'invalidation du récepteur à CXCL12, CXCR4 sur les lymphocytes B conduit à la perte des plasmocytes dans la moelle mais pas dans la rate (89). Les plasmocytes médullaires, spléniques et circulants, chez l'homme comme chez la souris, expriment CXCR4 (97). De plus, les cellules stromales humaines synthétisent CXCL12, ainsi que BAFF, APRIL et l'IL-6 (98).

Survie et apoptose des plasmocytes

Un autre point important impliqué dans la longévité des plasmocytes est leur phénotype et leur profil d'expression de gènes anti-apoptotiques : ils expriment, contrairement aux plasmablastes, le facteur Bcl-2 et peu ou pas de CD95/Fas (99). Ce point corrobore les données de Odendahl et coll. qui ont observé deux populations fonctionnellement distinctes de plasmocytes circulant 1 semaine après une vaccination anti-tétanique (100). La première population comportait des plasmablastes spécifiques d'antigène récemment générés, migrant *in vitro* selon un gradient de CXCL12 et exprimant de hauts niveaux de molécules HLA-DR à leur surface. La seconde population était vraisemblablement polyclonale, et non spécifique d'antigène, exprimait peu HLA-DR, et avait un phénotype correspond donc à celui de plasmocytes médullaires matures. Ces plasmocytes, non migratoires, ne proliférant pas ont probablement été mobilisés de la moelle osseuse par compétition avec les plasmablastes spécifiques de l'antigène. Ce modèle suggère une adaptation des plasmocytes non pas à l'état de base, mais lors d'une réponse immunitaire systémique. Les plasmocytes médullaires récemment mobilisés ont un profil pro-apoptotique. En revanche, seuls les plasmocytes

médullaires mais aucune de deux populations circulantes n'expriment des niveaux élevés de Bcl-2.

3. Antigènes et réponse humorale lors des transplantations d'organe

3.1 Les antigènes HLA

Les alloantigènes les plus importants cliniquement et les mieux étudiés sont les molécules du système HLA. Les antigènes HLA de classe I sont exprimés sur toutes les cellules, y compris les cellules endothéliales de greffons vascularisés, alors que les molécules de classe II ne sont exprimées que par les cellules présentatrices d'antigène, dont les lymphocytes B, et de façon inductible par les cellules endothéliales, les lymphocytes T activés et certaines cellules somatiques. Il est apparu très tôt que l'appariement HLA du donneur et du receveur avait une influence bénéfique sur les résultats de la plupart des transplantations d'organe, à l'exception du foie (101–103). Il est néanmoins impossible, en dehors d'une fratrie, de fournir à tous les patients en attente d'une transplantation un greffon HLA identique compte tenu de l'extraordinaire polymorphisme des molécules HLA. Auparavant, chaque incompatibilité HLA était considérée comme identique à une autre et porteuse du même impact négatif sur le risque de rejet aigu et donc l'issue de la transplantation. On raisonnait en termes de nombre d'incompatibilités. Des données récentes ont toutefois montré que l'immunogénicité d'un antigène HLA pouvait varier selon le niveau des différences structurales existant entre les molécules HLA du donneur et celles du receveur (104,105).

L'interface anticorps / antigène

Les domaines variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) d'immunoglobuline déterminent la spécificité de l'anticorps. Chaque chaîne a trois régions appelées CDR (complementarity determining region) – CDR-H1 à CDR-H3 et CDR-L1 à CDR-L3 – contenant des boucles hypervariables qui interagissent avec différentes parties de l'épitope protéique (106,107). La troisième région CDR de la chaîne lourde (CDR-H3) se situe en général au centre du site de fixation antigénique et jouent un rôle majeur dans la

reconnaissance de l'épitope. Les 5 autres régions ont une variabilité moindre et joue un rôle de stabilisation de la liaison de CDR-H3.

Les analyses stéréochimiques des complexes antigène/anticorps cristallisés ont permis de définir un « épitope structural » comme la part d'un antigène qui rentre en contact avec les 6 régions CDR d'un anticorps (108). Ce contact se fait par le biais d'une surface de 15 à 25 résidus d'acides aminés. Au sein de l'épitope structural se situe « l'épitope fonctionnel », comportant des résidus énergétiques situés dans des zones dites « hot spots » (109,110). Un résidu amino-acidique est dit énergétique si sa substitution par un autre résidu aboutit à une diminution significative de la liaison de l'anticorps avec l'épitope (109). Pour être immunogénique, un épitope fonctionnel doit comporter au moins un résidu amino-acidique du non-soi. Ce résidu diffère dans sa séquence du résidu correspondant dans la protéine homologue du sujet immunisé. Les résidus doivent être à la surface de la molécule HLA pour être en contact avec les régions CDR qui font la spécificité de l'anticorps.

Epitopes des molécules HLA

Les antigènes HLA portent des épitopes, c'est-à-dire des séquences d'acides aminés accessibles, multiples, qui correspondent aux sites antigéniques pouvant constituer la cible d'anticorps allogéniques spécifiques **(figure 4)**. Ces épitopes, du fait de la répartition du polymorphisme allélique du système HLA, peuvent être partagés par différents antigènes HLA. Ceci explique pourquoi l'immunisation vis-à-vis d'un antigène HLA donné peut conduire à la synthèse d'anticorps réactifs vis-à-vis d'autres antigènes partageant un ou plusieurs épitopes. Initialement, la notion d'épitopes partagés (ou publics) a été définie sur la base de réactivités sérologiques croisées. Ainsi, l'immunisation vis-à-vis d'un antigène HLA donné conduisait à une réactivité sérologique par des techniques de lymphocytotoxicité vis-à-vis de plusieurs antigènes, réunis sous le terme de groupes de réaction croisée (CREG).

Plus récemment, des études réalisées avec des anticorps monoclonaux anti-HLA ont montré que ces épitopes correspondaient à des résidus ou à de courtes séquences d'acides aminés (105), situés à la surface des molécules HLA et en position accessible aux anticorps. Les études cristallographiques et la modélisation tridimensionnelle des molécules HLA ont révélé la localisation des résidus polymorphes au sein des différentes molécules de classe I (A, B, C) et de classe II (DR, DQ, DP), et leur accessibilité variable aux anticorps fonction de leur localisation. Le nombre et la situation des résidus varient en fonction des différentes molécules. Il y a ainsi autant de résidus polymorphes à la surface de la chaîne $\alpha 1$ au site de fixation antigénique pour les molécules A et B. En revanche, il y a plus de positions

polymorphes de surface sur la chaîne α2 pour la molécule HLA-A. Les antigènes HLA-C ont plus de positions polymorphes sur le domaine proximal, alors qu'il n'y a aucune position polymorphe sur la partie proximale des molécules HLA-B.

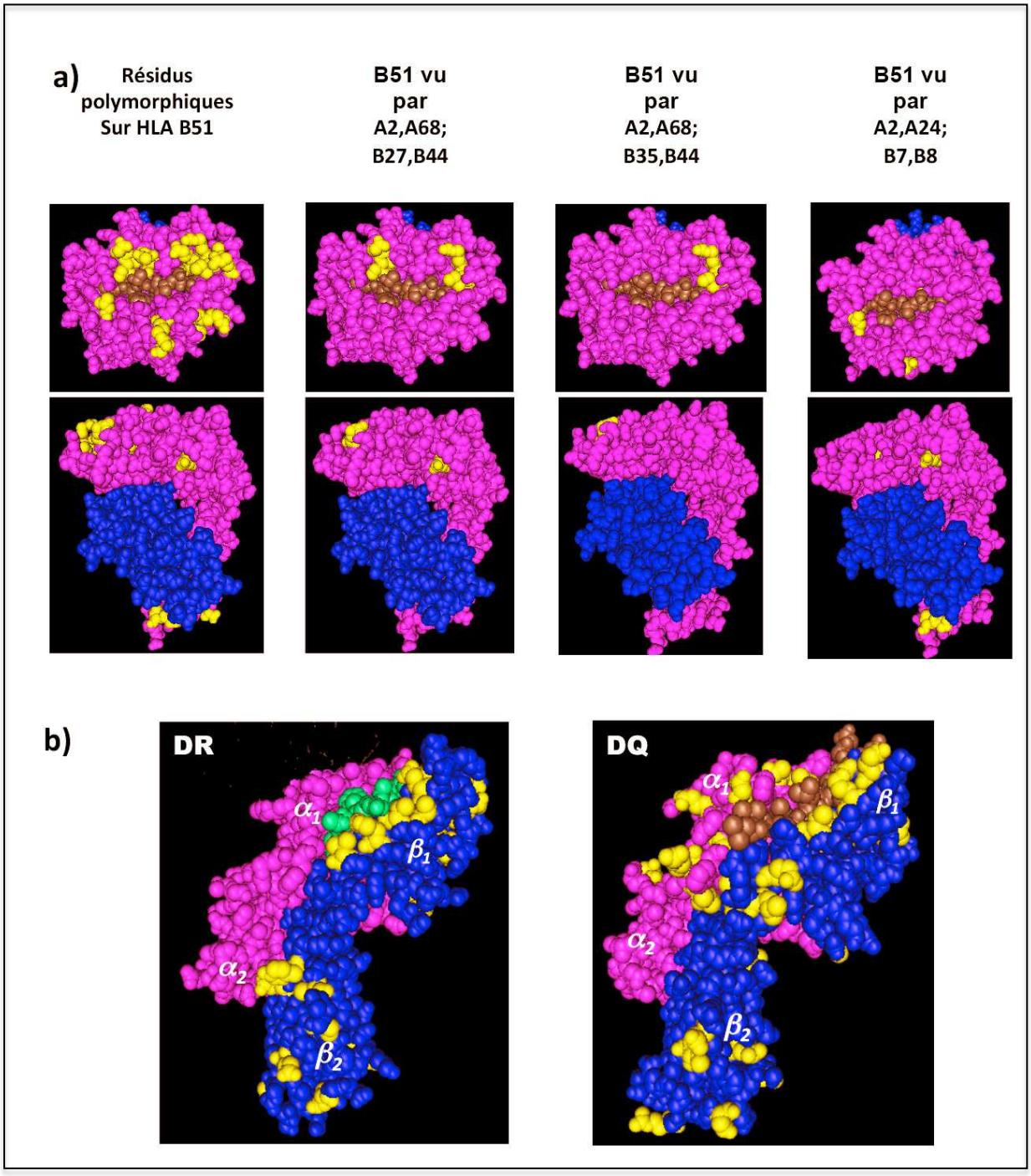
Le polymorphisme des molécules HLA-DR n'est situé qu'au niveau des chaînes β - la chaine α étant monomorphe - en majorité à la surface de la molécule proche du site de fixation peptidique mais également dans les zones proches de la membrane. DRβ et DQβ ont à peu près autant de positions polymorphes. La chaîne DQα a quelques positions polymorphes près du site de fixation peptidique **(figure 4)**.

Ces modélisations donnent bien l'ampleur du polymorphisme structural et de la distribution large des épitopes sur toute la surface moléculaire. En fonction de cette localisation, certains épitopes ont donc une accessibilité différente aux anticorps. Certains anticorps peuvent réagir avec des molécules HLA solubles mais pas avec des molécules HLA membranaires.

La surface d'un épitope structural est d'environ 700 à 900 $Å^2$. En comparaison, les molécules HLA vues « du haut » (comprenant les deux hélices et le peptide) ont une surface de 750 $Å^2$. Ceci signifie que les anticorps anti-HLA sont en contact avec une part importante des molécules HLA. Il n'y a pas d'information sur la structure d'un complexe HLA/anticorps anti-HLA. Cependant, le complexe cristallisé d'un fragment Fab d'un anticorps monoclonal humain (Hyb3) dirigé contre un peptide de mélanome MAGE-A1 et le peptide lié à HLA-A1 a lui bien été décrit. Le paratope, c'est-à-dire l'interface de contact de l'anticorps comporte des résidus de contact dans 11 positions V_H et 4 positions V_L. L'épitope structural lui implique 4 résidus sur le peptide, 7 résidus sur l'hélice α1 et 3 sur l'hélice α2. La modélisation montre que ces résidus sont compris dans une surface de 900 $Å^2$. CDR-H3 contribue majoritairement à la fixation de l'anticorps, impliquant le contact avec le peptide par le biais d'un résidu Arginine (R) en position 65 et avec la molécule HLA-A1 par le biais d'une glutamine (Q) en position 72 sur l'hélice α1, qui constitue l'épitope fonctionnel (111).

Ces séquences épitopiques des molécules HLA ont été utilisées pour l'analyse des sérums des patients immunisés et pour le choix des couples donneur/receveur, notamment à l'aide du logiciel HLAMatchmaker (112). Plus récemment, Terasaki et coll. ont utilisé la technique Luminex® pour identifier des épitopes à partir des profils de réactivité d'anticorps anti-HLA (113).

Figure 4 : Résidus polymorphiques sur les molécules HLA de classe I et II



a) Bases structurales dune incompatibilité HLA B51 en fonction du groupe HLA du receveur.
Haut : vue supérieure. Bas : vue latérale.

Couleur des résidus d'acides aminés jaunes : polymorphiques, roses : chaînes α1 à α3 (résidus non polymorphiques), bleus : β2 microglobuline, marrons : peptide

b) Emplacement des résidus polymorphiques sur les molécules de classe II DR et DQ
Peptide en vert (DR) ou en marron (DQ).

D'après (105)

Le concept de HLAMatchmaker

HLAMatchmaker est un algorithme théorique, basé sur la comparaison des séquences d'acides aminés des différentes molécules HLA, développé pour analyser le degré de compatibilité entre un donneur d'organe et un receveur et ainsi améliorer l'allocation des organes. Dans sa version initiale, chaque molécule HLA est vue comme une succession de séquences linéaires (triplets) correspondant à des résidus d'acides aminés épitopiques accessible aux anticorps (112). Néanmoins, la vision des triplets était incomplète et HLAMatchmaker a été amélioré en incluant des séquences plus longues et des résidus polymorphes dans des positions discontinues, qui portent désormais le nom d' « eplets » (114). Ces eplets correspondent aux épitopes fonctionnels décrits plus haut.

La plupart des « eplets » comprennent 2 à 5 résidus impliqués dans des interactions hautement énergétiques (« hot spots ») avec le site de reconnaissance des anticorps spécifiques, et principalement responsables de l'affinité et de la spécificité de la liaison avec ces anticorps. Les résidus énergétiques sont distants les uns des autres d'environ 3 Å et l'un au moins doit être du non-soi. A chaque eplet est attribué un numéro de position dans la séquence des acides aminés et les résidus polymorphiques situés dans un rayon de 3 Å. Ainsi l'eplet 11AMR est en position 11 et comporte 3 résidus polymorphiques: alanine (A), méthionine (M) et arginine (R). De nombreux eplets sont dénommés avec un ou deux résidus (par exemple 9H ou 193PV) car leurs résidus voisins sont les mêmes sur toutes les molécules de classe I et ainsi ne sont pas mentionnés.

Les molécules HLA A, B et C de classe I portent ainsi 199 « eplets », dont 110 au niveau des hélices alpha au le sommet de la molécule, 60 sur la face latérale et 29 à des positions moins accessibles (au fond ou en dessous du sillon peptidique). Les molécules de classe II ont un répertoire de 146 « eplets » DRB (DRB1 et DRB3), 74 DQB, 58 DQA, 45 DPB et 19 DPA.

HLAMatchmaker applique 2 principes :

1) chaque antigène HLA représente une chaîne distincte d'épitopes structuralement définis comme potentiellement immunogènes,
2) un patient ne peut développer d'anticorps contre des épitopes exprimés par ses propres molécules HLA

Dans son application clinique d'allocation d'un organe à un receveur, l'algorithme détermine quels épitopes sur les molécules HLA du donneur et du receveur sont partagés ou différents **(figure 4, haut).** Ainsi, pour une incompatibilité antigénique HLA donnée vis-à-vis d'un

même donneur, selon le degré de différences structurelles avec la molécule HLA du receveur, ce dernier peut avoir un nombre variable d' « eplets » non appariés, et donc un risque immunologique tout à fait variable **(Tableau 1)**. Ceci est défini comme la « charge épitopique ». Il faut également distinguer l'antigénicité d'un épitope, c'est-à-dire sa capacité à être lié par un anticorps anti-HLA, et son immunogénicité, c'est-à-dire sa capacité à induire la synthèse d'un anticorps anti-HLA spécifique. Les épitopes n'ont ainsi pas tous la même immunogénicité et donc probablement pas la même importance clinique en transplantation.

En résumé, le poids immunogénique d'une incompatibilité HLA avec le donneur est influencé par le groupe HLA du receveur, contenant un répertoire d'épitopes du soi contre lesquels le receveur ne peut en principe pas s'immuniser. En termes pronostiques, il a été montré que les greffes incompatibles en termes d'antigène A et B mais compatibles en termes d' « eplets » ont la même survie que les greffes sans incompatibilité antigénique HLA (115).

En ce qui concerne le lien entre charge épitopique et immunogénicité, le nombre d'incompatibilités de triplets offre une valeur prédictive des résultats de crossmatches en cytométrie à partir de sérums de patients immunisés ou du développement d'anticorps après une grossesse ou une transplantation (116,117).

Dans sa dernière version, le logiciel permet une analyse des anticorps sériques anti-HLA du receveur, et donc des spécificités épitopiques des différents anticorps. Il permet donc de déterminer quels sont les épitopes autorisés et interdits, et si un donneur éventuel exprime ces épitopes. Le logiciel HLAMatchmaker est ainsi utilisé de façon routinière dans le réseau Eurotransplant pour attribuer de façon optimale les greffons aux patients hautement sensibilisés en attente de transplantation avec une réduction du délai d'attente et de bons résultats en termes de survie du greffon (118).

Même si HLAMatchmaker repose sur la désignation théorique des épitopes, leur capacité a été confirmée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes HLA différents et qui ont permis de vérifier l'expression commune de ces épitopes par plusieurs antigènes**.**

Tableau 1 : importance du groupe HLA du receveur dans la charge épitopique d'une incompatibilité antigénique de classe I et de classe II

Table 1

Examples of how structurally based compatibility of a mismatched HLA antigen depends on the HLA phenotype of the recipient

Case	Phenotype						#Ep	B51 (B*5101), mismatched eplets	#Ep	B27 (B*2705), mismatched eplets	#Ep	B61 (B*4002), mismatched eplets
1	A*0101	A*0201	B*1402	B*0702	Cw*0701	Cw*0702	7	11AMR, 44RTE, 76ERI, 82ALR, 113HN, 163L, 193PV	5	9H, 70AKA, 76ERT, 82LLR, 151RV	5	9H, 41T, 44RKE, 113HN, 151RV
2	A*0101	A*0201	B*0702	B*0801	Cw*0701	Cw*0702	6	44RTE, 76ERI, 82ALR, 131S, 163L, 193PV	5	9H, 70AKA, 76ERT, 82LLR, 131S	3	9H, 41T, 44RKE
3	A*0101	A*0201	B*0702	B*4501	Cw*0701	Cw*0702	5	44RTE, 76ERI, 82ALR, 113HN, 193PV	3	70AKA, 76ERT,82LLR	1	113HN
4	A*0101	A*2501	B*0702	B*0801	Cw*0701	Cw*0702	4	44RTE, 131S, 163L, 193PV	7	9H, 70AKA, 73TD, 76ERT, 82LLR, 113YH, 131S	3	9H, 41T, 44RKE
5	A*0101	A*0201	B*0702	B*4403	Cw*0501	Cw*0702	3	44RTE, 76ERI, 113HN	3	9H, 70AKA, 82LLR	2	9H, 113HN
6	A*0101	A*0201	B*4501	B*3901	Cw*0501	Cw*1701	3	44RTE, 76ERI, 82ALR	4	65QIA, 70AKA, 76ERT, 82LLR	0	none
7	A*0101	A*2501	B*5501	B*3701	Cw*0602	Cw*0702	2	116Y, 163L	3	70AKA, 113YH, 163E	4	41T, 44RKE, 116Y, 163E
8	A*0101	A*2501	B*3501	B*4101	Cw*0602	Cw*0401	0	None	8	44REE, 65QIA, 70AKA, 73TD, 76ERT, 82LLR, 113YH, 16	1	163E

Table 2

Example of class II eplet load differences among serologically defined DR antigens

Patient

DR15	DRB1*1501	DRB5*0101	DQB1*0502	DQA1*0102
DR18	DRB1*0302	DRB3*0101	DQB1*0402	DQA1*0401

DR antigen	DRB1	DRB3/4/5	DQB1	DQA1	Eplet total	DRB1eplets	DRB3/4/5 eplets	DQB1 eplets	DQA1 eplets
Donor									
DR1	DRB1*0101	None	DQB1*0501	DQA1*0101	9	5	0	2	2
DR4	DRB1*0401	DRB4*0101	DQB1*0301	DQA1*0302	42	8	14	9	11
DR7	DRB1*0701	DRB4*0101	DQB1*0202	DQA1*0201	41	10	14	10	7
DR8	DRB1*0801	None	DQB1*0402	DQA1*0401	4	4	0	0	0
DR9	DRB1*0901	DRB4*0101	DQB1*0303	DQA1*0302	36	6	14	5	11
DR10	DRB1*1001	None	DQB1*0501	DQA1*0101	12	8	0	2	2
DR11	DRB1*1101	DRB3*0202	DQB1*0301	DQA1*0501	22	3	2	9	8
DR12	DRB1*1201	DRB3*0202	DQB1*0301	DQA1*0501	26	7	2	9	8
DR13	DRB1*1301	DRB3*0101	DQB1*0603	DQA1*0103	12	2	0	7	3
DR14	DRB1*1401	DRB3*0202	DQB1*0503	DQA1*0104	11	4	2	2	3
DR15 (self)	DRB1*1501	DRB5*0101	DQB1*0602	DQA1*0102	6	0	0	6	0
DR16	DRB1*1601	DRB5*0202	DQB1*0502	DQA1*0102	2	0	2	0	0
DR17	DRB1*0301	DRB3*0101	DQB1*0201	DQA1*0501	17	0	0	9	8
DR18 (self)	DRB1*0302	DRB3*0101	DQB1*0402	DQA1*0401	0	0	0	0	0

Les épitopes de P. Terasaki

Le groupe de P. Terasaki a adopté une approche différente, empirique, qui ne repose pas sur l'analyse comparative des allèles HLA du donneur et du receveur, mais sur l'étude de la réactivité d'anticorps anti-HLA monoclonaux de souris et d'allosérums de sujets immunisés, adsorbés sur des lignées cellulaires rHLA SA, exprimant un antigène HLA donné unique puis élués (113). Certains sérums ont été élués sur des microbilles contenant un antigène HLA recombinant. Les anticorps monoclonaux ou les éluats ont ensuite été testés avec 95 antigènes recombinants HLA A, B, C couplés à des billes Luminex®. Ces antigènes recombinants ont été développés dans un système cellulaire de mammifères à partir de cellules transfectées avec des gènes HLA. Ces antigènes sont en tous points semblables aux antigènes natifs grâce à des modifications post-transcriptionnelles et à la glycosylation des molécules HLA matures (119). Pour chaque groupe d'antigènes réactifs avec un anticorps monoclonal ou un allosérum donné, une analyse de la séquence amino-peptidique de ces antigènes a été réalisée afin d'identifier les motifs épitopiques communs (les séquences d'acides aminés des antigènes ou des allèles HLA étaient téléchargés à partir du site Anthony Nolan (120)). Parmi ces motifs, ceux exposés de façon préférentielle à la surface de la molécule et compris dans un intervalle de surface compatible avec le site de reconnaissance antigénique de l'anticorps sont considérés comme une caractéristique distinctive de l'épitope reconnu. Les anticorps monoclonaux sélectionnés dans cette étude reconnaissent des épitopes avec 1 à 4 acides aminés à certaines positions. Ces positions n'étaient pas contiguës mais séparés d'une distance permettant la fixation de l'anticorps.

Selon cette approche, la plupart des épitopes HLA de classe I sont localisés dans les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Il en existe 3 sur le domaine $\alpha 3$, très proche de la membrane, dont il n'est pas certain qu'ils puissent être accessibles à un anticorps. Ainsi, 103 épitopes de classe I et 83 épitopes de classe II définis par des résidus d'acides aminés polymorphiques ont été décrits (121). Comme avec HLAMatchmaker, certains épitopes de classe I sont spécifiques des locus A, B et C et d'autres sont partagés par deux ou trois de ces locus.

Une étude comparative a montré que 81 des 103 épitopes de Terasaki correspondaient à des eplets ou des paires d'eplets (122). 12 épitopes correspondent à des eplets avec des combinaisons de résidus qui n'affectent pas la spécificité de l'épitope. 10 épitopes ne correspondent à aucun eplet. Cependant, HLAMatchmaker a 38 eplets supplémentaires dans des positions bien exposées qui ne correspondent à aucun équivalent épitopique déterminé par l'équipe de Terasaki, et pour lesquels des anticorps spécifiques ont été mis en évidence.

3.2 Les méthodes de détection des anticorps anti-HLA

Des progrès majeurs ont été accomplis ces dernières années dans le domaine de la détection et de l'identification des anticorps anti-HLA. Ces progrès ont été pour beaucoup dans la reconnaissance du rejet à médiation humorale et dans la prise de conscience de son importance pronostique. En effet, l'émergence de nouvelles techniques permet désormais de détecter les anticorps anti-HLA avec une grande sensibilité tout en identifiant précisément leur spécificité antigénique. Ainsi, parallèlement aux tests cellulaires – dont la technique historique de « Lymphocytotoxicité Dépendante du Complément (LCT) » (123) et la cytométrie en flux – se sont développées plus récemment des méthodes dites de phase solide utilisent des antigènes HLA fixés à des supports variables **(Figure 5)**. La valeur pronostique de ces différents tests sera détaillée au chapitre 7.2.

Lymphocytotoxité Dépendante du Complément

La LCT est une technique qui consiste à mettre le sérum à tester en présence de lymphocytes B et T allogéniques d'haplotype connu, et de complément de lapin. On évalue ensuite la mortalité cellulaire causée par les alloanticorps présents dans le sérum en ajoutant un « colorant vital ». Si la lyse cellulaire est supérieure à 20%, le test est positif. Cette technique met donc en évidence des anticorps fixant le complément. Lorsque les anticorps sont des IgM (et non des IgG) la réaction est rendue négative par le Dithiotreitol (DTT), qui rompt les ponts disulfure entre les 5 immunoglobulines composant les IgM. De plus, la distinction entre anticorps de classe I et/ou II est possible par une adsorption des sérums sur pool de plaquettes, ce qui permet d'éliminer les anticorps de classe I. Elle peut également se faire, lorsque les deux types de lymphocytes sont disponibles, en comparant les résultats des tests faits séparément sur les lymphocytes T – qui n'expriment que les molécules HLA de classe I – et les lymphocytes B qui expriment les molécules de classe I et II.

Cette méthode est utilisée dans 2 situations en transplantation d'organe. Tout d'abord elle permet la réalisation du test canonique du crossmatch de cytométrie (« complement dependent cell-cytotoxicity crossmatch » ou CDCXM). Le crossmatch consiste à effectuer juste avant la transplantation un test de LCT entre les lymphocytes provenant de ganglions et/ou de la rate du donneur, et un ou plusieurs sérums prélevés au cours du suivi pré-transplantation du receveur. La signification péjorative d'un crossmatch positif en transplantation rénale a été décrite en 1969 par Patel et Terasaki (123). Pour la plupart des équipes, un crossmatch positif est une contre-indication à la greffe en raison du risque de rejet hyperaigu. De fait, en

respectant cette contre-indication, la fréquence du rejet hyperaigu liée aux anticorps anti-HLA préformés a été considérablement réduite en transplantation rénale. Cependant, chez certains patients hyperimmunisés, des protocoles de désensibilisation permettent une transplantation malgré un crossmatch positif (124–126).

Par ailleurs, la technique de LCT est utilisée au cours de l'évaluation pré-greffe dans le but d'évaluer le « Panel Reactive Antibody (PRA) » d'un patient, c'est-à-dire le pourcentage de réactivité vis-à-vis d'une série de lymphocytes provenant d'au moins trente donneurs différents. Ce panel est censé représenter les molécules HLA les plus fréquemment observées chez les donneurs de la zone géographique où réside le receveur. On rend un pourcentage de lymphocytes lysés sur le nombre total de lymphocytes typés du panel (le PRA). La spécificité des anticorps anti-HLA est déduite statistiquement du groupe HLA des lymphocytes du panel donnant une réaction positive et négative. Le PRA reflète la difficulté de greffer un patient puisqu'il représente la largeur d'immunisation vis-à-vis des donneurs potentiels : son évaluation est recommandée au moins 1 à 4 fois / an en pré-transplantation selon le degré d'immunisation et après chaque événement immunisant.

La sensibilité de la LCT a été augmentée en ajoutant un anticorps anti-IgG humaine aux lymphocytes et au sérum (technique appelée AHG-CDC pour anti-human globulin – cell dependent cytotoxicity). Le but est de mettre en évidence les anticorps ne fixant pas le complément – IgG2 et IgG4 –qui seraient liés aux lymphocytes cibles. Cependant, cette technique est difficilement utilisable avec les lymphocytes B du fait de la présence à leur surface de récepteurs aux fragments Fc des IgG humaines.

Bien que la technique de LCT présente des avantages (test fonctionnel, identification des anticorps fixant le complément, et donc uniquement d'anticorps pathogènes, détection d'anticorps non HLA, détection des IgG et des IgM) et reste pour de nombreux laboratoires d'histocompatibilité comme la technique de référence (127), ses limites sont nombreuses : faible standardisation de la technique (panel propre à chaque laboratoire) et donc faible reproductibilité, existence d'antigènes rares non représentés par le panel, incapacité d'identifier avec précision l'ensemble des antigènes cibles, manque de sensibilité, lourdeur, faux positifs, autoanticorps non différenciés. Ceci a conduit au développement de techniques plus sensibles et plus spécifiques.

Le crossmatch par cytométrie en flux

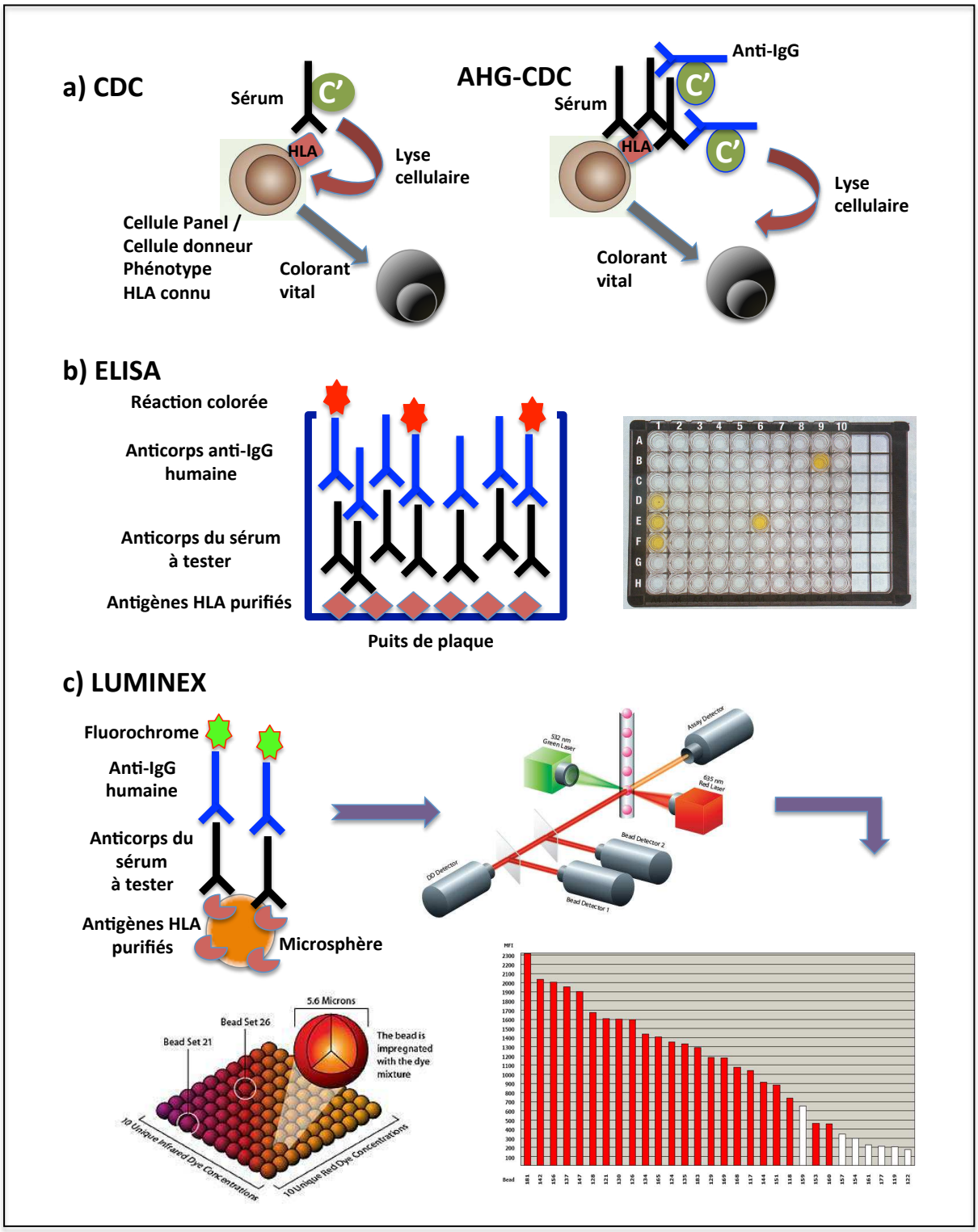
Dans les années 80 ont été développées les techniques de cytométrie en flux pour tester la présence d'anticorps dirigé contre les lymphocytes, sans avoir recours à l'utilisation du

complément, dont la diversité de source était une limité de la reproductibilité de la LCT (128). Cependant, l'utilisation de panels de lymphocytes était beaucoup plus lourde avec cette technique qu'avec la LCT. Aussi la cytométrie de flux a t-elle été limitée à la réalisation du crossmatch, dont elle a augmenté la sensibilité (en anglais, flow-cell crossmatch ou FCXM). Cette méthode consiste à mettre une suspension de lymphocytes du donneur isolés du sang périphérique en présence du sérum du receveur. Après incubation, des anticorps liés à différents conjugués fluorescents sont ensuite ajoutés dans un double but :

- un anticorps anti-CD3 et un anticorps anti-CD19 pour identifier les lymphocytes T et B du donneur, respectivement. Ainsi il n'est pas nécessaire comme pour la LCT de faire des tests séparés sur les lymphocytes T et les lymphocytes B.
- un anticorps secondaire anti-IgG et un anti-IgM pour identifier l'isotype des éventuels anticorps fixés à la surface des lymphocytes.

La fluorescence des lymphocytes T et B du donneur est alors analysée en utilisant un cytomètre de flux. Cette technique permet ainsi de révéler la présence d'IgG et d'IgM dans le sérum du receveur fixées à la surface des lymphocytes du donneur. La cytométrie de flux est plus sensible que la LCT mais plus lourde à mettre en place. La valeur pronostique péjorative d'une transplantation avec un crossmatch en cytométrie positif a bien été mise en évidence dans une étude récente (129). Les auteurs ont montré que 45 patients transplantés avec un FCXM positif mais un CDCXM négatif avaient un plus grand risque de rejet aigu humoral que des patients sans anticorps spécifiques du donneur (DSA) et dont le FCXM était négatif. Ce risque était augmenté que le FCXM soit positif sur les lymphocytes B ou sur les lymphocytes T. De plus, chez les patients avec un FCXM positif et un DSA détecté par Luminex® le jour de la greffe, le DFG estimé à un an était significativement plus bas que chez les patients contrôles. Ceci n'était pas vrai lors d'un FCXM positif sans DSA, ce qui suggère l'existence de faux positifs ou d'anticorps dirigés contre des antigènes lymphocytaires n'appartenant pas au système HLA et n'ayant pas d'impact pronostic péjoratif.

Figure 5 : Les 3 techniques de détection des anticorps anti-HLA



a) Lympocytotoxicité. CDC : Complement-Dependant cell Cytoxicity. AHG : Anti-Human Globulin.
b) ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Au fond de chaque puits sont fixés des antigènes HLA recombinants différents. Après incubation dans la plaque avec le sérum à tester, on fait réagir avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme qui catalyse un substrat et émet un signal chromogénique coloré détecté par spectroscopie.
c) LUMINEX. Chaque bille comporte une fluorescence propre car elle contient une concentration unique de colorant rouge et infra-rouge. Sur chaque bille est fixé un antigène HLA recombinant différent de classe I ou II. Après incubation des billes avec les anticorps du sérum puis un anticorps secondaire anti-IgG-PE, les billes sont passées dans un fluorimètre à deux lasers : l'un pour détecter et reconnaître les billes, l'autre pour détecter la présence de l'anticorps secondaire en cas de présence d'anticorps anti-HLA fixés sur la bille. Le logiciel d'analyse donne ensuite la valeur moyenne de fluorescence bille par bille en fonction de la quantité d'anticorps anti-HLA fixés sur la bille.

Techniques de phase solide : ELISA et Luminex®

Ces techniques dites de phase solide utilisent des molécules HLA solubilisées comme cibles. Elles sont basées sur la solubilisation de molécules de surface de lignées EBV ou de lignées cellulaires exprimant une seule molécule HLA après transfection avec la séquence spécifique (130). Les molécules sont ensuite fixées sur un support solide spécifique à l'essai : une plaque de plastique pour l'ELISA ou des microsphères pour le Luminex®.

** ELISA*

La technique par ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) utilise des antigènes HLA fixés au fond des puits de plaques de plastique **(Figure 5)**. Lorsque des IgG anti-HLA sont présentes dans le sérum, elles se lient aux antigènes fixés au fond des puits dont elles sont spécifiques. Après une phase de lavage destinée à éliminer les immunoglobulines fixées de façon non spécifique vient la phase de réaction avec un anticorps secondaire anti-IgG humaine couplé à une enzyme. Cet anticorps secondaire se lie aux IgG du sérum testé fixées aux antigènes HLA et entraîne, après une nouvelle phase de lavage visant à éliminer les anticorps secondaires non liés, une réaction colorée en présence d'un substrat lors de la phase de révélation. L'analyse par un lecteur de densité optique permet de donner une appréciation quantitative de la quantité d'anticorps fixés ainsi qu'un résultat antigène par antigène puisque chaque puits est recouvert de différents antigènes HLA de classe I et de classe II. Les avantages de la technique ELISA sont nombreux : c'est une technique permettant une identification antigénique de haute définition, rapide, automatisable, standardisée, et plus sensible que la LCT. Cependant, ses inconvénients restent importants mais sont imputables à toutes les techniques de phase solide : coût des réactifs sans possibilité de test à l'unité, test de liaison ne déterminant pas le caractère pathogène des anticorps et donc associé à un excès de sensibilité, temps de réalisation important rendant la technique difficile à utiliser en urgence, absence de détection des anticorps non anti-HLA. Cette méthode est actuellement supplantée par la technique Luminex®.

**** LUMINEX®***

Le principe du Luminex® est proche de celui de la technique ELISA. En effet, cette technique utilise de la même façon des antigènes HLA purifiés, mais fixés ici sur des microsphères ou billes et non sur des plaques **(Figure 5).** Les sérums à tester sont incubés avec un mélange de

billes recouvertes d'antigènes HLA. La fixation d'anticorps anti-HLA à la surface des billes est révélée par un anticorps secondaire anti-IgG couplé à un fluorochrome. La lecture des résultats se fait par un fluorimètre spécifique, le LABscanTM®. Le principe du Luminex® est l'utilisation de 100 billes différentes ayant chacune une fluorescence propre qui lui permet d'être reconnu par le lecteur. Dans le cadre de l'analyse des anticorps anti-HLA par la technique Luminex® single antigen, chaque bille est recouverte d'un antigène HLA recombinant diffèrent ce qui permet la détection d'anticorps dirigés contre 100 antigènes de classe I et de classe II différents. Au moment de la lecture, chaque bille passe devant deux faisceaux lasers :

- l'un (représenté en rouge sur le schéma) permet de reconnaître la bille et ainsi l'antigène correspondant qu'elle porte à sa surface;
- l'autre (représenté en vert sur le schéma) permet d'identifier si des anticorps anti-HLA sont fixés à la surface de la bille par le biais de l'anticorps secondaire fluorescent.

Cette technique a permis de prendre conscience de l'immunisation vis-à-vis d'antigènes de locus considérés auparavant comme dépourvus de relevance clinique : HLA-C, HLA-DQ et HLA-DP et vis-à-vis des chaînes α des antigènes de classe II DQ et DP, négligées auparavant car ne pouvant être testées séparément des chaînes β. Pour les antigènes de classe II surtout, le Luminex® permet d'aller vers un degré de spécificité supplémentaire, allélique, puisque le même antigène est fixé sur plusieurs billes, mais sous des formes alléliques différentes **(Tableau 2)**. Ces anticorps nouvellement identifiés sont de plus en plus reconnus comme pouvant être la source de crossmatches positifs (au moins en cytométrie) et de rejets à médiation humorale. Ceci a conduit de nombreuses autorités de santé comme l'OPTN américain à proposer un typage systématique de haute définition (biologie moléculaire) A, B, C, DR, DQ, DP pour tous les donneurs décédés. En effet, pour pouvoir interpréter ces tests, le typage du donneur doit être d'un niveau qui permet l'évaluation de la spécificité. Par exemple, un anticorps dirigés contre A*0201 et A*0206, deux allèles de A2, pourrait ne pas être réactif contre un donneur A*0203, qui sera typé par méthode sérologique A2.

De plus, la mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) de chaque bille permet de donner une estimation quantitative de chaque anticorps.

L'interprétation des résultats de cette technique est parfois difficile. En effet le seuil de positivité de la MFI est encore discuté, ce d'autant plus qu'il existe des disparités entre les différents laboratoires d'histocompatibilité, à la fois pour le choix de la valeur seuil de MFI mais aussi techniquement pour le résultat d'un même sérum dans la cadre de contrôles de qualité. La difficulté vient du fait que le lecteur rend une MFI pour chaque bille. Quelques unes peuvent avoir une MFI nulle qui ne laisse aucun doute. Puis, il existe un continuum de

MFI allant de très faibles (10-20) à très fortes (plusieurs milliers). La difficulté est de placer le curseur pour les valeurs basses. On peut parfois s'aider des billes faiblement positives portant des antigènes du soi. Un effort d'homogénéisation a été réalisé récemment et a permis de retenir la valeur 1000 de MFI comme une valeur indiscutable de positivité (131). Il persiste une zone grise pour des MFI comprises entre 300-500 et 1000. De plus, la densité d'antigène est variable d'une bille à l'autre et d'un kit à l'autre rendant difficile la standardisation des MFI entre les kits. Il est important de noter aussi la possibilité de faux positifs, en cas de dénaturation des antigènes lors de leur fixation sur les billes (ce qui aboutit à l'exposition d'épitopes normalement cryptiques), mais aussi en cas d'hypergammaglobulinémie polyclonale (comme observée lors de cures d'immunoglobulines intraveineuses). Il est nécessaire dans ce dernier cas de recourir à l'adsorption des anticorps pour limiter le bruit de fond. La collaboration entre les laboratoires et avec les deux fournisseurs de billes est indispensable pour confronter les problèmes rencontrés avec les lots contenant des billes défectueuses. Enfin, le Luminex® SA reste encore une technique très onéreuse.

Cependant, l'excellente sensibilité de cette technique, sa spécificité et son exhaustivité dans l'identification des spécificités anti-HLA, ses informations quantitatives et sa rapidité de réalisation en font actuellement une méthode de choix pour l'identification des anticorps anti-HLA. Son utilisation systématique pour la détection ou l'identification des anticorps chez des patients peu immunisés reste débattue (127).

Tableau 2 : exemples de panels de billes Luminex® de classe I et II

CLASSE I		
N°bille	Allèle	Antigène
1	y	Contrôle neg.
2	y	Contrôle pos.
3	A*01:01	A1
4	A*02:01	A2
5	A*02:03	"
6	A*02:06	"
7	A*03:01	A3
8	A*11:01	A11
9	A*11:02	"
10	A*23:01	A23
11	A*24:02	A24
12	A*24:03	"
13	A*25:01	A25
14	A*26:01	A26
15	A*29:01	A29
16	A*29:02	"
17	A*30:01	A30
18	A*30:02	"
19	A*31:01	A31
20	A*32:01	A32
21	A*33:01	A33
23	A*34:01	A34
24	A*34:02	"
25	A*36:01	A36
26	A*43:01	A43
27	A*66:01	A66
28	A*66:02	"
29	A*68:01	A68
30	A*68:02	"
31	A*69:01	A69
32	A*74:01	A74
33	A*80:01	A80
34	B*07:02	B7
35	B*08:01	B8
36	B*13:02	B13
37	B*14:01	B64
38	B*14:02	B65
39	B*15:01	B62
40	B*15:02	B75
41	B*15:03	B72
42	B*15:10	B71
43	B*15:12	B76
44	B*15:13	B77
45	B*15:16	B63
46	B*18:01	B18
47	B*27:05	B27
48	B*27:08	"
49	B*35:01	B35
50	B*37:01	B37
51	B*38:01	B38
52	B*39:01	B39
53	B*40:01	B60
54	B*40:02	B61
55	B*41:01	B41
56	B*42:01	B42
57	B*44:02	B44
58	B*44:03	"
59	B*45:01	B45
60	B*46:01	B46
61	B*47:01	B47
62	B*48:01	B48
63	B*49:01	B49
64	B*50:01	B50
65	B*51:01	B51
66	B*51:02	"
67	B*52:01	B52
68	B*53:01	B53
69	B*54:01	B54
70	B*55:01	B55
71	B*56:01	B56
72	B*57:01	B57
73	B*57:03	"
74	B*58:01	B58
75	B*59:01	B59
76	B*67:01	B67
77	B*73:01	B73
78	B*78:01	B78
79	B*81:01	B81
80	B*82:01	B82
81	C*01:02	Cw1
82	C*02:02	Cw2
83	C*03:02	Cw10
84	C*03:03	Cw9
85	C*03:04	Cw10
86	C*04:01	Cw4
87	C*05:01	Cw5
88	C*06:02	Cw6
89	C*07:02	Cw7
90	C*08:01	Cw8
91	C*12:03	Cw12
92	C*14:02	Cw14
93	C*15:02	Cw15
94	C*16:01	Cw16
95	C*17:01	Cw17
96	C*18:02	Cw18
97	B*13:01	B13
98	B*15:11	B75
99	B*40:06	B61
100	A*33:03	A33

CLASSE II				
N°bille	Allèles DRB	Allèles DQB	Allèles DQA	Antigène
1	y	y	y	Contrôle neg.
2	y	y	y	Contrôle pos.
3	DRB1*0101	y	y	DR1
4	DRB1*0102	y	y	DR1
5	DRB1*0103	y	y	DR103
6	DRB1*0301	y	y	DR17
7	DRB1*0302	y	y	DR18
8	DRB1*0401	y	y	DR4
9	DRB1*0404	y	y	DR4
10	DRB1*0405	y	y	DR4
11	DRB1*0701	y	y	DR7
12	DRB1*0801	y	y	DR8
13	DRB1*0901	y	y	DR9
14	DRB1*1001	y	y	DR10
15	DRB1*1101	y	y	DR11
16	DRB1*1301	y	y	DR13
17	DRB1*1303	y	y	DR13
18	DRB1*1401	y	y	DR14
19	DRB1*1501	y	y	DR15
20	DRB1*1502	y	y	DR15
21	DRB1*1601	y	y	DR16
22	DRB3*0101	y	y	DR52
23	DRB3*0202	y	y	DR52
24	DRB4*0101	y	y	DR53
25	DRB4*0103	y	y	DR53
26	DRB5*0101	y	y	DR51
27	DRB5*0202	y	y	DR51
28	y	DQB1*0201	DQA1*0201	DQ2
29	y	DQB1*0201	DQA1*0301	DQ2
30	y	DQB1*0201	DQA1*0501	DQ2
31	y	DQB1*0202	DQA1*0201	DQ2
32	y	DQB1*0401	DQA1*0201	DQ4
34	y	DQB1*0402	DQA1*0401	DQ4
35	y	DQB1*0501	DQA1*0101	DQ5
36	y	DQB1*0502	DQA1*0102	DQ5
37	y	DQB1*0601	DQA1*0103	DQ6
38	y	DQB1*0602	DQA1*0102	DQ6
39	y	DQB1*0301	DQA1*0301	DQ7
40	y	DQB1*0301	DQA1*0201	DQ7
41	y	DQB1*0301	DQA1*0601	DQ7
42	y	DQB1*0302	DQA1*0301	DQ8
43	y	DQB1*0302	DQA1*0101	DQ8
44	y	DQB1*0303	DQA1*0301	DQ9
45	y	DQB1*0303	DQA1*0201	DQ9
59	DRB1*0402	y	y	DR4
60	DRB1*0403	y	y	DR4
61	DRB1*1201	y	y	DR12
62	DRB1*0902	y	y	DR9
63	DRB1*1202	y	y	DR12
64	DRB1*1602	y	y	DR16
66	y	DQB1*0301	DQA1*0503	DQ7
67	y	DQB1*0301	DQA1*0505	DQ7
68	y	DQB1*0302	DQA1*0302	DQ8
69	y	DQB1*0303	DQA1*0302	DQ9
70	y	DQB1*0401	DQA1*0303	DQ4
71	y	DQB1*0602	DQA1*0101	DQ6
72	y	DQB1*0603	DQA1*0103	DQ6
73	y	DQB1*0604	DQA1*0102	DQ6
74	y	DQB1*0609	DQA1*0102	DQ6
80	DRB1*1104	y	y	DR11
81	DRB1*1503	y	y	DR15
82	y	DQB1*0302	DQA1*0201	DQ8
89	DRB3*0301	y	y	DR52
95	DRB1*1454	y	y	DR14
96	DRB1*1402	y	y	DR14
97	y	DQB1*0201	DQA1*0401	DQ2
98	y	DQB1*0402	DQA1*0201	DQ4

N°bille	Allèles DPB	Allèles DPA
1	y	y
2	y	y
46	DPB1*0101	DPA1*0201
47	DPB1*0201	DPA1*0103
48	DPB1*0301	DPA1*0103
49	DPB1*0401	DPA1*0103
50	DPB1*0402	DPA1*0103
51	DPB1*0501	DPA1*0201
52	DPB1*0901	DPA1*0201
53	DPB1*1001	DPA1*0201
54	DPB1*1101	DPA1*0103
55	DPB1*1301	DPA1*0201
56	DPB1*1401	DPA1*0201
57	DPB1*1701	DPA1*0201
58	DPB1*1901	DPA1*0103
77	DPB1*1501	DPA1*0201
78	DPB1*1801	DPA1*0201
79	DPB1*2301	DPA1*0201
83	DPB1*0101	DPA1*0103
84	DPB1*0301	DPA1*0105
85	DPB1*1801	DPA1*0105
86	DPB1*1801	DPA1*0104
88	DPB1*2801	DPA1*0105
90	DPB1*0601	DPA1*0201
91	DPB1*0301	DPA1*0201
92	DPB1*1101	DPA1*0105
93	DPB1*2801	DPA1*0201
94	DPB1*1301	DPA1*0105

Stratégies d'utilisation des différentes techniques

Elles seront également discutées dans le chapitre 7.2 car elles reposent sur les résultats, obtenus ces dernières années, des transplantations réalisées en présence d'anticorps spécifiques du donneur détectés par les techniques de phase solide. Pour résumer la controverse actuelle, rappelons que les deux principaux inconvénients des tests cellulaires sont leur absence de standardisation et la détection d'anticorps non anti-HLA non cliniquement significatifs (ce qui est parfois un avantage, certains rejets humoraux typiques étant observés en l'absence d'anticorps anti-HLA). Le pourcentage de faux positifs peut aller jusqu'à 25% avec les tests de cytométrie plus sensibles que la LCT (132). Les techniques de phase solide sont indiscutablement plus sensibles puisqu'elles détectent fréquemment des anticorps spécifiques d'intensité faible à modérée alors que les tests cellulaires sont négatifs. Deux principaux inconvénients sont à noter:

1) la dénaturation de certains antigènes HLA lors de leur fixation sur les billes exposant alors des épitopes cryptiques c'est-à-dire non accessibles à un anticorps lorsque l'antigène est normalement exprimé à la surface de la cellule ;

2) l'extrême sensibilité de la technique conduisant à considérer des anticorps de très faible titre n'ayant pas de signification clinique.

Cet excès de sensibilité a été particulièrement ressenti pour la définition avec ces techniques des patients hyperimmunisés. Le PRA défini par les techniques de phase solide s'est vu considérablement augmenter du fait de l'augmentation massive des spécificités considérées comme positives donc « interdites ». Il est vite apparu dans les différentes expériences de la littérature que tous les anticorps retrouvés avec ces techniques n'avaient pas le même risque. Certains auteurs ont rapporté que ces anticorps uniquement détectés par des techniques de phase solide étaient sans signification clinique, d'autres qu'ils étaient associés à une augmentation du risque de rejet humoral sans effet sur la survie du greffon, d'autres enfin que ces anticorps avaient une valeur pronostique péjorative quant à la survie des greffons.

Ainsi pour certains auteurs, les techniques de phase solide ne devraient pas être utilisées seules pour l'allocation des organes (127,133). Car leur utilisation en tant que « crossmatch virtuel » c'est-à-dire considérer la présence d'un DSA comme l'équivalent d'un crossmatch positif revient à rejeter un nombre très important de spécificités et donc de donneurs potentiels. Or, il n'y a pas d'équivalence entre les deux techniques ou du moins elle doit être déterminée à l'échelon du laboratoire d'histocompatibilité local. Il est communément admis de tout le monde qu'une spécificité positive en LCT doit être considérée comme une incompatibilité inacceptable et donc une contre-indication à la greffe. A l'opposé, une

spécificité négative avec les techniques de phase solide est une spécificité autorisée. Entre les deux, les spécificités positives avec les techniques de phase solide et négatives en LCT doivent être considérées comme des spécificités à risque et être discutées en fonction du contexte clinique du patient. Notamment, il est important de prendre en considération le caractère hyperimmunisé du patient et sa difficulté d'accès à la greffe du fait de ses anticorps positifs en LCT pour autoriser ou non des spécificités à risque, afin de permettre de trouver un donneur à crossmatch négatif et de faciliter la transplantation.

3.3 Pathogénie des anticorps anti-HLA

La cible principale des anticorps anti-HLA est l'endothélium vasculaire à l'interface entre le greffon et la circulation sanguine du receveur. Historiquement, l'effet toxique des anticorps anti-HLA était considéré comme simplement limité à une activation de la voie classique du complément. Des travaux plus récents ont montré que les anticorps pouvaient contribuer au processus de rejet en induisant une réaction d'inflammation et de prolifération par l'activation des cellules endothéliales sur lesquelles ces anticorps se fixent. Enfin, dans certaines circonstances, les anticorps anti-HLA peuvent induire des signaux de survie aboutissant à une résistance au rejet humoral appelée phénomène d'accommodation.

Le rôle du complément

Un point marquant est la variabilité de la réponse endothéliale en présence d'anticorps et de complément **(Figure 6)**. En effet la réponse peut être:
- une thrombose immédiate entraînant un infarctus du greffon ;
- des lésions entraînant un déclin lent et progressif de la fonction du greffon, associées à des dépôts de complément dans la paroi vasculaire ;
- une absence totale de lésions. D'abord décrite pour les transplantations ABO-incompatibles, le développement d'une résistance endothéliale à la destruction en présence d'anticorps pathogéniques et de complément est connu sous le terme d'accommodation.

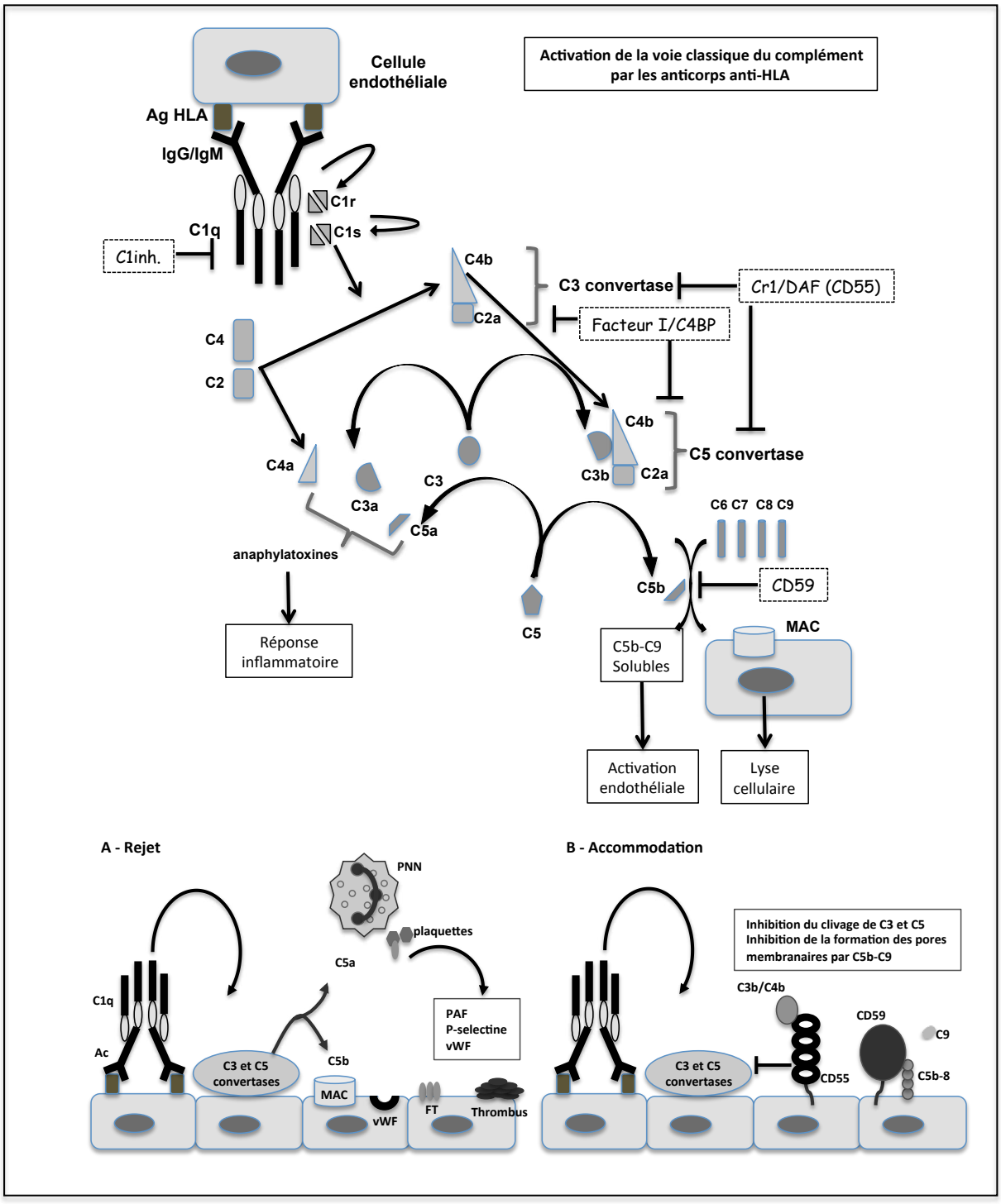
L'effet pathogène principal des anticorps anti-HLA est d'induire l'activation de la voie classique du complément lors de la fixation des anticorps aux molécules HLA du greffon **(Figure 6)** (134). L'activation de C1 (composé de C1q, C1r et C1s) est initiée par l'interaction des domaines globulaires de C1q avec l'IgG ou l'IgM liées aux antigènes HLA exprimés à la surface de l'endothélium du greffon. Les capacités de liaison de C1q par les différentes sous-classes d'IgG sont dans l'ordre décroissant IgG3, IgG1, IgG2 and IgG4. Les changements

conformationnels de C1q qui suivent sa liaison permettent le clivage de C1r, qui à son tour clive et active C1s, qui est l'enzyme qui active C2 et C4.
C4 est clivé par C1s en C4a et C4b. C4b est inactivé par le facteur I en C4d qui reste lié de façon covalente et durable à l'endothélium, à l'inverse du C1q ou des anticorps. L'activation et la régulation des étapes après le stade C4 sont critiques car la partie effectrice est constituée de la voie commune terminale. Si l'activation du complément est bloquée au stade C4 les lésions du greffon sont prévenues ou réduites (135). C4b se combine avec le fragment clivé C2a pour former la C3convertase classique, qui clive C3 en C3a et C3b. Quand une molécule C3b se dépose de façon covalente à proximité immédiate d'une C3 convertase, la C5 convertase — C4b–C2a–C3b — se forme. Le clivage de C5 libère C5a et C5b. Le dernier fragment initie la formation du complexe d'attaque membranaire (C5b-C9), responsable de la lyse des cellules endothéliales. Par ailleurs le complexe C5b-C9 soluble peut également avoir un effet activateur sur l'endothélium.
L'activation du complément conduit également à l'agression du greffon en attirant des cellules inflammatoires par le biais des composés chémo-attractants C3a et C5a. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages expriment en effet les récepteurs de surface pour C3a et C5a (CD88). De plus, C3a a un effet vasoactif en induisant la libération de prostaglandine E2 par les macrophages, et C5a induit un œdème en provoquant la libération d'histamine par les mastocytes.

Notons également l'effet du complément sur l'activation endothéliale : augmentation de la production de molécules pro-inflammatoires (cytokines, chémokines, molécules d'adhésion et facteurs de croissance) (136). C3a et C5a induisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales comme la E-selectine, VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1) et ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), mais aussi la synthèse de cytokines et de chémokines, comme l'interleukin-1α (IL-1α), IL-6, CCL5 (ou RANTES) et CXCL8 (ou IL-8). C3a et C5a favorisent également la signalisation par la voie des MAPkinases dans les cellules endothéliales (137).

Enfin, les systèmes du complément et de la coagulation peuvent tous deux être déclenchés par la liaison des alloanticorps sur l'endothélium du greffon. Ce sont deux voies sont des cascades de sérine protéases avec de nombreuses connexions potentielles (138). La réponse pro-coagulante sur l'endothélium ciblé par les anticorps est déclenchée par C5a et C5b–C9. Ces interactions entre cascades du complément et de la coagulation ont un impact négatif sur l'évolution des rejets humoraux.

Figure 6 : Activation de la voie classique du complément par les anticorps anti-HLA



Haut : activation de la voie classique du complément par les anticorps anti-HLA se fixant aux molécules HLA exprimées sur les cellules endothéliales. Abréviations : C1inh. : C1-inhibiteur ; DAF : Decay acceleration factor ; Co-F. co-facteurs ; MAC : complexe d'attaque membranaire.

Bas : **A – Activation de la voie classique conduisant au rejet.** C5a et C5b-C9 activent les polynucléaires neutrophiles (PNN), les plaquettes et l'endothélium, ce qui induit la libération de facteurs pro-inflammatoires et pro-thrombotiques comme PAF (« platelet activating factor »), la P-sélectine, le facteur tissulaire (FT) et le facteur Von Willebrandt (vWF). Ceci conduit au développement de lésions endothéliales et de thromboses.

B – Accommodation. L'hyperexpression de CD55 (DAF) et de CD59 (protectine) induit une résistance au complément malgré la présence d'anticorps pathogènes. CD55 se lie au C3b et au C4b, ce qui les dissocie de la C3 convertase et de la C5 convertase, et limite la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-C9. CD59 se lie au complexe C5b-C8 et empêche la fixation de C9 et sa polymérisation pour former les pores membranaires. *D'après (134) et (157)*

Mécanismes indépendants du complément

Les anticorps anti-HLA peuvent également avoir des effets pathogènes sur les cellules endothéliales indépendants de l'activation du complément, et qui peuvent participer au rejet d'allogreffe. S'il paraît évident que l'activation du complément est un mécanisme primordial du rejet aigu humoral, il n'en est pas de même pour le rejet chronique humoral. En effet, les anticorps anti-HLA peuvent induire l'activation des cellules endothéliales en l'absence de complément et de cellules inflammatoires. Les anticorps dirigés contre les molécules HLA de classe Il augmentent la phosphorylation des tyrosines et les niveaux de NFκB dans des cellules endothéliales de veine ombilicale et de vaisseaux cardiaques, ce qui favorise leur prolifération *in vitro* (139). Ils induisent également la production de chémokines CCL2 et CXCL1 par des cellules endothéliales murines (140). Cette activation transcriptionnelle peut être propice à la prolifération de l'intima artérielle qui est caractéristique du rejet chronique humoral.

Les anticorps peuvent également avoir un effet cytotoxique sur les cellules endothéliales en recrutant des cellules porteuses d'un récepteur de faible affinité au fragment Fc des immunoglobulines FcγRIII (CD16), à savoir les cellules natural killer et les macrophages. Il s'agit de l'ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity). La contribution de ce mécanisme au rejet humoral reste incertaine car peu de modèles expérimentaux l'ont mis en évidence. Cependant il est intéressant de noter que le polymorphisme d'un autre récepteur, inhibiteur lui, FcγRIIa (CD32) corrèle avec le risque de rejet aigu (141).

Signalisation intracellulaire induite par les anticorps anti-HLA dans les cellules endothéliales

La signalisation intracellulaire orientant vers l'accommodation plutôt que la prolifération cellulaire est dépendante du degré d'agrégation moléculaire qui est déterminée par la spécificité et la concentration de l'anticorps (142). Ce paradigme a une importance particulière pour le devenir des transplantations chez les receveurs produisant des DSA *de novo* après transplantation. Les patients avec un fort titre de DSA ont un plus haut risque de développer un rejet chronique, alors que les patients avec de faibles titres développeraient plutôt une forme d'accommodation.

En plus du rôle bien établi de présentation antigénique, les molécules HLA de classe I contrôlent des fonctions cellulaires en transmettant des signaux intracellulaires. Plusieurs groupes dont celui d'Elaine Reed, ont montré que la liaison des anticorps aux molécules HLA

de classe I à la surface de la cellule endothéliale a pour effet d'induire la prolifération des cellules endothéliales dans un modèle de vasculopathie du transplant (VT) (143). La VT est une maladie vaso-occlusive progressive induisant une ischémie du transplant et une dégradation progressive de sa fonction. La présentation histologique de la VT est une prolifération et une hyperplasie des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales, suggérant un rôle des anticorps anti-HLA dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse.

Les anticorps anti-HLA de classe I induisent l'activation de la protéine G Rho puis une phosphorylation de protéines intracellulaires (144), ce qui conduit à l'assemblage des deux complexes mTORC1 et mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex), et à l'activation concomitante de voies de signalisation de survie et de prolifération (145). L'activation de ces voies de signalisation dans les cellules endothéliales a bien été montrée dans un modèle de greffe cardiaque murine exposé au long cours à des anticorps dirigés contre les molécules du CMH de classe I. Une observation similaire a été faite chez l'homme sur des biopsies endomyocardiques de greffons cardiaques présentant des lésions de rejet humoral (146).

L'inhibition de mTORC1 par RNA-interférence ou la rapamycine, un immunosuppresseur largement utilisé, chef de file des inhibiteurs de la mTOR, bloque la prolifération des cellules endothéliales et pourrait être ainsi une voie d'intérêt pour prévenir la VT (147).

Les anticorps anti-HLA de classe II stimulent également la prolifération cellulaire en activant le voie S6K/S6RP, ceci ayant également été vérifié au cours du rejet cardiaque humoral chez l'homme (146). Néanmoins, les voies de signalisation sont beaucoup moins bien étudiées qu'avec les anticorps de classe I et leur mécanisme d'action dans la prolifération cellulaire et la VT doivent être encore approfondis.

Les anticorps dirigés contre les cellules endothéliales et élués de greffons en rejet aigu humoral augmentent l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 dans les cellules endothéliales, ce qui favorise l'adhésion leucocytaire (148). Les anticorps anti-HLA conduisent les cellules endothéliales à libérer *in vitro* et *in vivo* le facteur von-Willebrand (vWF) et la P-sélectine en déclenchant l'exocytose des corps de Weibel–Palade (149) **(Figure 6)**.

Rôle des anticorps anti-HLA dans l'accommodation

Dans certaines circonstances, les anticorps fixés sur les cellules endothéliales peuvent avoir un effet bénéfique sur l'évolution de la transplantation en favorisant l'accommodation. Il s'agit d'une résistance acquise d'un organe greffé aux lésions induites par les anticorps.

L'accommodation a d'abord été observée au cours des transplantations rénales ABO incompatibles. Dans ce contexte, les anticorps anti A/B étaient éliminés et l'accommodation obtenue en dépit de la réapparition des anticorps et de la forte expression des antigènes A/B à la surface des cellules endothéliales.

Les mécanismes évoqués dans ce phénomène sont l'expression induite par les anticorps de protéines de survie ou cytoprotectives, et/ou la régulation des composants terminaux du complément (150). De façon notable et similaire à ce qui est observé au cours des transplantations ABO incompatibles, l'accommodation peut être induite au cours des xénotransplantations en diminuant le titre des anticorps anti-donneurs (151).

Les cellules endothéliales d'une xénogreffe cardiaque accommodée et non rejetée expriment les gènes de survie A20, Bcl-2, Bcl-xL les protéines cytoprotectives heme-oxygenase (HO) et l'oxyde nitrique (NO) (152). De plus les greffons cardiaques ont une VT sévère alors que les greffons accommodés non. Dans les greffons rénaux ayant une survie prolongée et les greffons rénaux ABO incompatibles accommodés, ces mêmes gènes de survie n'ont pas été retrouvés, ce qui montre qu'ils ne sont pas impliqués dans le maintien à long terme de l'accommodation (153).

L'accommodation peut également être obtenue en inhibant l'activation du complément **(Figure 6)**. Le blocage du complément par un anticorps anti-C5 prévient la survenue du rejet aigu humoral dans un modèle murin mimant la pré-sensibilisation anti-HLA avec une augmentation de l'expression des gènes anti-apotpotiques Bcl-2 et Bcl-xL (154). Des essais thérapeutiques sont en cours avec l'anticorps monoclonal eculizumab anti-C5 en transplantation rénale chez des sujets fortement immunisés. Plusieurs mécanismes d'accommodation ont été proposés. Les cellules endothéliales humaines expriment CD46 ou MCP et CD55, qui inhibent le clivage de C3 et C5 par les convertases classiques et alternes. Les cellules endothéliales expriment également CD59 ("protectine") qui bloque l'insertion du complexe d'attaque membranaire dans la membrane cellulaire. Des données suggèrent que l'accommodation des greffons cardiaques et rénaux est liée à l'augmentation de l'expression de CD55 et CD59 (155,156).

Le rôle du titre des anticorps anti-donneurs dans le processus d'accommodation a été exploré dans un modèle de xénogreffe de rat vers la souris au cours duquel l'accommodation est induite par des injections répétées de faibles quantités d'anticorps anti-donneur (157). Cette administration de faibles doses d'anticorps augmente l'expression des protéines régulatrices du complément DAF (decay accelerating factor), Crry (complement receptor-related protein) et CD59 par l'endothélium du greffon (157). Ces trois protéines régulent négativement l'activation du complément et inhibent le rejet hyperaigu.

Concernant le rôle des anticorps anti-HLA dans le processus d'accommodation, il pourrait être corroboré par l'observation qu'environ 20 à 30% des patients développent avec le temps des anticorps contre leur donneur, mais que leur apparition n'est pas toujours accompagnée d'un phénomène de rejet aigu humoral, particulièrement si leur titre est faible. Ces données suggèrent que comme les anticorps ABO, les anticorps anti-HLA à un faible titre peuvent conduire à l'accommodation. Des modèles *in vitro* et *in vivo* vont dans ce sens. L'agrégation des molécules de classe I par de faibles quantités d'anticorps induit la survie des cellules endothéliales en activant la voie mTORC2 (145), qui augmente la survie cellulaire par l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2. De façon similaire, l'expression de Bcl-xL est augmentée dans l'endothélium de patients ayant un greffon rénal accommodé (158).
Ces résultats suggèrent que l'accommodation est un phénomène actif induit par de faibles quantités d'anticorps anti-donneur qui activent la voie mTORC2/Akt et augmentent l'expression des protéines de survie dans l'endothélium du greffon.
La question qui reste en suspens est celle du maintien à long terme de l'accommodation par l'exposition permanente des cellules endothéliales aux anticorps anti-HLA, même à de faibles concentrations. Des données expérimentales chez l'animal suggèrent que cette exposition prolongée aux anticorps anti-CMH conduisent au rejet chronique plutôt qu'à l'accommodation (159,160). Dans un modèle de greffe murine cardiaque, l'exposition pendant 15 jours à des anticorps anti-donneur de classe I conduit à de hauts niveaux de phosphorylation d'Akt et d'expression de Bcl-2, évoquant un processus d'accommodation. A l'inverse, à J30, les protéines phosphorylées étaient celles impliquées dans la prolifération cellulaire. Ceci suggère que la durée de l'exposition aux anticorps contribue à des différences d'évolution. Une exposition à court terme favorise l'expression des protéines impliquées dans la survie/accommodation alors que l'exposition au long cours favorise les protéines de la prolifération et du rejet chronique.

4. Les voies d'exposition aux alloantigènes

Les trois principales sources d'allo-immunisation vis-à-vis des antigènes HLA ont été reconnues depuis longtemps et restent à ce jour la grossesse, les transfusions sanguines et les transplantations d'organe. On verra plus loin néanmoins que des patients peuvent développer des anticorps anti-HLA en l'absence de ces évènements immunisants.

4.1 La grossesse

La grossesse reste une cause majeure d'immunisation en raison de la présentation des antigènes fœto-paternels à l'interface materno-fœtal. De plus, des cellules fœtales passent dans la circulation sanguine maternelle. Il existe en fait un trafic cellulaire bi-directionnel (161). Lo et coll. ont en effet retrouvé des cellules fœtales dans la circulation maternelle chez 50% des femmes enceintes testées mais aussi des cellules maternelles dans le sang de cordon dans 42% des cas.

On pense que 30% des femmes développent des anticorps anti-HLA durant la grossesse à l'accouchement (162). Dans une étude portant sur 5834 femmes donneuses de sang, l'incidence globale des anticorps anti-HLA en dépistage Luminex® chez celles ayant eu au moins une grossesse est de 24,4% *versus* 1,7% chez les femmes n'ayant pas eu de grossesse (163). L'incidence des alloanticorps augmente avec le nombre de grossesse : 11,2% (une), 22,5% (deux), 27,5% (trois), et 32,2% (4 ou plus; $p < 0,0001$).

Chez la plupart des patientes, ces anticorps apparaissent au cours du troisième trimestre ou après l'accouchement (162). Ceci explique que l'incidence des anticorps est de 32% après une grossesse menée à terme *versus* 10% après un avortement spontané. Le plus souvent, ces anticorps diminuent rapidement et disparaissent à distance de l'accouchement, mais ils peuvent persister pendant plusieurs années chez certaines femmes (164). Un des facteurs qui pourrait expliquer la persistance des anticorps serait la présence permanente d'antigènes paternels liée à la persistance de cellules fœtales chez la mère, réalisant ainsi un microchimérisme (165). Dans l'étude de Sivasai et coll., un tel microchimérisme a été détecté chez 66% des patientes immunisées *versus* 25% des patientes non immunisées (166). Un autre mécanisme pourrait être la rétention prolongée d'antigènes fœto-paternels par les cellules folliculaires dendritiques dans les ganglions, discutée plus haut, qui favoriserait la survie des lymphocytes B mémoire spécifiques (25).

4.2 Les transfusions sanguines

Contrairement à une idée longtemps véhiculée, les érythrocytes expriment bien des molécules de HLA de classe I : entre 100 et 2000 par cellule comparé à 10 000 à 20 000 par cellule pour les lymphocytes, qui sont les cellules ayant la plus haute densité d'expression des molécules HLA (167). Les érythrocytes étant 1000 fois plus nombreux dans une poche de transfusion, leur niveau d'expression net du HLA est donc similaire.

Malgré cette charge allogénique élevée, les transfusions sanguines induisent rarement une réponse humorale chez les sujets naïfs. La fréquence maximale dans des études un peu anciennes utilisant la cytotoxicité ou l'ELISA pour la détection des anticorps anti-HLA est en effet de 10 à 12% (168–170). Le titre d'anticorps atteint un pic puis diminue jusqu'à un niveau de base, qui reste constant même en cas de transfusion ultérieure. Cet effet inhibiteur appelé « effet transfusionnel » se traduit par une augmentation de la survie du greffon chez les receveurs ayant reçu une transfusion sanguine issue d'un donneur aléatoire (171) ou du donneur de l'organe greffé (DST ou Donor Specific Transfusion) (172). Les mécanismes de cet effet bénéfique de l'administration intraveineuse d'alloantigènes ne sont pas parfaitement identifiés, mais pourraient être l'induction d'un état anergique, l'effet de cytokines inhibitrices, ou celui de cellules T régulatrices. Néanmoins, ces effets bénéfiques sur la survie ont surtout été observés dans les années 1970 à une époque où la survie à 1 an des greffons était aux alentours de 60-70% du fait d'une grande incidence des rejets aigus, avant l'utilisation des inhibiteurs de la calcineurine. Si certaines études continuent à trouver un bénéfice des transfusions avant transplantation (173), ce n'est pas le cas pour toutes (174).
Dans une étude récente portant sur 7920 donneurs de sang (2086 hommes et 5834 femmes) la prévalence des anticorps anti-HLA en dépistage Luminex® ne différait pas chez les hommes transfusés (1.7%) ou non (1.0%), chez les femmes nullipares transfusées (4.4%) ou non (1.6%). A l'opposé les femmes ayant eu une ou plusieurs grossesses et des transfusions avaient une incidence significativement plus élevée d'anticorps anti HLA que les femmes non transfusées ($p = 0.004$) (175). Le risque d'alloimmunisation après transfusion est également plus important chez les enfants que chez les sujets adultes : 35% avant 20 ans *versus* 7,5% après 20 ans (169). Un autre facteur de risque, qui ne concerne plus actuellement les patients en attente de greffe rénale, est le recours à des transfusions massives : il existe alors une relation nette entre le nombre de transfusions réalisées et l'incidence de l'allo-immunisation qui peut être de plus de 50% dans la drépanocytose (176).

En résumé, la diminution régulière du titre d'anticorps anti-HLA chez les femmes après grossesse explique que ces patientes ne soient pas difficiles à transplanter. Chez celles qui sont transfusées durant la phase d'attente sur liste, l'incidence des anticorps anti-HLA est beaucoup plus importante et rend parfois la transplantation problématique. Enfin, concernant l'effet de la déleucocytation des concentrés érythrocytaires, une étude prospective portant sur 107 patients randomisés pour suivre un protocole de transfusions à partir de concentrés déleucocytés ou non n'a pas montré de différence en termes de fréquence d'alloimmunisation,

de survie du greffon et d'accès à la greffe (177). De nombreuses autres études montrent des résultats similaires chez des patients en attente de greffe (170,178).

4.3 Les transplantations antérieures

On sait maintenant de façon claire grâce aux techniques de détection sensibles comme la technique Luminex® Single Antigen (SA), que les patients peuvent développer des anticorps anti-HLA *de novo* après transplantation, avec une incidence qui augmente avec le temps. Selon le délai après transplantation auquel les patients sont étudiés, le pourcentage des patients ayant des anticorps anti-HLA *de novo* non spécifiques ou spécifiques du donneur varie : 7,4 et 4,6% respectivement entre 2 et 4 ans; 17,6 et 9,5% respectivement entre 4 et 8 ans; 12% pour les deux types d'anticorps après 8 ans (179).

C'est la perte du greffon qui constitue l'évènement le plus à risque d'allo-immunisation, bien que la détection des anticorps ne soit pas maximale au moment de la remise en dialyse. Ainsi, dans une étude portant sur 85 patients suivis après perte de greffon, l'incidence des anticorps anti-HLA n'était que de 19% lors de la remise en dialyse. A distance de la perte de greffon, l'incidence augmentait ensuite jusqu'à 70%, ce qui est le chiffre le plus communément rapporté. Les facteurs possiblement impliqués sont la compatibilité HLA donneur / receveur, la diminution de l'immunosuppression, la détransplantation (180), et les transfusions parfois associées à cette détransplantation (181).

Tout comme avec les grossesses, bien que moins bien documenté, il est probable que la réalisation de transfusions après une perte de greffon s'accompagne d'un risque accru de synthèse d'anticorps anti-HLA.

4.4 Détection d'anticorps anti-HLA chez des patients vierges de tout évènement immunisant conventionnel

L'utilisation de techniques de détection sensibles comme le Luminex® Single Antigen a permis de mettre en évidence des anticorps anti-HLA - parfois à un titre élevé - chez des individus n'ayant jamais eu aucun évènement immunisant classique vis-à-vis du HLA, typiquement des hommes jamais transplantés ni transfusés. Cette observation soulève deux questions:

1) l'origine de ces anticorps qualifiés par les premiers auteurs les ayant rapportés de "naturels";

2) leur signification pathogénique dans le contexte de la transplantation, c'est-à-dire leur capacité à induire, au même titre que les anticorps anti-HLA conventionnels, des lésions de rejet humoral.

Origine des anticorps anti-HLA d'étiologie indéterminée

Les premières observations d'anticorps anti-HLA qualifiés de naturels remontent aux années 1970, à l'ère de la lymphocytotoxicité : des IgM anti-HLA étaient détectées chez des donneurs de sang, avec une fréquence allant jusqu'à 1% (182,183). Cependant, peu de travaux ont confirmé par la suite ces résultats en utilisant les techniques de lymphocytotoxicité. Ce n'est que dans les années 2000 que, avec l'émergence des techniques sensibles de Luminex®, l'existence d'anticorps anti-HLA, cette fois-ci d'isotype IgG, a été démontrée chez des sujets sans antécédent d'événement immunisant conventionnel (184).

L'hypothèse la plus probable pour expliquer la présence de tels anticorps est l'existence d'une réactivité croisée entre des épitopes HLA et des épitopes de micro-organismes, de protéines alimentaires ou d'allergènes. C'est surtout vis-à-vis d'agents infectieux que des analogies avec les molécules du HLA ont été retrouvées, en mettant en évidence le plus souvent une inhibition des réactions de lymphocytotoxicité par les molécules bactériennes : la protéine M1 du streptocoque (185), certains lipopolysaccharides de E. coli et de *Salmonella* (186), des antigènes de *Klebsiella pneumoniae* (187), *Shigella* (188) et *Yersinia* (189). Concernant les virus, des polypeptides du virus de l'herpès humain (souches 5 et 7) ont plus de 80% d'homologie avec la séquence amino-acidique QISQRKL commune aux molécules HLA B*4011, B*4801, B*4803, B*8101, et Cw*1702 (184).

Une autre origine possible de ces anticorps est l'existence d'autoanticorps anti-HLA-E ayant une réactivité croisées avec des molécules HLA de classe Ia. En effet, les molécules HLA de classe Ia classiques (HLA-A, B et C) partagent plusieurs séquences peptidiques avec la molécule HLA-E, une molécule communément exprimée, peu polymorphe, appartenant aux molécules HLA-Ib (190). Ravindranath et coll. ont émis l'hypothèse que des autoanticorps naturels produits contre des séquences peptidiques de la molécule HLA-E pourraient réagir contre certaines molécules HLA de classe I classiques (190). L'étude consistait à tester la présence d'anticorps anti-HLA-E et d'anticorps anti-HLA-Ia dans le sérum de volontaires sains masculins. Les auteurs ont utilisé des billes Luminex® recouvertes de molécules HLA-E recombinantes dénaturées ou de molécules HLA-Ia : 66% des sérums ayant des IgG anti-HLA-E présentaient également un niveau élevé d'IgG anti-HLA-Ia. A l'opposé, 70% des sujets qui n'avaient pas d'anticorps anti-HLA-E dans le sérum n'avaient pas d'anticorps anti

HLA-Ia non plus. Les MFI moyennes des deux types d'anticorps étaient corrélées. De plus, les réactivités anti-HLA-E et anti-HLA-Ia des sérums étaient inhibées par les séquences peptidiques (117AYDGKDY123 et 137DTAAQIS143) communes à la chaine lourde de la molécule HLA-E et à certains allèles de molécules HLA-Ia. Les auteurs ont conclu que des autoanticorps dirigés contre la chaîne lourde de la molécule HLA-E pouvaient être responsables d'une réactivité croisée vis-à-vis d'antigènes HLA-Ia dans le sérum d'individus sans antécédent d'évènement immunisant. Cette étude suggère donc un mécanisme original source d'une alloréactivité naturelle, mais qui n'expliquerait au mieux que l'existence des anticorps anti-HLA de classe I.

Enfin, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire entre protéines animales alimentaires et molécules HLA pour expliquer la présence d'anticorps anti-HLA naturels. La possibilité d'une synthèse d'IgG, d'IgA et/ou d'IgE spécifiques en réponse à une ingestion de protéines animales est connue (191) et permettrait d'évoquer un tel mécanisme. Cependant, dans l'étude détaillée de Ravindranath et coll. (190), l'absence d'anticorps anti-HLA-Ia chez 112 donneurs de sang consommateurs de viande et la présence d'anticorps chez des sujets végétaliens suggéraient que les protéines animales alimentaires n'étaient pas à l'origine des anticorps anti HLA-Ia.

Caractéristiques des anticorps anti-HLA d'étiologie indéterminée

Dans une étude mexicaine, 424 hommes volontaires sains donneurs de sang, donc sans antécédent, ont été testés en Luminex® pour la recherche d'anticorps anti-HLA (184). La fréquence de ces anticorps était très élevée et dépendait du seuil de positivité choisi pour l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des anticorps : 83% des sujets étaient porteurs d'anticorps anti-HLA classe I et/ou II pour un seuil de MFI à 500, 63% pour un seuil à 1000 et 12% pour un seuil à 5000. La détection de ces anticorps était robuste et reproductible. Deux tiers des patients avaient plus de 2 spécificités antigéniques identifiées.

Par ailleurs, les auteurs décrivaient une distribution inhabituelle des spécificités alléliques, neuf spécificités alléliques de classe I ou II étant retrouvées de façon répétée chez plus de 10% des patients. Ainsi par exemple, 18,9% des donneurs de sang étaient porteurs d'anticorps contre A*3002 et plus de 10% contre A*3101, B76, B*8201 et Cw*1701. En recherchant les épitopes contre lesquels ces anticorps étaient dirigés, 16 nouveaux épitopes ont été identifiés qui ne l'avaient jamais été lors d'analyses précédentes de sérums allo-immuns. Ces observations confortent l'hypothèse d'une cross-réactivité avec des antigènes environnementaux. Le terme naturel ne convient d'ailleurs probablement pas à ces anticorps

qui sont des IgG et ont donc probablement fait l'objet d'une réponse vis-à-vis d'un antigène précis, faisant intervenir une réaction de centre germinatif et une aide T spécifique.

Pathogénicité des anticorps anti-HLA d'étiologie indéterminée

Il n'existe pas actuellement de donnée sur la pathogénicité de tels anticorps en transplantation rénale, notamment sur leur association avec le risque de rejet humoral. Pour ces raisons, nous avons conduit une étude présentée en Annexe 2 sur les caractéristiques cliniques, immunologiques et histologiques de 41 premières transplantations rénales réalisées chez des patients masculins, jamais transfusés et porteurs de DSA d'étiologie indéterminée le jour de la greffe. Nous avons montré chez que la présence de DSA de signification indéterminée le jour de la greffe était associé à un risque de rejet aigu humoral clinique ou infraclinique de 14,6% la première année. Sur le plan immunologique, le nombre de DSA par patient était compris entre 1 et 5, et leur MFI était modérée : 1424 ± 1689, mais pouvant aller jusqu'à plus de 8000. Dans tous les cas, le CDCXM était négatif mais le FCXM était positif dans 47% des cas. Il s'agit là d'un résultat important dans la mesure où il a été proposé que ces anticorps soient dirigés contre des antigènes cryptiques rendus accessibles lors de la procédure de fixation de l'antigène HLA sur les billes. Cette observation confirme qu'au contraire ils sont bien dirigés – en tous cas fréquemment – contre des antigènes HLA membranaires sous forme native, comme évoqué par El Awar et coll. dans une autre étude (192). Cette positivité du crossmatch en cytométrie confirme le caractère pathogène de ces anticorps et leur association à un risque augmenté de rejet humoral (129). Néanmoins l'évolution à un an de ces transplantations réalisées en présence de DSA d'étiologie indéterminée est favorable, avec 100% de survie du greffon, une bonne fonction rénale et des séquelles histologiques des épisodes de rejet humoral très modérées. Aucun patient n'a évolué après traitement du rejet aigu humoral, vers un rejet chronique.

La conclusion de notre étude est que si l'événement immunisant conduisant à la synthèse de ces anticorps est différent, la pathogénie de ces anticorps est identique à celle de DSA conventionnels présents à faibles taux. Ces anticorps reconnaissent les antigènes HLA sous leur forme native et les lésions de rejet humoral sont identiques

5. Implication des lymphocytes B mémoire et des plasmocytes dans la synthèse des alloanticorps

5.1 Trois situations cliniques différentes

On peut distinguer en transplantation différentes situations cliniques qui peuvent faire intervenir des types cellulaires et des mécanismes d'activation différents:

1) la période pré-transplantation chez un patient préalablement immunisé et chez lequel, excepté le cas où le greffon antérieur qui n'est plus fonctionnel n'a pas été retiré, l'antigène n'est plus présent. Il peut également exister un chimérisme périphérique des cellules du greffon ou des cellules foeto-paternelles chez la mère (165). La question de savoir si ces deux phénomènes sont suffisants pour induire une stimulation antigénique permanente à l'origine d'une réaction de centre germinatif chronique, comme on peut l'observer au cours des réactions auto-immunes, reste posée. Compte tenu de la pérennité du titre des alloanticorps et de l'indépendance supposée vis-à-vis de l'antigène le plus souvent absent, l'hypothèse la plus probable est ici l'implication des plasmocytes à longue durée de vie dans le maintien de l'immunité humorale, mais elle n'est pas démontrée.

2) la période post-transplantation chez un patient préalablement immunisé.
Dans le cas où le nouveau greffon est porteur d'un antigène contre lequel le patient a été préalablement immunisé, on est en présence d'une réponse humorale secondaire spécifique d'antigène de type « rappel ». Le rappel nécessite un contact spécifique avec les lymphocytes TFH « mémoire », qui assurent une régulation rapide des réponses B mémoire (34). Ce contact spécifique induit une expansion clonale accélérée, en 2 à 3 jours, à la fois des lymphocytes B et des TFH mémoire, qui conduit à la différentiation extra-folliculaire et la prolifération de plasmocytes de haute affinité, et donc à la synthèse rapide d'anticorps spécifiques. Il a également été montré récemment que certains lymphocytes B mémoire ayant un phénotype de centre germinatif pouvaient initier une nouvelle réaction de centre germinatif lors d'un rappel avec certains antigènes, notamment particulaires (33).
Ceci a été bien montré sur le plan cinétique par le travail de Burns et coll. (193). Certains patients ayant des DSA préformés ont une augmentation entre J4 et J10 après transplantation du titre des DSA qui se traduit par la survenue d'un rejet aigu humoral. Ce délai est comparable à celui observé au cours d'un rappel vaccinal. Dans le cadre de la transplantation,

contrairement à la vaccination, ce qui est troublant est la possibilité d'obtenir une réponse humorale secondaire dans un contexte de déplétion lymphocytaire T profonde comme celle qui survient après traitement par globulines anti-thymocytes (ATG), ce qui est une immunosuppression communément appliquée aux patients porteurs d'alloanticorps. On peut aussi émettre l'hypothèse d'une stimulation polyclonale " bystander " de lymphocytes B mémoire aboutissant à la génération de plasmocytes à courte durée de vie, indépendamment de l'effet auxiliaire des lymphocytes T.

3) la période post-transplantation chez un patient non immunisé.

La synthèse *de novo* d'anticorps dirigés contre le greffon correspond à une réponse humorale primaire et survient en général plus tardivement. En effet, la réponse primaire est en général bloquée par le traitement immunosuppresseur fort anti-lymphocytaire T des premières semaines ou des premiers mois. Cette synthèse *de novo* se fait volontiers plus tardivement lorsque le traitement est volontairement diminué en raison d'une complication ou lorsque le patient devient moins bien observant. Là encore, la mise en place d'une réponse humorale primaire nécessite une collaboration T-B efficace et c'est probablement la levée de l'immunosuppression T avec une fonction B relativement préservée par les régimes immunosuppresseurs actuels qui favorise cette réaction.

5.2 Détection des lymphocytes B mémoire et des plasmocytes alloréactifs

Les quelques travaux qui à ce jour ont cherché à étudier le rôle des différentes sous-populations lymphocytaires B dans la synthèse des anticorps anti-HLA se sont d'abord appliqués à les mettre en évidence chez des sujets immunisés. Quelques groupes se sont employés à détecter la présence de lymphocytes B mémoire alloréactifs et essentiellement une étude a porté spécifiquement sur les plasmocytes alloréactifs.

Détection des lymphocytes B alloréactifs circulants

La mise en évidence des lymphocytes B mémoire alloréactifs circulants se base sur deux types d'observations :

1) le marquage de l'immunoglobuline de surface par des tétramères de molécules HLA permettant ainsi de mettre en évidence la spécificité vis-à-vis d'un antigène HLA donné ;

2) la propriété des lymphocytes B mémoire de se différencier *in vitro* en plasmocytes seulement sous l'effet d'une stimulation polyclonale indépendante de l'antigène (cf chapitre 3.2) qui peut combiner des agonistes des TLR (« Toll-like recepteurs »), des cytokines T, et un signal CD40-Ligand. Cette propriété les distingue des lymphocytes B naïfs qui nécessitent, pour se différencier en plasmocytes, un signal BCR fort, une activation par les lymphocytes T auxiliaires et un 3ème signal qui peut être délivré par un agoniste des TLR ou des cytokines produites par les cellules dendritiques (194).

Mulder et coll. ont été les premiers à isoler à l'aide de tétramères de la molécule HLA A2 les lymphocytes B de femmes immunisées après grossesse et porteuses d'anticorps sériques anti-A2 (195). La proportion de lymphocytes B marqués par les tétramères était de 0,11% ce qui donne une idée de la fréquence des lymphocytes B spécifiques d'un alloantigène donné. Cette fréquence semble plus réaliste que celle qui a été retrouvée dans l'étude de Zachary et coll., portant sur 66 patients en attente de transplantation, où 4 à 5 % des cellules CD19^{+} étaient marquées par un des différents tétramères testés (196,197). Dans ces deux études, les lymphocytes B allospécifiques fixant les tétramères par leur immunoglobuline de surface étaient sélectionnés positivement, et leur différenciation en plasmocytes était effectuée *in vitro* à l'aide d'une coculture avec la lignée EL4.B5 exprimant le CD40-ligand humain et d'un surnageant de culture T. Des IgG et des IgM spécifiques du tétramère – donc anti-A2 – ont bien été retrouvées dans le surnageant de culture à J9 et J16 de culture (195) mais aussi d'autres anticorps réagissant ou non de façon croisée avec la spécificité portée par le tétramère (196).

Dans une étude analogue, Han et coll. ont séparé chez des patients immunisés les lymphocytes B mémoire CD27^{+} et les lymphocytes B naïfs CD27^{-} avant de les mettre en co-culture avec la même lignée CD40L^{+} EL4.B5 et un surnageant de culture T (198). Le surnageant de culture était analysé par Luminex®. Au total, 13 des 16 patients transplantés avaient des anticorps dans leur surnageant. Ces 13 patients avaient au total 50 DSA détectables dans le sérum ou le surnageant, parmi lesquels 35 étaient détectés à la fois dans le sérum et le surnageant, 11 uniquement dans le sérum, et 4 uniquement dans le surnageant. L'hypothèse des auteurs est que ces derniers anticorps traduisent probablement la présence de lymphocytes B mémoire à un très faible niveau ce qui explique leur absence de détection dans le sérum.

Ces trois études montrent qu'il est possible d'isoler chez des sujets immunisés des lymphocytes B circulants mémoire capables de se différencier *in vitro* en plasmocytes sécrétant des alloanticorps sous l'effet d'une stimulation polyclonale.

L'équipe de Leiden a récemment mis au point une technique d'ELISPOT B permettant de déterminer précisément la fréquence de ces lymphocytes B mémoire alloréactifs (199). Le principe repose toujours sur la différenciation *in vitro* des lymphocytes B mémoire en plasmocytes sous l'effet d'une stimulation polyclonale. Au bout de 6 jours de culture, les plasmocytes sont transférés dans une plaque d'ELISPOT dont les puits ont été recouverts avec des monomères d'une molécule HLA donnée. Après 20 heures de mise en contact, la fixation des anticorps spécifiques sur la plaque est révélée par une technique colorimétrique sous la forme de spots dont chacun correspond à la présence d'un plasmablaste. La fréquence des lymphocytes B mémoire spécifiques est ainsi déterminée en faisant le rapport du nombre de spots spécifiques avec le nombre de spots correspondant aux IgG totales déterminé en parallèle avec les cellules du même donneur. Cette fréquence est en moyenne de $45/10^6$ lymphocytes B totaux [0-182] pour les femmes immunisées à la suite d'une grossesse. Cette fréquence est plus faible globalement chez les patients immunisés à la suite d'une transplantation, $20/10^6$ lymphocytes B totaux [1-143] mais 8 patients sur 10 ont moins de 10 cellules/10^6 lymphocytes B. Même si cette technique d'ELISPOT doit être affinée, avec notamment la détermination d'un seuil de positivité, elle reste sûrement la technique de quantification la plus fiable à l'heure actuelle, le marquage en cytométrie à l'aide de tétramères fluorescents étant une technique difficile, du fait de la faible fréquence des lymphocytes B mémoire et de l'absence de recours à une étape d'amplification *in vitro*.

Détection des plasmocytes médullaires alloréactifs

Le rôle des plasmocytes médullaires a été abordé par une étude issue de la Mayo Clinic (200). L'étude a comporté une ponction médullaire avec aspiration et mise en culture des plasmocytes sélectionnés positivement à l'aide de billes $CD138^+$ chez 9 patients immunisés avant l'administration de tout traitement immunosuppresseur. Après une culture de trois jours, un ELISPOT a été réalisé en mettant en contact ces plasmocytes avec des antigènes HLA correspondant à des spécificités présentes dans le sérum. Une analyse des surnageants de culture a été réalisée par Luminex®. La fréquence dans la moelle osseuse des plasmocytes spécifiques d'un antigène HLA donné était de $1/2.10^6$ plasmocytes ($CD138^+$, Ig cytoplasmique$^+$). Le profil des anticorps dans le surnageant de culture des plasmocytes était analysé par Luminex® et comparé à celui du sérum. Toutes les spécificités des anticorps anti-HLA détectés dans le sérum étaient retrouvées dans le surnageant de culture. Il existait cependant une faible corrélation entre le titre des alloanticorps sériques et la fréquence des

plasmocytes déterminée par ELISPOT. A l'opposé, il existait une assez bonne corrélation entre les anticorps sériques et les anticorps du surnageant de culture des plasmocytes : 80% des spécificités du sérum ayant un titre normalisé en cytométrie >1000 (titre fort correspondant à un cross match en cytométrie positif) avaient également un titre élevé dans le surnageant.

En résumé, ces études montrent qu'il est possible d'isoler chez des patients immunisés vis-à-vis d'antigènes HLA à la fois des lymphocytes B mémoire circulants et des plasmocytes médullaires. Elles ne mettent cependant pas directement en évidence le rôle respectif de ces deux populations cellulaires dans la synthèse des anticorps anti-HLA.

6. Rôle de BAFF et des différentes sous-populations lymphocytaires B en transplantation

6.1 Rôle de BAFF et de ses récepteurs dans le développement et l'homéostasie des lymphocytes B

Chez l'homme comme chez les autres mammifères, à l'âge adulte, le nombre de lymphocytes B matures demeure constant. Cette homéostasie lymphocytaire B est un processus complexe qui non seulement doit permettre la survie et la production constante des lymphocytes B protecteurs mais doit aussi assurer l'élimination des lymphocytes B autoréactifs.

L'expression d'un récepteur B pour l'antigène (BCR) fonctionnel est une condition essentielle pour la survie des lymphocytes B périphériques et a longtemps été considérée comme nécessaire et suffisante. La découverte d'un nouveau ligand appartenant à la superfamille du facteur nécrosant les tumeurs (« tumor necrosis factor » (TNF)), dénommé « B-cell activating factor belonging to the TNF family » (BAFF) a changé radicalement cette conception (201). BAFF a donc émergé comme un facteur de survie essentiel, permettant la maturation des lymphocytes B et leur persistance à la périphérie. Un récepteur BCR fonctionnel et BAFF sont donc les deux éléments clés complémentaires de l'homéostasie des lymphocytes B et dont les voies de signalisation sont liées (202).

Développement des lymphocytes B et structuration du récepteur pour l'antigène (BCR)

Les lymphocytes B matures sont caractérisés par l'expression de récepteurs BCR ayant une

diversité très importante, liée à la recombinaison des gènes codant pour les chaînes légères (IgL) et les chaînes lourdes (IgH) des immunoglobulines. Le développement des lymphocytes B a lieu dans le foie durant la vie embryonnaire et dans la moelle osseuse après la naissance. BAFF n'intervient pas à ce stade de développement. Une fois que les cellules sont engagées dans la voie de différenciation lymphocytaire B, elles passent par différents stades (203) :

- **le stade pro-B :** qui implique une signalisation passant par le récepteur de l'interleukine 7 et, à ce stade, débute un réarrangement partiel de la chaîne lourde IgH ;
- **le stade pré-B** : le réarrangement de la chaîne lourde IgH est alors complet et les cellules expriment un pré-BCR, composé d'une chaîne μ, des chaînes légères λ5 et VpreB et des molécules Igα/Igβ. Le réarrangement des chaînes légères d'immunoglobulines commence à ce stade.
- **le stade B immature** : les lymphocytes B expriment un récepteur BCR mature. Ils quittent alors la moelle osseuse pour rejoindre la rate, où ils vont subir une différenciation en cellules transitionnelles immatures avant leur maturation finale (204). On distingue deux catégories de lymphocytes B transitionnels, les cellules T1 qui sont les récents immigrants issus de la moelle osseuse et les cellules T2 qui vont donner naissance aux lymphocytes B folliculaires et aux lymphocytes B de la zone marginale.
- **au stade mature,** le récepteur BCR est composé d'une immunoglobuline membranaire qui n'a pas de capacité intrinsèque de signalisation intracellulaire, mais qui est associée à deux molécules Igα (CD79a) et Igβ (CD79b). La signalisation via ce récepteur BCR est initiée lors de la liaison de l'antigène, qui induit une agrégation des récepteurs et une stimulation de la phosphorylation des tyrosines. La molécule CD19 augmente la signalisation via le récepteur BCR en diminuant le seuil d'activation des lymphocytes B (205).

Les ligands et récepteurs du système BAFF/APRIL

BAFF et APRIL (« A proliferation inducing ligand ») sont essentiellement produits par les cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, et les macrophages, mais aussi par les cellules dendritiques (201). BAFF existe sous une forme membranaire trimérique, qui peut persister telle quelle ou être sécrétée sous forme soluble trimérique lors du clivage à la surface de la cellule, alors que APRIL est clivé à partir de l'appareil de Golgi et est sécrété également sous forme trimérique. La production de BAFF et APRIL par des cellules non hématopoïétiques a récemment été mise en évidence, parmi lesquelles les cellules du cytotrophoblaste, les synoviocytes chez les patients ayant une polyarthrite rhumatoïde, les ostéoclastes au cours du myélome, les glandes salivaires au cours

du syndrome de Sjögren, et dans d'autres maladies auto-immunes ou néoplasiques (45,201). La surexpression de BAFF chez des souris transgéniques conduit en effet à une augmentation des signaux de survie des lymphocytes B et de ce fait à une expansion du compartiment B et à des manifestations sévères d'auto-immunité (206). Nous détaillerons plus loin ces relations entre BAFF et auto-immunité.

Le souris déficientes pour BAFF ont un développement lymphocytaire B bloqué au stade transitionnel T1 et sont presque totalement dépourvues de cellules matures folliculaires et de lymphocytes de la zone marginale (207). Les souris invalidées pour APRIL sont normales en dehors d'une absence d'IgA.

BAFF et APRIL partagent deux récepteurs : TACI (« Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor ») et BCMA (« B cell maturation antigen »). TACI lie BAFF et APRIL avec une affinité modérée et comparable, alors que BCMA a une affinité très élevée pour APRIL et faible pour BAFF (208). En effet, APRIL délivre des signaux de survie aux plasmocytes médullaires à longue durée de vie, sur lesquels BCMA est exprimé presque exclusivement et joue un rôle critique pour leur survie (209). BCMA est également exprimé sur les plasmocytes des amygdales et de la rate.

TACI est considéré comme un facteur régulant négativement la survie des lymphocytes B, dans la mesure ou les souris déficientes en TACI ont une hyperplasie du compartiment lymphocytaire B, et développent auto-immunité et lymphoprolifération (210). TACI est également nécessaire à la commutation isotypique, en particulier vers l'isotype IgA. Les souris $TACI^{-/-}$ sont incapables de faire une réponse T-indépendante de type II (210). Il est exprimé par les lymphocytes B mémoire $CD27^{+}$, par les plasmocytes médullaires et des amygdales, et par une petite proportion de lymphocytes B naïfs, ce qui renforce l'hypothèse du caractère inductible de TACI.

Le troisième récepteur est BAFF-R (BAFF-recepteur ou BR3) auquel seul BAFF se lie avec une haute affinité. BAFF-R est le récepteur dominant de BAFF. Il est largement exprimé sur les lymphocytes B, à l'exception des plasmocytes médullaires, et est le principal récepteur impliqué dans la survie des lymphocytes B dépendante de BAFF. Les souris déficientes en BAFF-R ont un phénotype similaire à celui des souris déficientes en BAFF et sont donc caractérisées par une absence de lymphocyte B périphérique. BAFF-R apparaît lors de la maturation des lymphocytes B immatures. Une coopération des voies de signalisation du BCR et du BAFF-R est nécessaire pour la maturation des lymphocytes B transitionnels en lymphocytes B matures.

6.2 Etude phénotypique des différentes sous-populations lymphocytaires B périphériques chez l'homme

Les différentes sous-populations lymphocytaires B sont définies par des classifications basées sur leur phénotype défini par des marqueurs membranaires détectés en cytométrie de flux. Ces classifications utilisent 4 marqueurs : CD19 (marqueur des lymphocytes B matures), IgD, CD38 et CD27. Il existe deux principales classifications, dont la **figure 7** met en évidence les correspondances:

1) la classification Bm1-Bm5 a d'abord été déterminée dans les amygdales puis ultérieurement validée sur les lymphocytes B circulants. Elle est basée sur le double marquage IgD/CD38 (211,212) et identifie 5 sous-populations:

- les lymphocytes B naïfs vierges (Bm1 : $IgD^{+}CD38^{-}$) ;
- les lymphocytes B naïfs activés (Bm2 : $IgD^{+}CD38^{lo}$) ;
- les lymphocytes B pré-centre germinatif (Bm2′ : $IgD^{+}CD38^{hi}$), cette terminologie concernant essentiellement les lymphocytes des amygdales. Cette catégorie correspond dans le sang principalement aux lymphocytes B transitionnels (213) ;
- les plasmablastes (IgD^{-}, $CD38^{hi}$) ;
- les lymphocytes B mémoire (Bm5: $IgD^{-}CD38^{+/-}$) divisés ultérieurement en lymphocytes B mémoire précoces (early Bm5-$CD38^{lo}$) et tardifs (late Bm5-$CD38^{-}$).

Une relation chronologique entre ces différentes sous-populations paraît implicite mais n'a jamais été démontrée.

2) la classification IgD/CD27 est basée sur la notion que CD27 est un marqueur universel des lymphocytes B mémoire qui permet de les distinguer des lymphocytes B naïfs (IgD^{+}, $CD27^{-}$) (214). Les lymphocytes B mémoire sont de plus séparés en deux catégories: les lymphocytes B mémoire ayant réalisé leur commutation isotypique (lymphocytes B mémoire « switchés » IgD^{-} $CD27^{+}$) et les lymphocytes B mémoire n'ayant pas réalisé de commutation isotypique et exprimant encore l'IgD (et habituellement l'IgM : lymphocytes B mémoire « non switchés » IgD^{+} $CD27^{+}$). Il existe enfin une dernière catégorie de lymphocytes B IgD^{-} $CD27^{-}$.

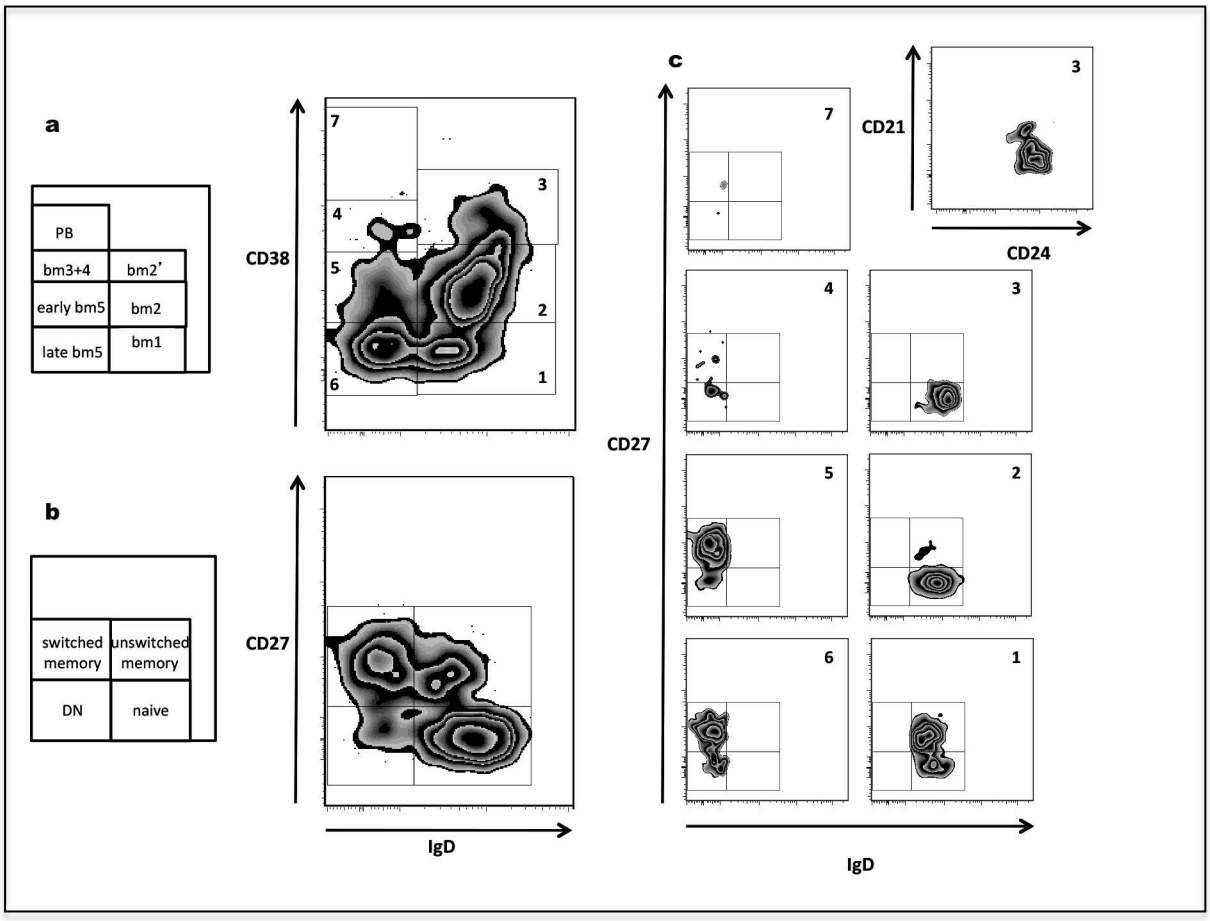
Aucune de ces deux classifications n'est en fait exhaustive (213) dans la mesure où:

- les lymphocytes Bm1 comportent une proportion importante (60%) de lymphocytes B mémoire IgD^{+} $CD27^{+}$ (contre 10% des lymphocytes Bm2 qui constituent donc l'essentiel du pool des lymphocytes B naïfs).
- les lymphocytes Bm2' correspondent dans le sang périphérique aux lymphocytes B transitionnels $CD24^{hi}$ $CD38^{hi}$ $CD21^{hi}$ (213) **(Figure 7)**.
- les lymphocytes B IgD^{-} $CD27^{-}$ comportent également une population de lymphocytes B mémoire $CD27^{-}$ qui sont des lymphocytes Bm5 tardifs (215).

Concernant la fréquence de ces différentes sous-populations lymphocytaires B circulantes dans la population générale des sujets sains, les lymphocytes B naïfs représentent la population prédominante avec 60 à 70% des lymphocytes $CD19^{+}$ circulants et les lymphocytes B mémoire représentent 20 à 30% des lymphocytes B totaux (212,216). Les cellules ayant un phénotype de plasmocytes sont détectés en petit nombre (moins de 2%) et correspondent essentiellement à des plasmablastes récemment générés et ayant migré des organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes B transitionnels constituent 5 à 10% des lymphocytes B circulants.

Bien que les lymphocytes B mémoire et naïfs soient tous deux détectés dans la circulation sanguine, la représentation majoritaire des lymphocytes B naïfs s'explique par le fait que ces mêmes lymphocytes circulent continuellement entre les organes lymphoïdes secondaires en attente de la rencontre avec l'antigène, alors que la plupart des lymphocytes B mémoire résident dans les organe lymphoïdes secondaires, aux sites de drainage de l'antigène.

Figure 7. Classifications Bm1-Bm5 et IgD/CD27 des lymphocytes B périphériques matures



a) La classification Bm1-Bm5 repose sur le double marquage IgD/CD38 des lymphocytes B $CD19^{+}$. b) Classification IgD/CD27 des lymphocytes B $CD19^{+}$. c) Correspondances des deux classifications. Localisation des 7 sous-populations de la classification Bm avec la classification IgD/CD27. Les lymphocytes B transitionnels correspondent à la sous-population du quadrant 3 ($CD24^{hi}$, $CD21^{hi}$, $CD27^{-}$). Abréviations: PB : plasmablastes ; DN : doubles négatives $IgD^{-}CD27^{-}$

6.3 Rôle de BAFF et des différentes sous-populations lymphocytaires B en auto-immunité

BAFF et sélection des lymphocytes B autoréactifs

Le maintien du pool de lymphocytes est un défi pour le système immunitaire qui doit trouver l'équilibre entre la nécessité de minimiser le risque de développer un répertoire lymphocytaire autoréactif et la nécessité de maintenir un nombre de lymphocytes porteurs de BCR distincts suffisamment grand pour assurer une surveillance immune efficace. Pour les lymphocytes B, ces deux besoins en apparence contradictoires sont assurés par l'interdépendance entre les récepteurs BCR et BAFF-R. En effet, la différenciation des lymphocytes B et leur sélection sont contrôlées à la fois par la spécificité du BCR et la disponibilité de BAFF. Les lymphocytes B qui n'ont pas de signal via le récepteur BCR ou BAFF-R meurent, indiquant que ces deux récepteurs sont chacun nécessaire mais non suffisants pour assurer la survie des lymphocytes B.

La sélection liée au BCR contrôle la survie des lymphocytes B en fonction de l'intensité du signal BCR. Un signal fort ou faible identifie respectivement des clones B autoréactifs ou non fonctionnels. La sélection négative vis-à-vis de clones exprimant un BCR autoréactif commence au stade B immature dans la moelle osseuse et se poursuit au cours des stades transitionnels à la périphérie **(figure 8)**. En effet, après l'expression d'un BCR complet, l'élimination sélective des lymphocytes B au stade immature (sélection négative) résulte de la liaison de l'antigène à un BCR de haute avidité (202). Un signal fort délivré lors de cette liaison de l'autoantigène au récepteur BCR conduit à l'apoptose des lymphocytes B, selon le processus de la « délétion clonale ». Les lymphocytes B qui subissent une interaction prolongée ou trop faible entre le BCR et l'autoantigène persistent dans un état anergique jusqu'aux stades transitionnels mais sont susceptibles de mourir par apoptose avant le stade mature. Certains lymphocytes B autoréactifs peuvent subir une sélection positive au stade transitionnel lorsque la transduction via le BCR atteint le seuil minimal de signalisation sans néanmoins atteindre le seuil maximal qui aboutirait à une sélection négative. Les lymphocytes autoréactifs survivent et gagnent alors le stade des lymphocytes B matures. Cette sélection positive est modulée par l'intensité du signal BAFF/BAFF-R. Elle n'a été reconnue que récemment et nécessite une signalisation infraliminaire continue (appelé signal tonique) via le BCR à la fois sur les lymphocytes B en développement à partir du stade pro-B (217) et sur les lymphocytes B matures (218).

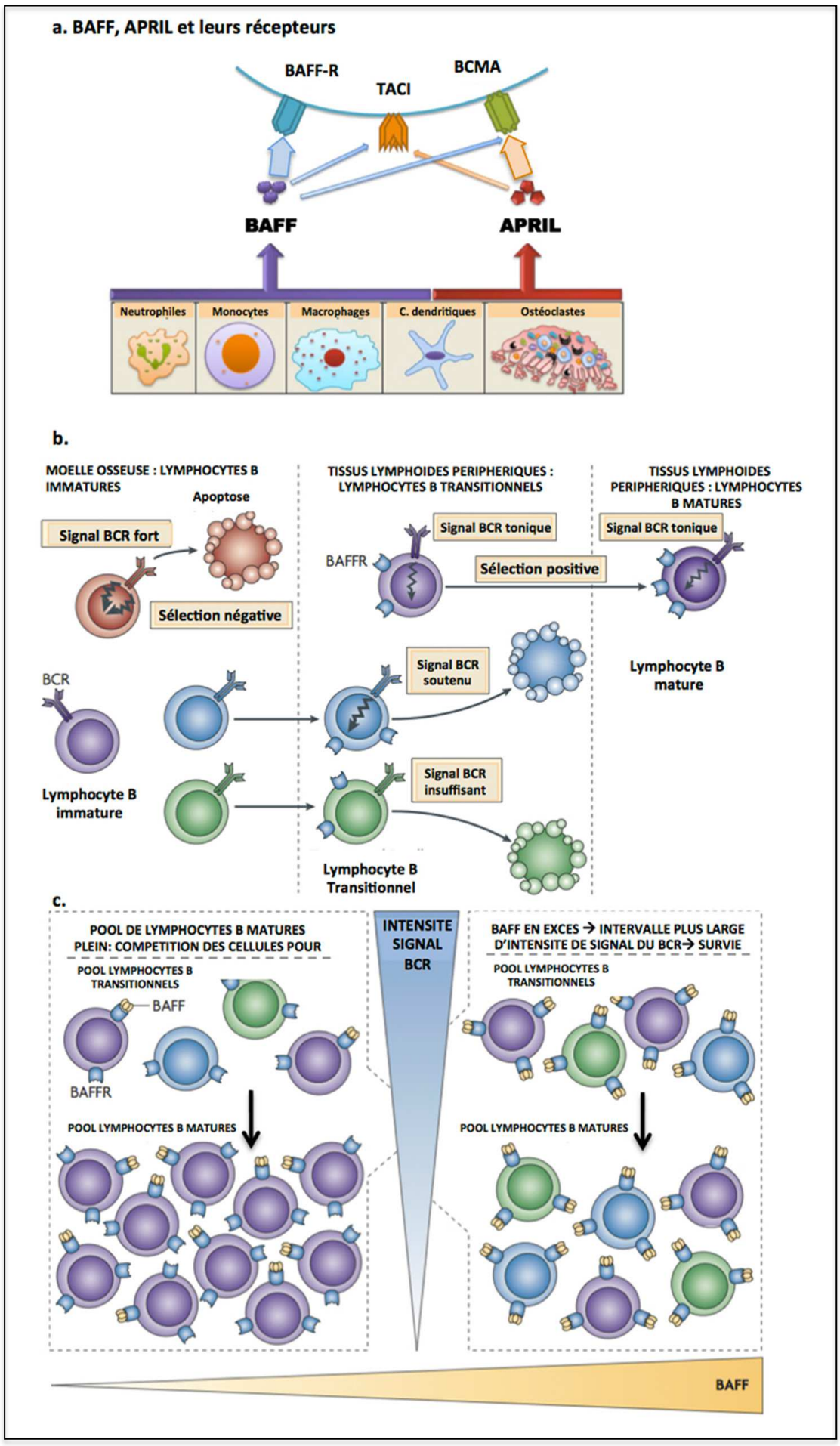
L'expression du récepteur BAFF-R est initiée au stade transitionnel et augmente au fur et à

mesure de la maturation des lymphocytes B. Une fois que les lymphocytes B immatures ont quitté la moelle osseuse, leur devenir, s'ils rencontrent l'autoantigène dépend à la fois de la force du signal via le BCR mais aussi de la compétition vis-à-vis de BAFF avec les cellules non autoréactives. Les signaux délivrés via le récepteur BAFF-R peuvent en effet moduler la force de la sélection positive des cellules transitionnelles **(Figure 8)**. Quand le pool de lymphocytes B matures est à son niveau maximal, la quantité de BAFF disponible est faible, les cellules transitionnelles sont en compétition pour cette faible quantité de BAFF, et l'expression de BAFF-R sur ces cellules est limitée, par conséquent l'intervalle d'intensité de signal via le BCR qui peut aboutir à la survie de la cellule sera faible également (219). En revanche, lorsque le niveau de BAFF est élevé dans une situation « d'espace libre » dans le pool lymphocytaire B (au cours par exemple d'une situation de lymphopénie), l'intervalle de signaux via le BCR qui favorisent la survie des lymphocytes B est plus large. Comme BAFF est en excès, la signalisation via le récepteur BAFF-R est maximale.

Cette relation tripartite entre force du signal via le BCR, niveau de BAFF disponible et compétition entre les clones cellulaires, liée à la taille du compartiment B, a été révélée par des études montrant que les clones B autoréactifs mourraient habituellement au stade transitionnel mais pouvaient être « sauvés » par de forts taux de BAFF et gagner ainsi le pool des lymphocytes B matures ou celui des lymphocytes de la zone marginale (220,221).

Ces observations ont plusieurs conséquences cliniques. Elles suggèrent que l'effet majeur des variations de BAFF (excès ou inhibition) sera de modifier le devenir des lymphocytes B en périphérie après le stade transitionnel T1. De plus, chez les patients présentant une lymphopénie B (comme c’est souvent le cas des patients atteints de lupus érythémateux disséminé), l'excès de BAFF sera renforcé par une diminution de la compétition pour BAFF pour aboutir à une sélection des lymphocytes B autoréactifs. En effet, en pratique clinique, de hauts niveaux sériques de BAFF ont été observés chez des patients présentant un syndrome de Sjögren (222,223), un lupus érythémateux (224), ou d'autres maladies auto-immunes (225). De plus, ces niveaux de BAFF étaient corrélés à l'activité de la maladie et à l'inflammation (226), en accord avec les observations suggérant que BAFF peut être synthétisé localement sur le site de l'inflammation (222).

Figure 8. Rôle de BAFF dans la sélection des clones autoréactifs



Légende figure 8 (page précédente)

a) BAFF, APRIL et leurs récepteurs. b) Les différentes étapes de la sélection des lymphocytes B autoréactifs. c) Les signaux délivrés via BAFF-R modulent la rigueur de la sélection positive opérée par le BCR. Quand le pool de lymphocytes B matures est plein (gauche), la quantité de BAFF disponible est faible et la compétition pour BAFF élevée entre les lymphocytes B transitionnels. L'intervalle d'intensité de signal du BCR est alors étroit et le nombre de lymphocytes autoréactifs qui survivent est limité. Au contraire, en situation d'espace dans le pool des lymphocytes B matures, la signalisation via le BAFF-R est maximale, l'intervalle de signal du BCR qui induit la survie est large et le nombre de lymphocytes B sélectionnés positivement est plus important. *D'après (202).*

Rôle des différentes sous-populations lymphocytaires B en auto-immunité

Les lymphocytes B jouent un rôle pathogénique important dans de nombreuses maladies auto-immunes. En plus de la production d'autoanticorps pathogènes, les lymphocytes B ont des fonctions à la fois protectrices et pathogènes qui reposent sur des mécanismes indépendants de la synthèse d'anticorps. Ces mécanismes font fréquemment intervenir la sécrétion de nombreuses cytokines et ont pour cibles l'activation des lymphocytes T autoréactifs, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'organisations de tissus lymphoïdes ectopiques (227). Des travaux récents ont suggéré que les lymphocytes B, par leur sécrétion de cytokines, régulent à la fois la réponse humorale et la réponse cellulaire (228). Chez la souris, des lymphocytes B effecteurs Be1 et Be2 présentant un profil de sécrétion de cytokines polarisée ont ainsi été décrits, qui orientent les lymphocytes T vers un profil TH1 ou TH2 (229). De même, les lymphocytes B1 murins orientent les lymphocytes T vers une différenciation TH1/TH17 alors que les lymphocytes B2 orientent plutôt vers un profil de cellules T régulatrices (Treg) (230). De plus, les lymphocytes B effecteurs peuvent également réguler la formation de tissus lymphoïdes ectopiques (ou tertiaires), souvent observés dans les organes cibles au cours des maladies auto-immunes. Ces structures inductibles participent à la réponse immune locale et stimulent les lymphocytes B et T autoréactifs. Les lymphocytes B dans les follicules ectopiques peuvent sécréter des cytokines inflammatoires (IFNγ, IL-6, TNFα, LTα). Ainsi les lymphocytes B pourraient participer à l'induction et au maintien d'une réponse inflammatoire locale dans les organes cibles de l'auto-immunité.

A l'opposé, un nombre croissant de travaux, chez la souris, mettent en évidence le rôle de lymphocytes B régulateurs capable de prévenir ou supprimer l'auto-immunité (231). Ce rôle

des lymphocytes B régulateurs se manifeste en induisant une anergie des lymphocytes T, l'expansion des lymphocytes Treg ou en supprimant directement l'activité des lymphocytes pathogènes TH1 ou TH17. Cet effet est lié au moins en partie à la sécrétion d'IL-10 et de TGFβ, et intervient dans le contrôle de plusieurs maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires du colon, le diabète auto-immun, ou l'encéphalite auto-immune expérimentale. Chez l'homme, l'existence des lymphocytes B régulateurs est encore controversée. Néanmoins la corrélation qui existe entre l'expansion des lymphocytes B transitionnels et la rémission durable du lupus après déplétion par anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab) suggère une fonction régulatrice de cette sous-population.

De l'équilibre entre ces deux types de populations dépend l'activité de la maladie auto-immune et la réponse au traitement déplétif anti-CD20. De fait, le rituximab est utilisé avec succès dans un nombre croissant de pathologies auto-immunes.

Chez l'homme, plusieurs maladies auto-immunes sont associées à des anomalies de répartition des différentes sous-populations lymphocytaires B périphériques. Plus particulièrement, au cours du lupus érythémateux de nombreuses modifications de l'homéostasie lymphocytaire B sont observées. Les plus fréquentes, chez les patients ayant une maladie active, sont une diminution des lymphocytes B naïfs, une augmentation relative des lymphocytes B mémoire $CD27^{+}$ et une expansion des plasmablastes $CD27^{hi}$ (232). Au cours du syndrome de Sjögren, c'est au contraire la fréquence des lymphocytes naïfs Bm2 qui est augmentée aux dépens des populations mémoire Bm1 (qui comportent des lymphocytes B mémoire IgD^{+}) et Bm5, dont les proportions sont nettement abaissées par rapport aux sujets sains (212). On note également une augmentation des lymphocytes Bm2' qui comportent les cellules transitionnelles. Ce phénotype d'activation lymphocytaire B est associé à la production de facteurs rhumatoïdes présentant un degré de mutations somatiques inférieur à celui observé au cours de la polyarthrite rhumatoïde. Nous verrons dans le premier article de la partie expérimentale que des anomalies similaires de répartition des sous-populations lymphocytaires B sont associées à la synthèse d'anticorps anti-HLA chez les patients immunisés en attente d'une transplantation rénale.

6.4 Rôle de BAFF et des sous-populations lymphocytaires B en transplantation

Rôle de BAFF en transplantation

Compte tenu des données corrélant l'activité de maladies auto-immunes avec le niveau de BAFF et du fait que la synthèse de BAFF par des cellules de l'immunité innée ou des lymphocytes peut être liée à des réponses immunes en cours, il était intéressant d'étudier le rôle de BAFF en transplantation.

Le niveau de BAFF, de son ARN messager, ainsi que des transcrits codant pour ses trois récepteurs a été analysé dans le sang de 143 patients transplantés rénaux présentant une fonction rénale stable, à 5 ans ou plus de la transplantation (233). Les patients avec une concentration de BAFF soluble plus élevée avaient un plus haut risque de développer des anticorps spécifiques du donneur (DSA). De façon étonnante, il existait une corrélation négative entre le risque d'apparition de DSA et le niveau du transcrit de BAFF. De plus, les patients ayant un niveau d'expression élevé de BAFF-R avaient un risque supérieur de dysfonction rénale. Même si le niveau de BAFF soluble et le niveau d'expression de BAFF-R étaient inversement corrélés, ce qui est une donnée attendue puisque l'on mesure le niveau de BAFF qui n'est pas lié à son récepteur, ces deux marqueurs définissent possiblement des situations à risque d'évoluer vers la synthèse de DSA et un rejet humoral.

Deux autres études plus limitées ont montré une association, pour l'une entre le niveau d'expression de BAFF sur les lymphocytes T, et l'existence d'une dysfonction rénale (234), et pour l'autre entre le niveau d'expression de BAFF sur des biopsies du greffon et l'expression du facteur C4d du complément (235).

Dans un autre contexte d'allo-immunité, les patients ayant reçu une allogreffe de moelle osseuse et développé une maladie du greffon contre l'hôte chronique (cGVHD), maladie identifiée comme possiblement consécutive à l'effet d'alloanticorps, avaient un rapport entre les taux de BAFF et le nombre de lymphocytes B supérieur à celui de volontaires sains ou de patients greffés de moelle sans cGVHD (236).

Transplantation et déplétion lymphocytaire

Le rôle de BAFF a également été étudié chez les patients transplantés en relation avec l'existence d'une déplétion lymphocytaire. Compte tenu de l'implication de BAFF dans l'homéostasie lymphocytaire B comme élément régulateur de « l'espace » B périphérique, l'hypothèse était que BAFF pouvait également intervenir dans les situations de lymphopénie

B rencontrées dans le contexte de la transplantation, c'est-à-dire la lymphopénie associée à l'insuffisance rénale chronique terminale ou la déplétion lymphocytaire B induite par les traitements immunosuppresseurs.

Nous aborderons le lien possible entre l'insuffisance rénale chronique, la lymphopénie B et BAFF dans la première partie des résultats portant sur l'étude des sous populations lymphocytaires B chez les patients en attente de transplantation rénale. Une partie de nos travaux concernant le lien entre BAFF et la déplétion lymphocytaire B induite par les globulines anti-thymocytaires – qui contiennent des anticorps dirigés contre plusieurs molécules de surface des lymphocytes B humains – sont présentés en annexe 1. Dans les situations de déplétion lymphocytaire induite, le niveau sérique de BAFF augmente. L'explication la plus simple pour expliquer ce phénomène est une augmentation de la quantité libre de BAFF liée à une diminution du nombre de récepteurs exprimés sur les lymphocytes B (220). Cependant, d'autres mécanismes pourraient intervenir. Chez des patients traités par rituximab pour une maladie auto-immune, il existe concomitamment à l'augmentation de la concentration de BAFF, une augmentation des niveaux de son ARNm (237). Cette augmentation du niveau de BAFF après déplétion lymphocytaire a été corrélée à des rechutes chez des patients traités par rituximab dans le lupus érythémateux, le syndrome de Sjögren, les vascularites systémiques ou le purpura thrombopénique idiopathique (238). L'effet bénéfique de la déplétion B résulte dans ce contexte probablement à la fois de la délétion des lymphocytes B pathogènes et d'un effet à long terme secondaire à la reconstitution du répertoire B. Cette déplétion B est associée à l'émergence de cellules transitionnelles et à une réémergence retardée des lymphocytes B mémoire, donc à un phénotype B immature (239). A l'inverse, les rechutes au cours de ces mêmes maladies auto-immunes sont associées à une récupération plus précoce des lymphocytes B mémoire. L'efficacité du traitement par anti-CD20 réside probablement aussi dans le fait que même si des cellules transitionnelles autoréactives sont sélectionnées grâce à la disponibilité de BAFF, elles ne se différencient pas en cellules productrices d'anticorps (239).

Ce lien entre reconstitution du compartiment lymphocytaire B après déplétion lymphocytaire et activité de la maladie pourrait s'appliquer également au domaine de la transplantation d'organe, notamment rénale. En effet, une lymphopénie B associée à de forts taux de BAFF peut promouvoir l'émergence de nouveaux clones B ayant une spécificité alloréactive et autoréactive.

Au moins trois agents ayant un effet déplétant sur les lymphocytes B sont couramment utilisés en transplantation : les globulines anti-thymocytes (ATG), l'alemtuzumab (anticorps monoclonal anti-CD52) et le rituximab, ce dernier étant fréquemment utilisé en prévention ou

en traitement curatif des rejets à médiation humorale.

L'effet de l'ATG, couramment utilisé comme traitement d'induction en transplantation rénale, sur les sous-populations lymphocytaires B et les concentrations sériques de BAFF a fait l'objet d'un travail qui est présenté en annexe 1.

L'alemtuzumab, un anticorps monoclonal anti-CD52 induit, du fait de l'expression de CD52 sur les lymphocytes T et B, une déplétion lymphocytaire prolongée portant à la fois sur les lymphocytes T et les lymphocytes B, ce qui en fait également un traitement d'induction fréquemment utilisé. Or, certaines études ont montré une augmentation du risque de rejet humoral et de développement de DSA chez les patients traités par alemtuzumab, suivi d'une monothérapie par rapamycine (sirolimus) ou un inhibiteur de calcineurine (240,241). Bloom et coll. ont observé que le niveau sérique de BAFF restait très élevé par rapport à des sujets contrôles pendant une longue période d'au moins deux ans chez les patients après induction par alemtuzumab (242). De plus, ils ont observé un effet direct *in vitro* de BAFF favorisant l'activation des lymphocytes B alloréactifs au cours d'une culture mixte lymphocytaire.

Une autre étude va à l'encontre d'un effet négatif des traitements déplétant les lymphocytes. Ainsi, Cherukuri et coll. ont observé que deux ans après une induction par alemtuzumab ou basiliximab (un anticorps anti-CD25 non déplétant), les patients ayant la proportion la plus faible de lymphocytes B naïfs, de lymphocytes B régulateurs et de lymphocytes transitionnels avaient la moins bonne fonction rénale et l'incidence la plus élevée de survenue de DSA. Les concentrations sériques de BAFF n'ont pas été mesurées dans cette étude (243).

Rôle des sous-populations lymphocytaires B

Le rôle des sous-populations lymphocytaires B a été très peu abordé dans le domaine de la transplantation et fait l'objet, dans la relation avec l'immunisation anti-HLA, de la première partie de ce travail. Néanmoins, à l'instar des travaux cités plus haut sur les effets multiples des lymphocytes B en auto-immunité, des travaux important réalisés chez des sujets transplantés rénaux mettent en évidence un rôle régulateur possible des lymphocytes B en allo-immunité. Trois études ont en effet montré l'existence d'une « signature » phénotypique, transcriptomique et cytokinique B, chez des patients transplantés rénaux « opérationnellement tolérants » c'est-à-dire ayant une fonction rénale stable en l'absence de tout traitement immunosuppresseur (244–246). La première observation est l'augmentation du nombre de lymphocytes B totaux circulants et de lymphocytes B naïfs comparés aux patients ayant une fonction rénale également stable, mais sous une trithérapie immunosuppressive classique comportant in inhibiteur de la calcineurine ou un inhibiteur de la mTOR. De plus, le nombre

des lymphocytes B transitionnels est augmenté chez ces patients et constitue la sous-population ayant la plus forte valeur prédictive de la tolérance opérationnelle. La fréquence des lymphocytes B transitionnels exprimant de l'IL-10 est également significativement plus élevée chez les patients tolérants. Enfin, on note dans le sang des patients tolérants une élévation du niveau d'expression de transcrits de gènes dont la plupart sont spécifiques des lymphocytes B, parmi lesquels un groupe de trois gènes, ayant une forte valeur prédictive de tolérance, est exprimé durant la différenciation des lymphocytes pré-B en lymphocytes matures ou durant la transition induite par la stimulation antigénique. Des études ont en effet montré que des lymphocytes B matures utilisaient l'édition de leur BCR après stimulation par l'antigène comme moyen d'obtenir une tolérance aux antigènes du soi (231,247). Cependant, aucun de ces travaux ne démontre l'existence d'une population de lymphocytes B régulateurs chez les patients. Même si ces cellules synthétisent pour une partie d'entre elles une cytokine régulatrice, l'IL-10, la synthèse de TGFβ, elle, n'est pas augmentée. Le lien causal entre présence d'une population transitionnelle IL-10^{+} et la tolérance n'est pas non plus clairement démontré. Il n'est en somme pas établi que cette signature reflète les mécanismes ayant conduit à la tolérance et qu'elle ne soit plutôt une conséquence de l'état de tolérance.

7. Importance du rejet humoral et des anticorps spécifiques du donneur en transplantation rénale.

Malgré une amélioration de la survie des greffons à court terme liée à la réduction des épisodes de rejet aigus cellulaires, les pertes tardives de greffon restent très nombreuses et la survie des greffons n'a été que modestement améliorée au cours des dernières années. Ainsi le nombre de patients en attente d'une retransplantation ne fait qu'augmenter, ces patients étant pour bon nombre immunisés, c'est-à-dire porteurs d'anticorps anti-HLA et, de ce fait, difficiles à transplanter. L'identification des facteurs conduisant à la perte de ces greffons est donc un enjeu majeur, tant sur le plan de la compréhension des mécanismes que pour la mise au point de thérapeutiques adaptées. Durant les trois premières décennies de la transplantation, les efforts ont convergé vers la mise au point de traitements immunosuppresseurs actifs sur les lymphocytes T, essentiellement les inhibiteurs de la calcineurine, avec un succès certain qui a permis de réduire l'incidence des rejets aigus cellulaires aux alentours de 10 à 15%, la plupart des épisodes restant sensibles à un traitement curatif. Ces mêmes inhibiteurs de la calcineurine, c'est-à-dire la ciclosporine et le tacrolimus,

ont été rendus responsables autour des années 2000, du fait de leur néphrotoxicité, de la diminution de fonction et de survie des greffons rénaux. Par conséquent de nombreux protocoles d'arrêt ou de minimisation des inhibiteurs de la calcineurine ont été mis au point avec des succès très variables (248).

Notre vision du rejet et des causes de pertes de greffon a changé depuis une dizaine année: il apparaît maintenant que le contrôle insuffisant de la réponse allo-immune humorale par les combinaisons immunosuppressives actuelles conduit à la synthèse d'anticorps dirigés contre le greffon ou DSA qui créent un cortège de lésions inflammatoires aiguës et/ou chroniques, altérant la fonction et la survie du greffon.

7.1 Circonstances d'apparition des anticorps spécifiques du donneur

Les DSA peuvent survenir dans deux grands types de circonstances :

- les DSA préformés préexistent à la transplantation et sont la conséquence de transfusions, grossesses et/ou transplantations préalables. L'influence de ces facteurs immunisants a été discutée au chapitre 4.
- les DSA *de novo* peuvent survenir à n'importe quel moment après la transplantation et leur incidence augmente avec le délai post-transplantation (entre 20 et 30% à 10 ans) en général chez des patients peu ou pas immunisés avant transplantation, les patients fortement immunisés bénéficiant eux d'un traitement immunosuppresseur plus lourd censé prévenir la synthèse de nouveaux anticorps (249,250). En effet, ces DSA *de novo* témoignent d'une immunosuppression insuffisante, soit parce que le patient nécessite intrinsèquement un traitement plus lourd que le traitement « standard » pour contrôler son immunité humorale, soit parce l'immunosuppression a été diminuée en raison de complications infectieuses ou tumorales soit enfin, en raison d'une mauvaise observance thérapeutique.

7.2 Les différentes formes de rejet humoral

La reconnaissance de ces lésions humorales a été rendue possible par plusieurs avancées :
- la mise au point de techniques de détection très sensibles des anticorps anti-HLA, dites de phase solide (cf paragraphe 3.2), qui permettent de détecter les anticorps anti-HLA à des seuils très inférieurs à ceux que permettait la technique de lymphocytotoxicité ;
- la reconnaissance sur les biopsies du greffon de lésions histologiques aiguës et chroniques spécifiques de l'agression humorale du greffon par les DSA **(Tableau 3)**. Ces signes histologiques sont regroupés et classés par la classification de Banff, et régulièrement remis à jour lors de conférences de consensus (251). A ces signes histologiques est associé un marqueur immunohistologique, le marquage du facteur C4d du complément, détecté à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-C4d sur les biopsies de greffon, et témoin de l'activation de la voie classique du complément par les alloanticorps. Ce marqueur est néanmoins inconstant et fluctuant dans le temps et n'est plus un critère nécessaire pour porter le diagnostic de rejet humoral (252).

Le rejet aigu humoral

Le rejet humoral doit être considéré comme un continuum, une maladie progressive et chronique liée à la présence des DSA, et non un épisode sporadique émaillant l'évolution d'une transplantation (253). Néanmoins, il peut exister de véritables épisodes de rejets aigus humoraux associant insuffisance rénale aiguë, signes histologiques **(Tableau 3)** et présence de DSA circulants. Ces épisodes de rejets aigus humoraux peuvent survenir précocement chez des sujets préalablement immunisés et porteurs de DSA préformés. Ils peuvent également survenir, de façon plus retardée en général, suite à la synthèse de DSA *de novo*. Ce tableau est volontiers rencontré lors d'un processus de minimisation du traitement immunosuppresseur de maintenance ou lors d'une mauvaise observance thérapeutique. Précisons que la forme la plus « fulgurante » du rejet aigu humoral, le rejet hyperaigu, qui associait dans les premières minutes de la greffe un œdème massif et des thromboses vasculaires étendues du greffon, n'est plus observée. Il s'agissait d'une cause fréquente de perte précoce de greffon liée à la présence de DSA préformés à haut titre et non détectés, qui a maintenant disparu grâce à l'utilisation systématique du crossmatch par LCT et au respect de la contre-indication d'un crossmatch positif, en l'absence de l'utilisation anticipée d'un protocole de désensibilisation.

Tableau 3 : Classification de BANFF 97/2009 des lésions histologiques du greffon rénal

1. Normal
2. Antibody-mediated changes (may coincide with categories 3, 4 and 5 and 6)
   Due to documentation of circulating antidonor antibody, C4d,[1] and allograft pathology
C4d deposition without morphologic evidence of active rejection
   C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, no signs of acute or chronic TCMR or ABMR (i.e. g0, cg0, ptc0, no ptc lamination (<5 layers by electron microscopy), no ATN-like minimal inflammation). Cases with simultaneous borderline changes are considered as indeterminate
Acute antibody-mediated rejection[2]
   C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury, such as (Type/Grade)
   I. ATN-like minimal inflammation
   II. Capillary and or glomerular inflammation (ptc/g >0) and/or thromboses
   III. Arterial – v3
Chronic active antibody-mediated rejection[2]
   C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multilayering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries
3. Borderline changes: 'Suspicious' for acute T-cell mediated rejection (may coincide with categories 2 and 5, and 6)
   This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of tubulitis (t1, t2 or t3) with minor interstitial infiltration (i0 or i1) or interstitial infiltration (i2, i3) with mild (t1) tubulitis
4. T-cell mediated rejection (TCMR, may coincide with categories 2 and 5 and 6)
Acute T-cell mediated rejection (Type/Grade:)
   IA. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2)
   IB. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3)
   IIA. Cases with mild to moderate intimal arteritis (v1)
   IIB. Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)
   III. Cases with 'transmural' arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
Chronic active T-cell mediated rejection
   'chronic allograft arteriopathy' (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neo-intima)
5. Interstitial fibrosis and tubular atrophy, no evidence of any specific etiology
   (may include nonspecific vascular and glomerular sclerosis, but severity graded by tubulointerstitial features)
   Grade
   I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (<25% of cortical area)
   II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area)
   III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/ loss (>50% of cortical area)
6. Other: Changes not considered to be due to rejection- acute and/or chronic (For diagnoses see table 14 in (49); may include isolated g, cg, or cv lesions and coincide with categories 2, 3, 4, and 5)

ATN : « acute tubular necrosis » ou nécrose tubulaire aiguë. Référence (251).

Le rejet humoral infraclinique

Cependant les rejets aigus humoraux aigus à expression clinique sont peu fréquents. Ceci est dû à la détection et à l'identification durant la période d'attente sur liste des anticorps anti-HLA présentés par le receveur, souvent par LCT et Luminex®. Ceci permet d'identifier avant transplantation les spécificités HLA contre lesquelles le receveur a développé des anticorps et d'éviter de le transplanter avec un greffon porteur de ces spécificités: on parle de crossmatch virtuel c'est-à-dire de prévision du crossmatch sur la base des spécificités identifiées par les techniques de phase solide (254). Pour les patients fortement immunisés dont l'accès à la transplantation est difficile, on peut accepter de réaliser ces transplantations en présence de DSA c'est-à-dire avec un crossmatch virtuel positif, voire un crossmatch historique en LCT positif (dans ce dernier cas le crossmatch réalisé avec un sérum présentant les DSA au plus haut niveau est positif alors que le crossmatch avec le sérum du jour de la transplantation est obligatoirement négatif). On aura recours dans ce cas à un protocole de désensibilisation (soit pré-greffe lorsqu'il s'agit d'une transplantation programmée avec un donneur vivant, soit en post-transplantation immédiat lorsqu'il s'agit d'une transplantation non programmée avec un donneur décédé). Ces protocoles de désensibilisation reposent sur les plasmaphérèses (255–257) et/ou l'administration d'immunoglobulines intraveineuses (126,258), dans le but de diminuer l'effet des anticorps anti-HLA, et parfois sur le rituximab, bien qu'aucune étude contrôlée n'ait montré d'intérêt à associer cet anticorps anti-CD20, dans le but de prévenir la resynthèse des DSA. Ces stratégies permettent de transplanter les patients fortement immunisés avec de bons résultats à court terme, et un bénéfice en termes de survie du patient par rapport au maintien sur liste d'attente (257).

La surveillance de ces patients par des biopsies sériées systématiques, au cours de la première année post-greffe, a permis de mettre en évidence une nouvelle forme de rejet humoral appelé « rejet humoral infraclinique » ou « indolent », correspondant à l'observation des lésions histologiques typiques de rejet aigu humoral (capillarite glomérulaire et péritubulaire, marquage C4d éventuel), avec une conservation de la fonction rénale (259,260).

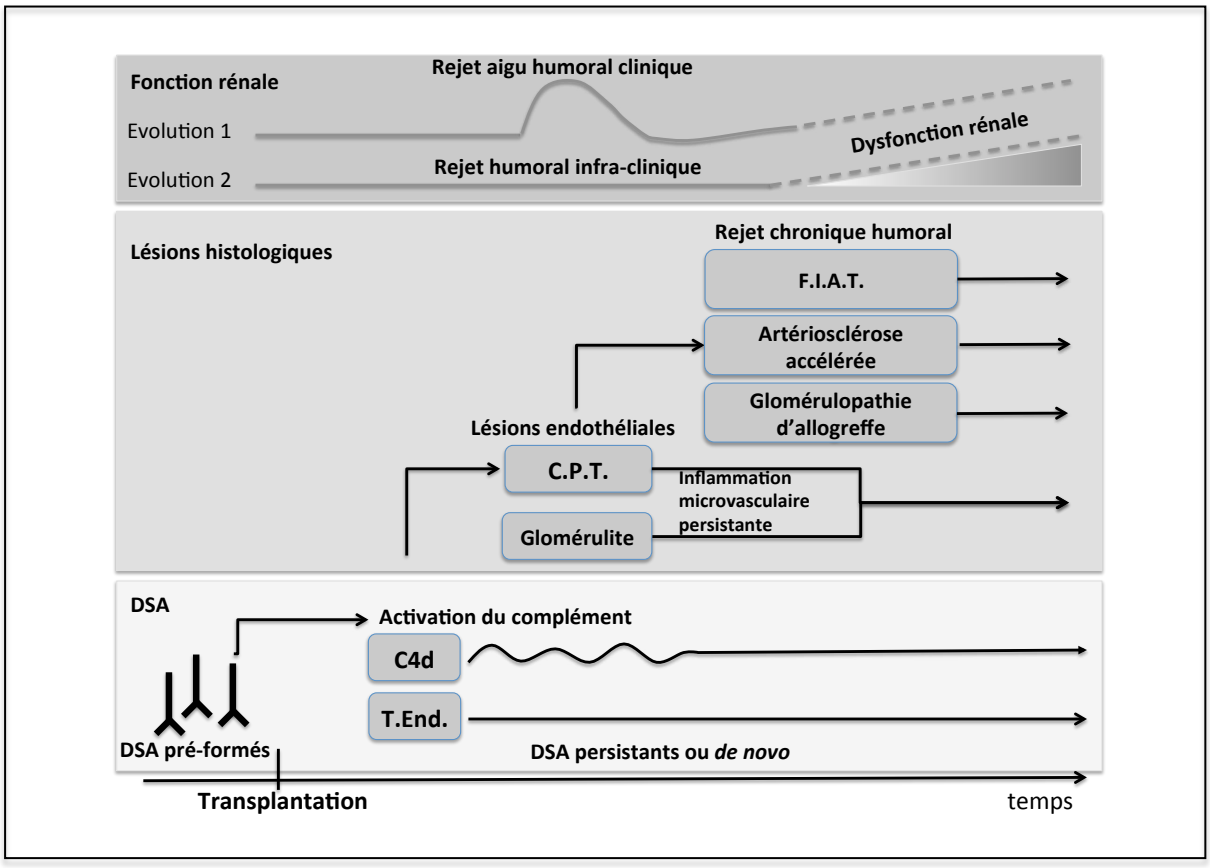
Une autre circonstance d'observation de ce rejet humoral infraclinique est l'apparition de DSA *de novo* qui, de façon insidieuse en l'absence de toute manifestation clinique, va conduire au développement de lésions de rejet humoral. En l'absence de biopsies du greffon systématiques – qui ne sont pas réalisées en général après la 1ère année post-transplantation – ou du dépistage systématique des anticorps, ce type de rejet demeure totalement méconnu jusqu'à un stade avancé de rejet chronique humoral, auquel s'installe une dysfonction irréversible du greffon.

Le rejet chronique humoral

Les rejets aigus humoraux clinique et infraclinique aboutissent tous deux progressivement au développement du rejet chronique humoral. Les lésions inflammatoires de la microcirculation (capillarite glomérulaire et péritubulaire) peuvent persister pendant plusieurs mois ou années si les DSA restent présents. Après un délai variable, elles aboutissent à des lésions chroniques qui sont associées au développement d'une protéinurie et au déclin, souvent irréversible, de la fonction rénale. Ces lésions chroniques histologiques associent à des degrés variables une altération des membranes basales glomérulaires appelée « glomérulopathie d'allogreffe » et/ou des capillaires péritubulaires (251), une accélération des lésions d'artériosclérose (261) et le le développement d'une fibrose interstitielle et d'une atrophie tubulaire. Ces lésions, à l'inverse des lésions inflammatoires de la microcirculation, sont considérées comme irréversibles, et il apparaît aujourd'hui évident que les interventions thérapeutiques, pour pouvoir être efficaces, doivent être appliquées avant l'installation de ces lésions chroniques.

La **figure 9** résume donc l'histoire naturelle du rejet humoral (134,253). L'existence de DSA préformés ou l'apparition de DSA *de novo* après transplantation activent le complément et l'endothélium. Dans certains cas, cette activation se manifeste par un épisode de rejet aigu humoral, dans d'autres cas par une progression infraclinique des lésions histologiques. Après un certain temps d'évolution apparaissent des lésions irréversibles de rejet chronique humoral, conduisant au déclin de la fonction rénale.

Figure 9. Histoire naturelle du rejet à médiation humorale



Abréviations : DSA : donor-specific antibodies ; T. End. : transcrits endothéliaux (expression très élevée de transcrits endothéliaux spécifiques traduisant l'existence d'une agression de l'endothélium) ; C.P.T. : capillarite péri-tubulaire ; FIAT : Fibrose interstitielle et atrophie tubulaire. *D'après (253).*

7.3 Implication du rejet chronique humoral dans les pertes tardives de greffons

Grâce à l'utilisation des critères histologiques de rejet humoral et aux techniques de détection des DSA, le rôle prééminent du rejet chronique humoral (RCH) dans les pertes tardives du greffon a pu être mis en évidence. Dans plusieurs études du groupe d'Edmonton (249,262), près de 15% des biopsies réalisées après un an pour une dégradation de fonction avaient un tableau complet de RCH selon la classification de Banff (c'est-à-dire essentiellement une glomérulopathie d'allogreffe). Lorsque l'on élargissait le diagnostic de RCH aux lésions inflammatoires chroniques de la microcirculation, celui-ci était responsable de 63% des pertes de greffon survenues chez les patients ayant eu une biopsie du greffon après un an (262).
Dans l'étude multicentrique américaine DeKaf, 173 patients ont eu une biopsie pour dégradation de fonction après un délai moyen de 7,3 ans. Au total, 57% de ces patients avaient un marquage C4d positif et/ou des DSA positifs. La survie des greffons était significativement moins bonne en présence d'un marquage C4d positif, qu'il y ait ou non des DSA circulants. Mais la survie était encore moins bonne en présence de ces deux marqueurs (263).
Enfin, dans une étude de la Mayo Clinic portant sur 153 pertes de greffon non liées au décès du patient, la glomérulopathie d'allogreffe était responsable de 15% des pertes de greffon après un suivi moyen de 50 mois, l'incidence augmentant à 20% pour les pertes de greffon ayant eu lieu entre 1 an et 5 ans après transplantation (264).

7.4 Valeur pronostique des DSA

Comme nous l'avons montré, les DSA qu'ils soient préformés ou qu'ils apparaissent après transplantation, ne s'accompagnent pas toujours de manifestations cliniques évidentes sous la forme d'un rejet aigu humoral. Leur répercussion fonctionnelle peut n'être que tardive sous la forme d'un déclin progressif de la fonction rénale. Pour cette raison, de nombreuses études ont étudié l'impact des DSA indépendamment des épisodes de rejet humoral.

Valeur pronostique des DSA préformés

Il est bien connu depuis longtemps que les transplantations réalisées avec un crossmatch par LCT positif ont une survie du greffon limitée (123). Plusieurs travaux ont montré que les

patients ayant un crossmatch en cytométrie positif avaient également une survie du greffon diminuée (129). La question qui a fait débat au cours des dernières années a été de savoir si la présence de DSA mis en évidence uniquement par Luminex® avec un crossmatch par LCT négatif était associée à un risque accru de rejet humoral et à une diminution de la survie du greffon. Dans une étude récente de population portant sur 400 patients transplantés rénaux, Lefaucheur et coll. ont montré que la survie des greffons à 8 ans était significativement inférieure en présence de DSA (60,8%) comparée à celle des patients non immunisés (83,6%) et des patients porteurs d'anticorps anti-HLA non dirigés contre le greffon (92,5%) (265). De plus, la présence de DSA, même en l'absence d'un épisode de rejet aigu humoral, était associée à une diminution de la survie du greffon (à 8 ans 69,5% *versus* 84,4% en l'absence de DSA). Les patients qui avaient eu en plus un épisode de rejet humoral avaient un risque relatif de perte du greffon de 4,1 par rapport aux autres patients avec DSA seuls.
Une méta-analyse récente de Mohan et coll. a inclus sept études de cohortes rétrospectives totalisant plus de 1100 patients afin d'évaluer la signification clinique des DSA détectés uniquement par les techniques de phase solide (266). Cette méta-analyse a montré que la présence de DSA isolés (c'est-à-dire avec un flow crossmatch négatif) double le risque de rejet humoral (risque relatif 1.98 ; IC95% : 1.36–2.89 ; $p<0.001$) et augmente le risque de perte du greffon de 76% (risque relatif 1.76 ; IC95% : 1.13–2.74 ; $p=0.01$).

Valeur pronostique des DSA de novo

L'incidence de la survenue des DSA *de novo* est de 15 à 30% à 10 ans de la transplantation (179,249,250). Dans l'étude de Wiebe et coll., la valeur pronostique péjorative de ces anticorps a bien été mise en évidence : la survie à 10 ans des patients porteurs de DSA *de novo* était significativement inférieure à celle des patients n'ayant pas de DSA *de novo* (59% *versus* 96%, $p < 0.0001$) (250). De plus, la survie des patients n'ayant pas d'anticorps anti-HLA, ayant des anticorps anti-HLA non dirigés contre le greffon et ayant des DSA préformés était similaire et significativement supérieure à celle des patients ayant des DSA *de novo*.
Un autre travail du groupe d'Edmonton a montré que la présence de DSA lors d'une biopsie faite pour une dégradation de fonction était associée à des lésions inflammatoires de la microcirculation (249). Sur 145 patients testés, 37% avaient des DSA dont 60% étaient des DSA *de novo*. Ces DSA *de novo* étaient des anticorps de classe II isolés ou associés à des anticorps de classe I mais très rarement des anticorps de classe I isolés. La survie des greffons à partir de la biopsie, comme dans l'étude de Wiebe, était similaire chez les patients sans anticorps anti-HLA, les patients avec des anticorps non spécifiques du donneur, et les patients

avec des DSA préexistant à la greffe. Seul le groupe des patients ayant développé des DSA *de novo* avait une survie du greffon significativement moins bonne, de 47,6% à 3 ans de la biopsie.

En conclusion, de nombreuses études concordantes établissent l'agression humorale du greffon rénal comme une des principales causes, si ce n'est la première cause, de perte tardive du greffon. Ce processus de rejet humoral peut être cliniquement silencieux pendant une période parfois longue. La présence des DSA, qu'ils soient préformés ou qu'ils apparaissent *de novo*, est un donc facteur de mauvais pronostic indépendamment de la survenue d'un épisode de rejet humoral. La prise en charge des patients présentant ces lésions doit être précoce, durant la phase infraclinique du rejet humoral, voire avant que n'apparaissent les lésions histologiques de rejet chronique. En dehors des épisodes de rejet aigu, il n'y a pas de consensus sur la phase optimale de traitement du rejet chronique, aucune modalité thérapeutique n’ayant à ce jour fait la preuve de son efficacité.

Partie 2 – Premier article

ROLE DE BAFF ET DES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES B AU COURS DE L'ALLO-IMMUNISATION ANTI-HLA

Article publié dans la revue ***Transplantation***

"Peripheral B cell phenotype and BAFF levels are associated with HLA immunization in patients awaiting kidney transplantation"

Renaud Snanoudj, Sophie Candon, Dave L. Roelen, Jean-Philippe Jais, Frans H. Claas, Christophe Legendre, and Lucienne Chatenoud.

Objectifs et présentation du travail

Le nombre de patients immunisés en attente de transplantation rénale ne fait qu'augmenter, d'une part du fait du nombre croissant de retransplantations rénales liés aux échecs de greffe, mais également du fait de l'amélioration des techniques de détection des anticorps anti-HLA. Il est connu de longue date que ces anticorps anti-HLA se développent classiquement à la suite d'évènements immunisants vis-à-vis des molécules HLA (transplantations, grossesse, transfusions sanguines), mais parfois aussi en l'absence d'évènement immunisant, comme discuté au chapitre 4 de l'introduction et en annexe. Néanmoins, les mécanismes de la synthèse et du maintien de ces anticorps anti-HLA, ainsi que la caractérisation fine des lymphocytes B impliqués dans leur synthèse sont mal connus.

Peu d'études se sont intéressées au phénotype des lymphocytes B périphériques chez les patients porteurs d'anticorps anti-HLA. Un des objectifs de ce travail a été d'étudier le phénotype par cytométrie en flux des lymphocytes B circulants chez une cohorte de 100 patients admis dans le service de transplantation rénale de l'Hôpital Necker-Enfants Malades pour une transplantation, avant l'administration de tout traitement immunosuppresseur. Nous avons utilisé deux classifications de lymphocytes B matures, l'une basée sur l'expression des marqueurs de surface IgD et CD38 : la classification Bm1-Bm5 (IgD/CD38) et l'autre, la classification IgD/CD27, basée sur l'utilisation de CD27 comme marqueur des lymphocytes B mémoire. La question posée a été de savoir si les patients porteurs d'anticorps anti-HLA avant transplantation avaient une répartition des sous-populations lymphocytaires B périphériques différente de celle des patients non immunisés. Nous avons utilisé pour définir l'immunisation anti-HLA la technique du Luminex® Single Antigen, technique de détection des anticorps anti-HLA ayant la sensibilité la plus élevée (cf chapitre 3.2). Compte tenu de cette sensibilité élevée et d'une certaine variabilité de la technique, nous avons utilisé pour l'analyse des résultats différents seuils de détection.

Nous avons cherché à approcher en parallèle le rôle de BAFF, le facteur essentiel de survie et de différenciation des lymphocytes B matures, dans la synthèse des anticorps anti-HLA avant transplantation. Comme détaillé au chapitre 6, plusieurs études ont montré l'effet positif de BAFF sur la sélection périphérique des clones autoréactifs, notamment dans des conditions de lymphopénie. Cet effet se traduit par une corrélation entre les concentrations sériques de BAFF, le titre d'autoanticorps et l'activité de plusieurs pathologies auto-immunes dont le lupus et le syndrome de Sjögren. En transplantation, le rôle de BAFF a été étudié dans quelques travaux après transplantation, montrant une association entre BAFF, et le risque de rejet humoral après une induction par alemtuzumab ou le risque de développer des DSA. Notre objectif était de rechercher une association entre les concentrations de BAFF, et l'existence et la diversité des anticorps anti-HLA avant transplantation. Une des hypothèses possibles est que, par analogie avec la sélection des clones autoréactifs, des concentrations élevées de BAFF chez un individu donné pourraient favoriser la sélection de clones alloréactifs en présence de l'antigène et ainsi favoriser le développement d'anticorps anti-HLA à la suite d'un événement immunisant.

Peripheral B cell phenotype and BAFF levels are associated with HLA immunization in patients awaiting kidney transplantation

Renaud Snanoudj [1,2,3], Sophie Candon [1,2*], Dave L. Roelen [4], Jean-Philippe Jais [2,5], Frans H. Claas FH.[4], Christophe Legendre[3] and Lucienne Chatenoud [1,2*].

*INSERM U1013, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

*Service de Transplantation Rénale Adulte, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique- Hôpitaux de Paris, Paris, France.

*Leiden University Medical Center, Department of Immunohaematology, Leiden, the Netherlands

*Service de Biostatistique et d'Informatique Médicale, Hôpital Necker, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Paris, France.

* SC and LC contributed equally to the scientific direction of this work

Keywords : end-stage renal disease, kidney transplantation, HLA antibodies, B cells, cytokines, humoral immunity

Word count, abstract: 238 text: 3000

Address for correspondence

Lucienne Chatenoud, Sophie Candon

INSERM U1013

Hôpital Necker-Enfants Malades

149, rue de Sèvres

75015 PARIS France

Tel 01 44 49 52 30

Fax 01 71 19 64 70

e-mail: lucienne.chatenoud@inserm.fr / sophie.candon@inserm.fr

Abstract

Background. The role of B cell subsets in HLA-specific humoral responses in patients with end-stage renal disease is poorly documented. Our objective was to analyze the potential association between B cell subsets distribution and anti-HLA antibodies before kidney transplantation.

Methods. We studied by flow cytometry peripheral B cell subsets and serum levels of BAFF, the main homeostatic cytokine for peripheral B cells, in 101 consecutive end-stage renal disease patients admitted for transplantation.

Results. In patients with HLA antibodies detected with Luminex® single-antigen, the proportion of activated naïve B cells (Bm2) was significantly higher (64.4±15.1 *versus* 52.5±19.1% in HLA antibody-negative patients, p=0.0008) at the expense of memory B cells, as were BAFF serum levels (1651±1297 *versus* 1139±693 pg/mL, p<0.0001). Proportion of Bm2 and BAFF levels were positively associated with the diversity of anti-HLA antibodies. In multivariate analysis, besides HLA-immunizing events (pregnancy and previous transplantation), proportion of Bm2 cells but not of other B cell subsets or BAFF levels, was independently associated with the presence and diversity of anti-HLA antibodies. High proportion of Bm2 cells prior to transplantation was associated with an increased risk of developing *de novo* donor-specific antibodies during the first year post-transplant. We did not find any association between the frequency of antibody-mediated rejection and pre-transplant proportion of any B cell subset or BAFF serum levels.

Conclusion. Increased proportions of activated naïve B cells are linked with pre-transplant HLA immunization and the development of post-transplant donor-specific antibodies.

Introduction

Antibody-mediated rejection (AMR) due to donor-specific alloantibodies (DSA) is now considered as the primary cause of late kidney allograft loss (1,2). The identification and management of HLA sensitized patients has progressed through the development of very sensitive solid phase assays for the detection of HLA antibodies namely, ELISA and Luminex®. However, due to their high sensitivity, these techniques have rendered the definition of a clinically relevant HLA immunization more complex, as HLA antibodies are now detected in higher proportions of patients, even in the absence of classical immunizing event (3,4).

Moreover, few studies analyzing peripheral B cell phenotypes are available in patients awaiting kidney transplantation, which explains that the respective role of B cell subsets in the development of anti-HLA antibodies is poorly understood. Our objective was to fill this gap by analyzing peripheral B cell phenotypes, immunizing events (pregnancy, transfusion, transplantation) and HLA immunization in a cohort of end-stage renal disease (ESRD) patients before transplantation. We particularly addressed the question of a potential association between a particular B cell subsets distribution and the synthesis of HLA antibodies following given immunizing events. To that aim, we used two different B cell phenotypic classifications well described in the literature (the IgD/CD28 or so-called Bm1-Bm5 classification and the IgD/CD27 classification) (5–8), to reliably distinguish naïve B cells, memory B cells and plasmablasts (SDC, Figure 1).

In parallel we addressed the role of B-cell activating factor BAFF, the major cytokine controlling survival and differentiation of mature B cells (9–11). High levels of BAFF *in vivo* potentiate autoimmunity at least in part by preventing the normal deletion of self-reactive B cells at the transition checkpoint from immature B cells to mature B cells (12). This effect translates into a correlation between BAFF concentrations and autoantibody titers as reported

in SLE (13) and Sjögren syndrome (14–16). In the post-transplant setting, it has been recently shown that stable patients with high BAFF serum levels had a greater risk of developing DSA (17). High BAFF levels have also been reported before (18) or after treatment with alemtuzumab (19,20) or rituximab (21) in renal graft recipients experiencing AMR. However, it is currently unknown if BAFF could be involved in the synthesis of HLA antibodies before transplantation (22,23).

Results

Patients' characteristics and anti-HLA immunization

A total of 101 consecutive patients with ESRD were included in this study just prior to transplantation (Table 1). A MFI cut-off value of 1000 is considered as a reliable threshold for the presence of a specific anti-HLA antibody (24). Furthermore, the threshold of 3000 applied to donor-specific antibodies has been shown to be significantly associated with an increased risk of AMR and graft loss (25). It is noteworthy that eighty-three percent of patients with no history of immunizing event had at least one HLA antibody with MFI greater than 1000. At day-0, the mean percentage of positive beads, representing the diversity of HLA immunization, was 15.0 ± 25.8%.

Bm2 activated naïve B cells are the prevalent circulating B cell subset in patients with ESRD pretransplantation.

We compared the distribution of B cell subsets according to the Bm1-Bm5 classification (SDC, Figure 1) in 17 healthy volunteers (mean age 39.9±10.3 years) and in the recruited ESRD patients prior to transplantation. ESRD patients displayed a lower proportion of early memory Bm5 cells and plasmablasts (SDC, Figure 2). The distribution of other B cell subsets was similar in both groups. ESRD patients had a significantly lower absolute count of CD19+ cells (127±90 *versus* 191±81/mm3, p=0.002). Consequently, the absolute counts of naïve virgin Bm1, early memory Bm5, total memory B cells and plasmablasts were significantly lower in ESRD patients.

Activated naïve Bm2 cells accounted for 58.4±18.2% of B cells, representing the main circulating subset. Memory B cells include early and late Bm5 (24.4±14.5%) as well as Bm1

cells (10.6±8.5%) that have been shown to consist largely of IgD+/CD27+ defined as unswitched memory B cells (SDC, Figure 1) (6,8). With CD27 classification, IgD+/CD27- naïve cells accounted for 57.2% of total B cells in ESRD patients, and memory cells included IgD-/CD27+switched memory (19.3±11.8% of B cells) and IgD+/CD27+ unswitched memory B cells (16.2±17.9%).

The proportion of activated naïve B cells was significantly higher in patients with a high titer and a broad diversity of HLA antibodies, but was not associated with any particular pre-transplant immunizing event.

We compared pretransplant B cell subsets in patients with (HLA-Ab^{pos}) or without (HLA-Ab^{neg}) HLA-specific antibodies, as defined on the basis of the detection of at least one anti-HLA class I or class II antibody with a MFI>3000 (Figure 1A). In HLA-Ab^{pos} patients, the proportion of activated naïve Bm2 cells among total CD19+ cells was significantly higher than in HLA-Ab^{neg} patients (64.4±15.1 *versus* 52.5±19.1, p=0.0008) at the expense of virgin naïve and both subsets of memory B cells. A similar observation was made using the CD27 classification (Figure 1A). The increase in Bm2 proportion was also observed with two different MFI thresholds, 1000 and 5000 (SDC, Figure 3).

Interestingly, among patients with known immunizing events, HLA-Ab^{pos} patients (n=39) had significantly higher Bm2 percentage than HLA-Ab^{neg} patients (n=31) (63.8±15.8 *versus* 48.7±20.6 %, p<0.001) (Figure 1B). In contrast, in patients without a history of immunizing events, those carrying HLA-specific antibodies (n=11) had the same proportion of Bm2 cells than HLA-Ab^{neg} patients (n=20): 66.6±12.8 *versus* 58.5±14.9 %, p=0.14.

We also tested the relationship between B cell phenotype and the diversity of the anti-HLA immunization as assessed by the sum of positive class I and class II single antigen flow beads. Patients with a percentage of positive beads above the median value (4.1%) had a significantly higher proportion of activated naïve CD19+ cells (62.7±17.0 *versus* 54.2±18.4%, p=0.017) and a lower proportion of virgin naïve and memory cells (Figure 1C). Interestingly, 82% of these patients belonged to the group with anti-HLA MFI greater than 3000.

Pretransplant BAFF serum level correlates with the intensity and diversity of pre-transplant HLA immunization.

Mean value of BAFF serum levels in 77 of our patients was 1412 ± 1083 pg/mL. Pretransplant BAFF serum levels did not correlate with any given B cell subset, neither in percentage nor in absolute counts. However, BAFF levels were significantly higher in HLA-Ab^{pos} patients (1651±1297 *versus* 1139±693, p=0.038) (Figure 2A).

BAFF serum levels were higher in HLA-Ab^{pos} patients than in HLA-Ab^{neg} patients, but only in patients with a history of immunizing events (1728±1316 *versus* 1192±753 pg/mL, p=0.05), not in the other ones (669±183 *versus* 923±304 pg/mL p=0.2). Moreover, BAFF levels increased together with the diversity of HLA as assessed through the percentage of reactive positive beads (Figure 2B).

Pre-transplant proportions of Bm2 cells are independently associated with the presence and diversity of HLA antibodies .

We conducted a multivariate analysis to determine which factors were independently associated with the presence and the diversity of anti-HLA antibodies at day-0 transplant. We tested age, sex, immunizing events, percentage and absolute counts of total B cells and each B cell subset, as well as BAFF serum levels.

When including in the model B cell subsets as either proportions of total CD19+ cells or absolute counts, we found that previous history of pregnancies, transplantations and Bm2 cells were positively and independently associated with the presence of HLA antibodies with a MFI>3000 (Table 2). When testing B cells subsets as absolute counts, we also found that age (positively) and late Bm5 (negatively) were associated with anti-HLA antibodies. Moreover, Bm2 counts were also associated with the diversity of anti-HLA antibodies (SDC Table 2). For both tests, BAFF serum levels were not significantly associated with anti-HLA antibodies after adjusting for age, phenotype and immunizing events.

Pre-transplant B cell phenotypes but not BAFF are associated with occurrence of de novo DSA during first-year post-transplant.

At one-year of follow-up, 21.4% of patients experienced an episode of clinical or sub-clinical AMR and 11.7% developed *de novo* DSA during the first year post-transplant. We did not find any association between the frequency of AMR and pre-transplant proportion of any B cell subset or BAFF serum levels (Figure 3A). Patients with a pre-transplant proportion of Bm2 above the median value (62.6%) developed more frequently *de novo* DSA during the first year post-transplant (29.4 *versus* 10.0%, p=0.048; Figure 3B). Pre-transplant proportions of other B cell subsets as well as BAFF serum levels were not associated with occurrence of *de novo* DSA.

Discussion

Here we focused on the relationship between peripheral B cell phenotypes, BAFF and HLA immunization before kidney transplantation. Our study provides the first large B cell phenotypic analysis in end stage renal disease (ESRD) using two comprehensive classifications, the Bm1-Bm5 and the CD27/IgD classifications (5–8). Activated naïve Bm2 cells represented the main circulating B cell subset (6,26), accounting for a similar proportion of total B cells, compared to healthy volunteers. Small past studies found a decrease of all B cell subsets counts (27) or in children, a decrease in memory B cell numbers associated with low immunoglobulin levels (28). In our study, we could highlight that this B cell lymphopenia affected different "memory" sub-populations i.e. early memory Bm5 cells, Bm1 (corresponding largely to unswitched memory cells (6,8)) which could participate to the status of global immunodeficiency typical of ESRD patients (29,30).

When we engaged in this study, it was unknown if pre-transplant HLA immunization impacted on peripheral B cell subset distribution, and particularly on the frequency of detectable memory B cells. A difficulty was the definition of clinically relevant HLA immunization, which has become more complex with the advent of Luminex® technology. In fact, this sensitive technique, as opposed to complement dependent cytotoxicity, results in the identification of HLA–specific antibodies in larger numbers of patients, including subjects without any known HLA sensitizing event (3). Indeed, in our cohort of patients, when using a MFI cut-off value of 1000 (24), 83% of patients were defined as HLA-sensitized among whom 30 % had no known history of immunizing event. We decided therefore to also consider a higher threshold of 3000 that, applied to donor-specific antibodies, was reported to be associated with a significant increase in the risk of AMR and graft loss (25).

With this threshold, higher proportions of Bm2 cells were found in patients carrying HLA antibodies, at the expense of memory subsets. Interestingly, patients with the broadest

repertoire of anti-HLA antibodies also displayed higher proportions of Bm2 cells. Contrary to the expectation, the proportions of memory B cells were decreased in immunized patients. In fact, alloreactive memory B cells represent only a small proportion of total memory B cells – (0,015%) (31) – that does not impact on the overall percentage of memory B cells.

It is interesting at this point to discuss data from autoimmune diseases. Increased frequencies of Bm2 cells, which are mature activated naïve B cells, have also been observed in patients with Sjögren syndrome, this hyperactivation of peripheral B cells being associated with an abnormal differentiation into plasmablasts producing autoantibodies (6). By analogy, proportions of Bm2 cells in HLA sensitized patients might thus reflect a similar hyperactivation state of B cells promoting HLA-specific antibody synthesis. This hypothesis is supported by the observation that increase in Bm2 cells is only observed in patients who developed anti-HLA antibodies following a classical immunizing event, and not in patients who express what may be defined as "natural" anti-HLA antibodies. Taken independently, immunizing events have no influence on peripheral B cell phenotypes (SDC, Table 1). Yet, following an immunizing event, patients with more circulating activated naïve cells appear more prone to develop antibodies than others.

Indeed, naïve B cells circulate between secondary lymphoid organs until they encounter their cognate antigen (32), and an increase in their numbers could thus increase the probability to encounter the antigen. The associated decrease in memory B cells observed in HLA sensitized patients could result from an alteration in the differentiation of these antigen-primed B cells, leading to a bias toward plasma cell differentiation in secondary lymphoid organs during germinal center reaction (33), and subsequently to fewer circulating memory B cells. This differentiation bias has been invoked in patients with Sjögren syndrome (6).

In multivariate analysis, Bm2 but not other B cell subsets were independently – particularly of immunizing events – associated to the presence and diversity of anti-HLA antibodies. History

of transfusions was not significantly associated with anti-HLA antibodies probably because we did not consider in our analysis the number of transfusions, which may be a critical factor (34). This reinforces the hypothesis that, in addition to B cell/HLA antigen interaction, the state of activation of B cells is a critical factor involved in the synthesis of anti-HLA antibodies.

Another relevant set of data emerging from our study concerns the impact of BAFF, an essential B cell survival and homeostatic factor, on HLA immunization. High BAFF levels have been observed following therapeutic or primary B cell lymphopenia (19,21,31,35–37). The relative B cell lymphopenia observed in our patients could thus account for increased BAFF concentration. However, we did not find any correlation between any B cell subset count or percentage and BAFF serum level.

Importantly, HLA-Ab^{pos} patients displayed higher BAFF levels. In addition, BAFF serum levels increased together with the diversity of HLA antibodies. This is reminiscent of the relation between BAFF concentrations and autoantibody (13–16). Excess of BAFF is believed to prevent the deletion of autoreactive B cells following BCR signaling during the transition from immature B cells emerging from the bone marrow to mature B cells (11,12,38). In the context of transplantation, Thibault-Espiata et al have shown that stable kidney transplant recipients with higher BAFF serum level had a higher risk of developing *de novo* donor-specific antibodies (17). High levels of BAFF in presence of alloantigens during HLA sensitizing events could favor the survival of immature alloreactive B cells, thus explaining the relation between BAFF levels and anti-HLA antibodies. Contrary to what one would have expected, BAFF level was not independently associated with presence or diversity of anti-HLA antibodies.

We wished to get further insights into the impact of pre-transplant B cell phenotype and BAFF on post-transplant alloimmunity. Both were not associated with occurrence of AMR during the first year. This is in contradiction with a recent study showing elevated baseline

BAFF to be associated with an increase risk of AMR in sensitized patients. However, these patients were specifically carrying DSA and had a high frequency of AMR (18). In contrast, patients with Bm2 above median value had a higher risk of developing *de novo* DSA after transplantation, as they were at increased risk to develop anti-HLA antibodies before transplantation.

A longitudinal study on B cell subsets and BAFF levels after transplantation, which was outside of the scope of our present work, would be of great interest to confirm, during the post-transplantation period, the clinical relevance of our results. Particularly, it should be studied if modifications of B cell phenotype and increase in BAFF level would behave as early markers of antibody-mediated rejection or synthesis of anti-HLA antibodies.

Methods

Patients and immunosuppression

Between November 2009 and December 2010, 101 consecutive patients were admitted for kidney transplantation. Patients were monitored up to one year post-transplant for the occurrence of AMR and the development of *de novo* DSA. Patients received induction therapy with either rabbit anti-thymoglobulin if DSA were identified at day-0, if they received a retransplant or in case of broad HLA immunization, or basiliximab otherwise. Intravenous globulins were given in case of DSA, plus rituximab if the MFI of DSA was greater than 1000 the day of transplantation. Maintenance therapy consisted of steroids, mycophénolate mofetil, and tacrolimus/cyclosporin A. Informed consent was obtained from all patients.

HLA antibodies

Class I and class II HLA antibodies were detected and identified on sera collected pre-transplant (day-0) by Luminex®® technology using Single Antigen beads (One Lambda, CA,

USA). The fluorescence of the beads was analyzed using the LABScan™100 flow analyzer and HLA Fusion software. All beads showing normalized MFI > 1000 were considered positive (24). We focused on the 3000 threshold at it has been shown associated with an increased risk of AMR and graft loss (25). We also assessed the diversity of the repertoire of HLA antibodies by evaluating the proportion of positive beads with an MFI>1000.

Flow cytometry.

Counting and phenotyping of lymphocyte subsets were performed on freshly drawn blood on day-0 before any immunosuppression was given. Immunophenotyping of B cell subsets was performed on a FACSCaliburTM or CANTO IITM cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA). Peripheral B cell subsets were defined according to two classifications: the IgD/CD38 or Bm1-Bm5 (B mature) and the IgD/CD27 classifications (5–8). Correspondences between the two classifications are given in SDC, Figure 1. Absolute lymphocyte counts were determined using MultiTestTM CD3 /CD8/CD45/CD4 antibody mix with Trucount beads.

BAFF serum level

BAFF was quantified in serum samples using by ELISA (R&D Systems Europe, Lille, France) according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SD for continuous variables or percentages for categorical data. Comparisons were based on the $\chi 2$ test for categorical data, the t test for normally distributed continuous data, or the Wilcoxon test for non-parametric data. Spearman rank correlation was used to quantify associations between continuous variables. A two-sided p-value of 0.05 was considered statistically significant.

Multivariate analyses were performed to delineate covariates independently associated with the presence of anti-HLA antibodies with a MFI >3000 and the number of positive Luminex® class I and II beads, respectively by logistic and negative binomial regression. Stepwise selection procedures were applied to select relevant covariates using likelihood ratio statistics. P-values of 0.05 were used as entry or stay levels. Regression coefficients of final models were expressed as odds-ratios or rates-ratios (for a given variation for quantitative covariates) with their 95% confidence interval. Statistical analyses were performed using JMP software version 5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) and with the R package (http://www.r-project.org/).

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

References

1. 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.
2. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. Transplantation 2010; 90: 68.
3. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation 2008; 86: 1111.
4. Roelen DL, Doxiadis IIN, Claas FHJ. Detection and clinical relevance of donor specific HLA antibodies: a matter of debate. Transpl Int 2012; 25: 604.
5. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, De Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med 1994; 180: 329.

6. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol 2001; 167: 3610.

7. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig) M+ IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med 1998; 188: 1679.

8. Sanz I, Wei C, Lee FE-H, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. Semin Immunol 2008; 20: 67.

9. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. Nat Rev Immunol 2009; 9: 491.

10. Crowley JE, Treml LS, Stadanlick JE, Carpenter E, Cancro MP. Homeostatic niche specification among naïve and activated B cells: A growing role for the BLyS family of receptors and ligands. Semin Immunol 2005; 17: 193.

11. Cancro MP. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. Nat Rev Immunol 2009; 9: 657.

12. Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. Immunity 2004; 20: 785.

13. Petri M, Stohl W, Chatham W, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2008; 58: 2453.

14. Groom J. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. J Clin Invest 2002; 109: 59.

15. Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2003; 62: 168.

16. Candon S, Gottenberg JE, Bengoufa D, Chatenoud L, Mariette X. Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjögren syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. Ann Rheum Dis 2009; 68: 1208.

17. Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, et al. BAFF and BAFF-R Levels Are Associated With Risk of Long-Term Kidney Graft Dysfunction and Development of Donor-Specific Antibodies. Am J Transplant. 2012; 12: 2754.

18. Banham G, Prezzi D, Harford S, et al. Elevated Pretransplantation Soluble BAFF Is Associated With an Increased Risk of Acute Antibody-Mediated Rejection: Transplantation 2013; 96: 413.

19. Bloom D, Chang Z, Pauly K, et al. BAFF is increased in renal transplant patients following treatment with alemtuzumab. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg 2009; 9: 1835.

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

21. Zarkhin V, Li L, Sarwal MM. BAFF May Modulate the Rate of B-Cell Repopulation After Rituximab Therapy for Acute Renal Transplant Rejection. Transplantation 2009; 88: 1229.

22. Liu Z, Davidson A. BAFF and selection of autoreactive B cells. Trends Immunol 2011; 32: 388.

23. Parsons RF, Vivek K, Redfield RR, et al. B-lymphocyte homeostasis and BLyS-directed immunotherapy in transplantation. Transplant Rev 2010; 24: 207.

24. Reed EF, Rao P, Zhang Z, et al. Comprehensive Assessment and Standardization of Solid Phase Multiplex-Bead Arrays for the Detection of Antibodies to HLA. Am J Transplant 2013; 13: 1859

25. 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.

26. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. Cytometry B Clin Cytom. 2010; 78B: S47.

27. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. Nephrol Dial Transplant 2010; 25: 205.

28. Bouts AHM, Davin JC, Krediet RT, et al. Children with chronic renal failure have reduced numbers of memory B cells. Clin Exp Immunol 2004; 137: 589.

29. Cavdar C, Sayan M, Sifil A, et al. The comparison of antibody response to influenza vaccination in continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis and renal transplantation patients. Scand J Urol Nephrol. 2003; 37: 71.

30. Chatenoud L, Dugas B, Beaurain G, et al. Presence of preactivated T cells in hemodialyzed patients: their possible role in altered immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986; 83: 7457.

31. Heidt S, Roelen DL, de Vaal YJH, et al. A Novel ELISPOT Assay to Quantify HLA-Specific B Cells in HLA-Immunized Individuals. Am J Transplant 2012; 12: 1469.

32. Von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nat Rev Immunol 2003; 3: 867.

33. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol 2011; 12: 24.

34. Scornik JC, Meier-Kriesche H-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. Am J Transplant 2011; 11: 1785.

35. Pers J-O, Devauchelle V, Daridon C, et al. BAFF-modulated repopulation of B lymphocytes in the blood and salivary glands of rituximab-treated patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum 2007; 56: 1464.

36. Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. J Clin Immunol 2010; 30: 99.

37. Kreuzaler M, Rauch M, Salzer U, et al. Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors. J Immunol 2012; 188: 497.

38. Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. Semin Immunol 2006; 18: 276.

Table 1: Pre-transplantation characteristics of patients

Characteristics of patients	N=101
Age of recipient, yrs (mean ± SD)	49.3 ± 13.6 [18-77]
Sex, n (%male)	60 (59.4)
Rank 1st transplant, n (%)	77 (76.2)
2nd transplant	16 (15.8)
3rd transplant and more	8 (8.0)
Transfusion, n (%) (n=97)	58 (59.8)
Pregnancy, n (%) (n=41)	31 (75.6)
No immunizing event, n (%)	31 (30.7)
Cause of ESRD, n(%)	
Diabetes	15 (14.9)
Glomerulonephritis	26 (25.7)
PKD	8 (7.9)
Other*	27 (26.7)
Unknown	25 (24.8)
Hemodialysis / PD / Pre-emptive transplantation (%)	89.1 / 0 / 10.9
Immunosuppression for current transplantation (%)	
Induction rATG/anti-IL2r	53.5/46.5
FK506/Cyclosporine	80.2/19.8
Rituximab	5.0
CHARACTERISTICS OF HLA IMMUNIZATION	
SAFB Anti-HLA class I MFI >1000, n(%) [a]	72 (71.3)
SAFB Anti-HLA class II MFI >1000, n (%) [a]	59 (58.4)
SAFB Anti-HLA class I or II >1000, n(%) [a]	84 (83.2)
SAFB Anti-HLA class I MFI >3000, n (%) [a]	43 (42.6)
SAFB Anti-HLA class II MFI >3000, n (%) [a]	25 (24.8)
SAFB Anti-HLA class I or II >3000, n(%) [a]	50 (49.5)
Mean % of positive class I beads, ±SD (median) [b]	8.1 ± 15.8 (2.1)
Mean % of positive class II beads, ±SD (median) [b]	6.8 ± 12.6 (1.1)
Mean % of positive class I + II beads, ±SD (median) [b]	15.0 ± 25.8 (4.1)
Donor-specific antibodies, n (%)	34 (34.3)

PD: peritoneal dialysis / **ESRD**: End Stage Renal Disease / **PKD**: Polycystic kidney disease / *other includes uropathy, nephroangiosclerosis, other inherited kidney disease - **a** : **SAFB**: single antigen flow bead – number and % of patients with at least one antibody with a Mean Fluorescence Intensity (MFI) greater than 1000 or 3000 with Luminex® technique; **b** : % of positive beads with a MFI > 1000

Table 2 – Multivariate analysis of factors associated with the presence of pre-transplant anti-HLA antibodies

	B cell subsets analyzed in % of total B cells		B cell subsets analyzed in absolute count	
	OR [CI 95%]	**p**	**OR [CI 95%]**	**p**
Age	0.96 [0.93-1]	0.056	0.96 [0.92-1]	**0.041**
History of pregnancy	4.99 [1.77-15.62]	**0.004**	4.91 [1.78-14.91]	**0.003**
History of transplantation	7.6 [2.24-32.24]	**0.002**	5.05 [1.64-17.75]	**0.007**
Bm2	1.08 [1.01-1.18] [a]	**0.046**	1.85 [1.13-3.03] [b]	**0.014**
Plasmablasts	1.97 [0.91-4.15] [a]	0.068	1.65 [0.72-3.76] [c]	0.216
Late Bm5 *	1.01 [0.91-1.1] [a]	0.93	0.48 [0.28-0.82] [d]	**0.007**

a: for a variation of 1%; b: for a variation of 50 units; c: for a variation of 1 unit; d: for a variation of 10 units; * negative association

Figure Legends

Figure 1: Pre-transplant B cell phenotype according to the presence and to the diversity of anti-HLA antibodies

A- Comparison of day-0 B cell subsets with Bm (left panel) or CD27 (right panel) classification in patients with and without HLA antibodies with a MFI greater than 3000. B- B cell subsets according to the presence of HLA antibodies (MFI threshold 3000) in patients with (left panel) or without (right panel) a history of previous immunizing event. C- B cell subsets according to the diversity of HLA antibodies defined as a number of positive single antigen flow beads with Luminex® technique (Class I + Class II) above median value (4.1%).

Figure 2: Pre-transplant BAFF serum level according to the presence and to the diversity of anti-HLA antibodies.

A- Pre-transplant BAFF serum level according to the detection of HLA antibodies with a MFI greater than 3000 in the whole transplant population (WP), in patients with (IE+) or without (IE-) a history of immunizing event. B- Pre-transplant BAFF serum level according to the quartile of positive single antigen flow beads with Luminex® technique (Class I + Class II).

Figure 3: Relation between pre-transplant Bm2 proportion and BAFF serum level, and occurrence of antibody-mediated rejection and de novo donor specific antibodies during first year post-transplant.

Frequency of ABMR (A) or *de novo* DSA occurrence (B) during first-year post-transplant in patients with a Bm2 proportion or a BAFF serum level below or above the median value.

Figure 1 - Pre-transplant B cell phenotype according to the presence and to the diversity of anti-HLA antibodies

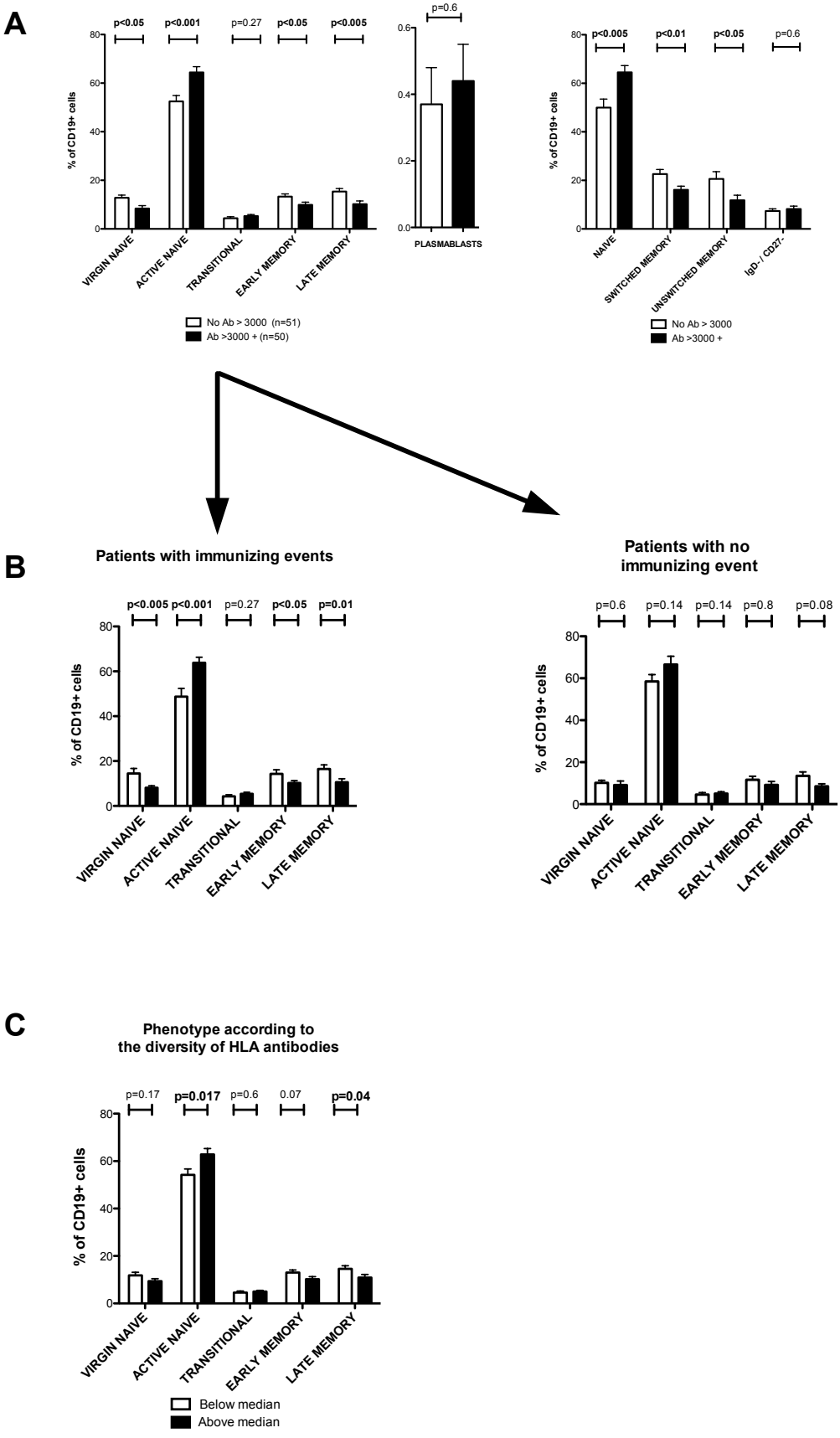


Figure 2: Pre-transplant BAFF serum level according to the presence and to the diversity of anti-HLA antibodies.

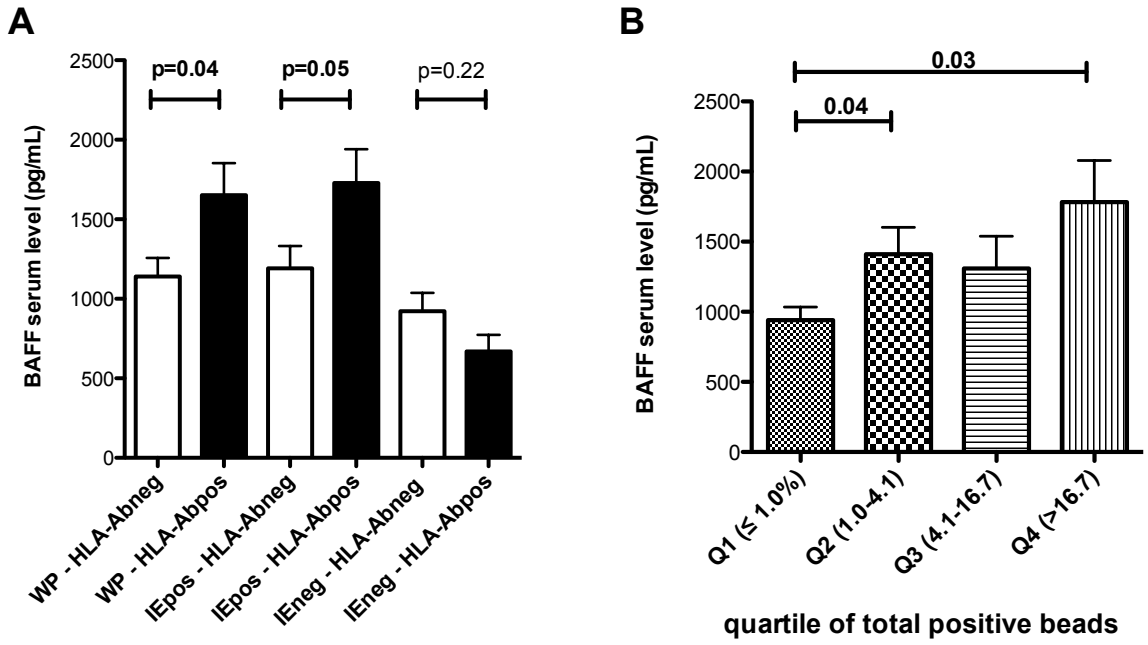
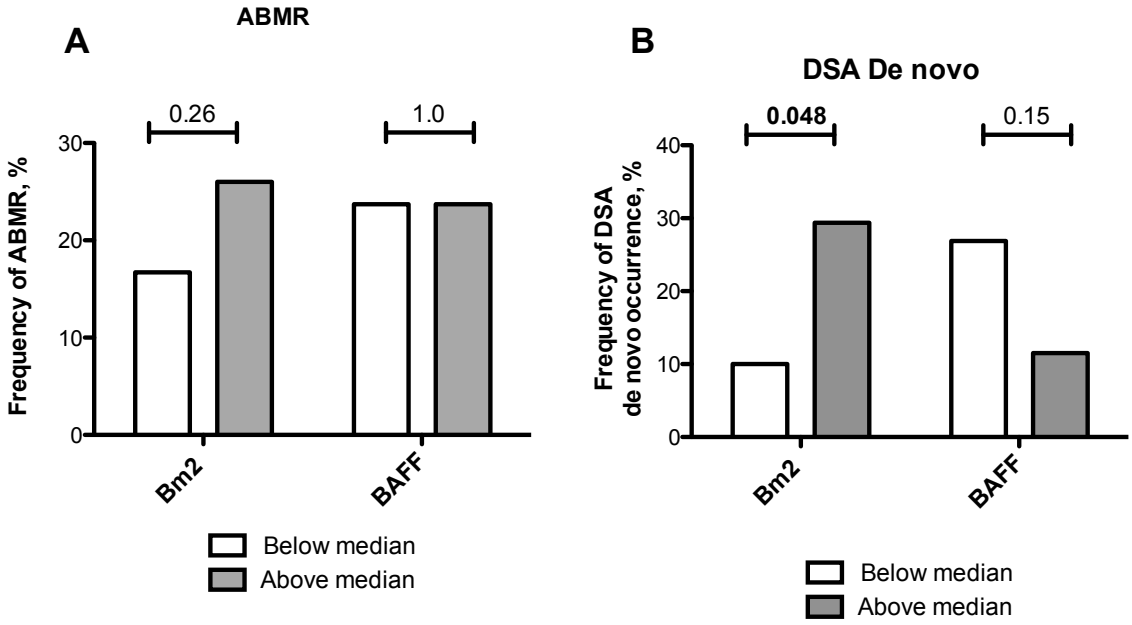


Figure 3: Relation between pre-transplant Bm2 proportion and BAFF serum level, and occurrence of antibody-mediated rejection and de novo donor specific antibodies during first year post-transplant.



Supplementary Digital Content (SDC)

SDC, Table 1: B cell subsets and BAFF serum level at day-0 transplant in patients with or without history of immunizing event

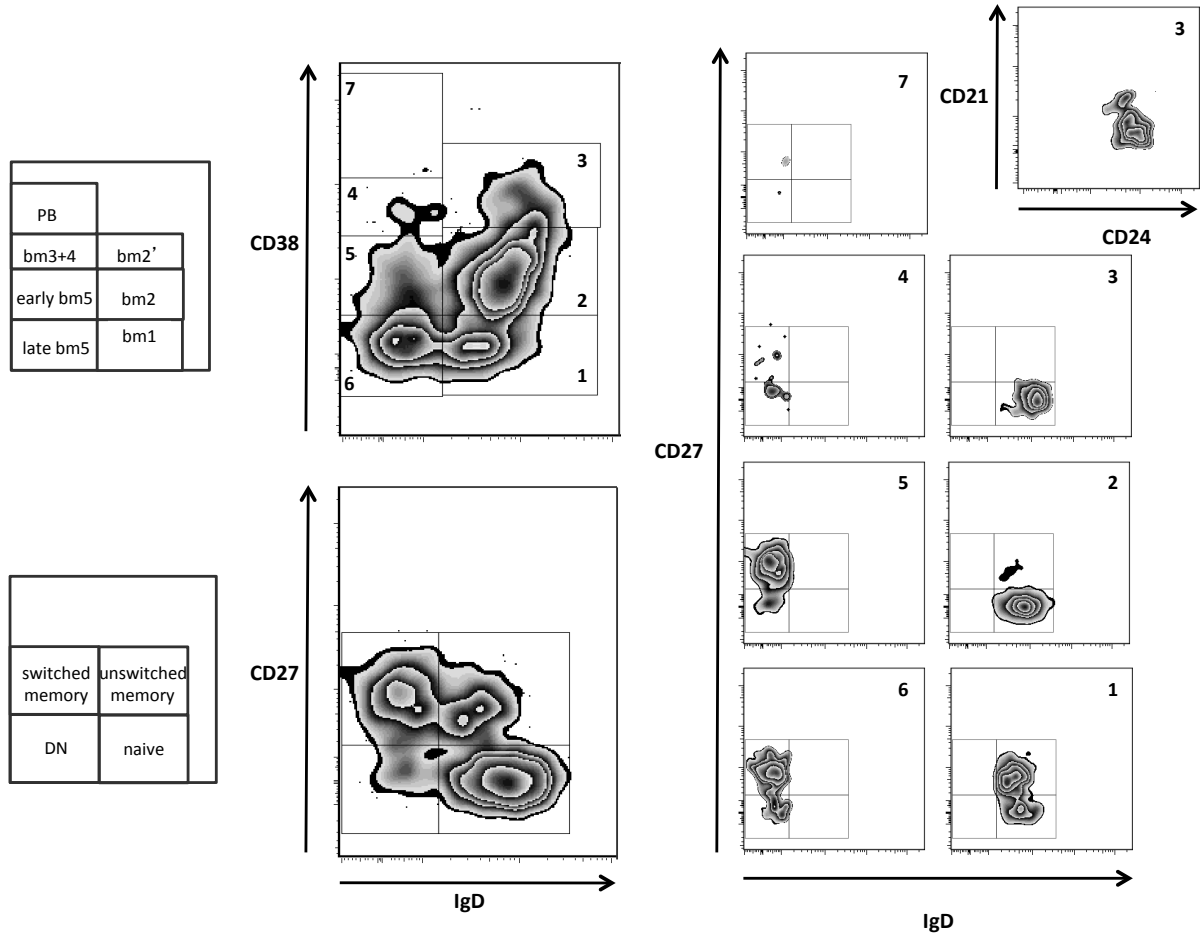
	Transfusion			Transplantation			Pregnancy		
	no	yes	p	no	yes	p	no	yes	P
N	39	58		24	77		9	32	
% CD19+[1]	9.2 ± 4.3	7.8 ± 5.1	0.23	8.7 ± 4.8	6.8 ± 4.5	0.15	5.3 ± 3.4	8.8 ± 5.2	0.15
Bm1	10.1 ± 5.4	10.5 ± 10.0	0.79	10.5 ± 8.1	11.1 ± 9.5	0.73	11.3 ± 9.7	9.1 ± 4.7	0.34
Bm2	59.7 ± 15.3	57.4 ± 20.4	0.54	59.2 ± 16.9	56.0 ± 21.9	0.45	53.1 ±15.3	57.2 ± 20.3	0.57
eBm5	12.3 ± 7.6	11.5 ± 8.6	0.61	11.5 ± 7.7	11.9 ± 9.4	0.84	13.9 ± 9.3	13.3 ± 9.3	0.87
lBm5	12.0 ± 7.5	13.4 ± 10.5	0.47	12.6 ± 8.1	13.5 ± 12.3	0.68	15.0 ± 9.5	13.4 ± 11.0	0.70
Bm2'	4.3 ± 3.6	5.3 ± 4.2	0.25	4.7 ± 3.9	5.1 ± 4.1	0.71	4.1 ± 3.4	5.3 ± 5.1	0.49
PB[2]	0.3 ± 0.4	0.5 ± 1.0	0.37	0.3 ± 0.7	0.7 ±1.0	0.08	0.5 ± 0.6	0.5 ± 0.8	0.87
BAFF[3]	1087±411	1480±1202	0.17	1300±1075	1675±1079	0.17	1486± 898	1542±1263	0.92

SDC Table 2 – Multivariate analysis of factors associated with the diversity of pre-transplant anti-HLA antibodies (assessed through the number of positive single antigen flow beads with Luminex® technique)

a: for a variation of 1%; b: for a variation of 10 units; c: for a variation of 50 units; * negative association

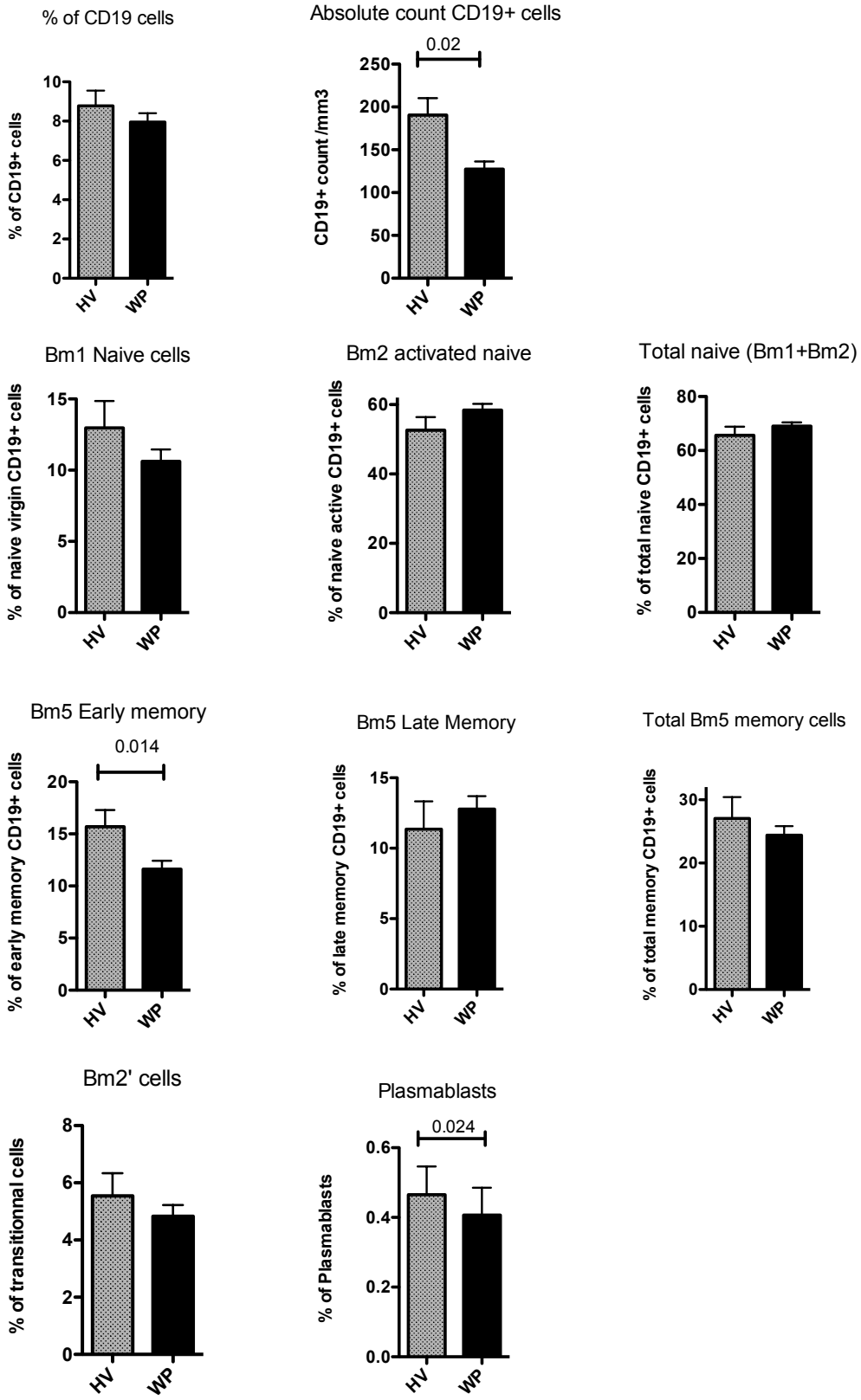
	B cell subsets analyzed in % of total B cells		**B cell subsets analyzed in absolute count**	
	Rates ratios [CI 95%]	**p**	**Rates ratios [CI 95%]**	**p**
History of pregnancy	3.06 [1.89-5.06]	**<0.0001**	3.3 [2.01-5.55]	**<0.0001**
History of transplantation	9.45 [5.54-16.74]	**<0.0001**	8.95 [5.17-16.08]	**<0.0001**
Bm1*	0.97 [0.93-1.01] [a]	0.081	0.86 [0.70-1.05] [b]	0.137
Bm2	1 [0.99-1.02] [a]	0.67	1.26 [1.05-1.51] [c]	**0.011**

SDC Figure 1: The Bm1-Bm5 and the IgD/CD27 classifications of peripheral mature B cells. $CD19^{+}$ B cells were analyzed with two double staining IgD/CD38 (Bm1-Bm5 classification) and IgD/CD27 (left panels). With the Bm1-Bm5 classification, subsets included virgin naïve cells (Bm1: $IgD^{+}CD38^{-}$); activated naïve cells (Bm2: $IgD^{+}CD38^{lo}$); transitional/pre-GC cells (Bm2′: $IgD^{+}CD38^{hi}$); plasmablasts (IgD^{-}, $CD38^{hi}$); memory cells (Bm5: $IgD^{-}CD38^{+/-}$) further divided into early Bm5 ($CD38^{lo}$) and late Bm5 ($CD38^{-}$). With the CD27 classification, subsets included naïve B cells (IgD^{+}, $CD27^{-}$), switched memory B cells (IgD^{-}, $CD27^{+}$), unswitched memory B cells (IgD^{+}, $CD27^{+}$) and double negative cells (IgD^{-}, $CD27^{-}$). Each subset with IgD/CD38 staining (from 1 to 7) is shown with IgD/CD27 staining (right panel). $IgD^{+}/CD38^{hi}$ cells correspond to transitional cells ($CD24^{hi}$, $CD21^{hi}$, $CD27^{-}$) (upper right panel).



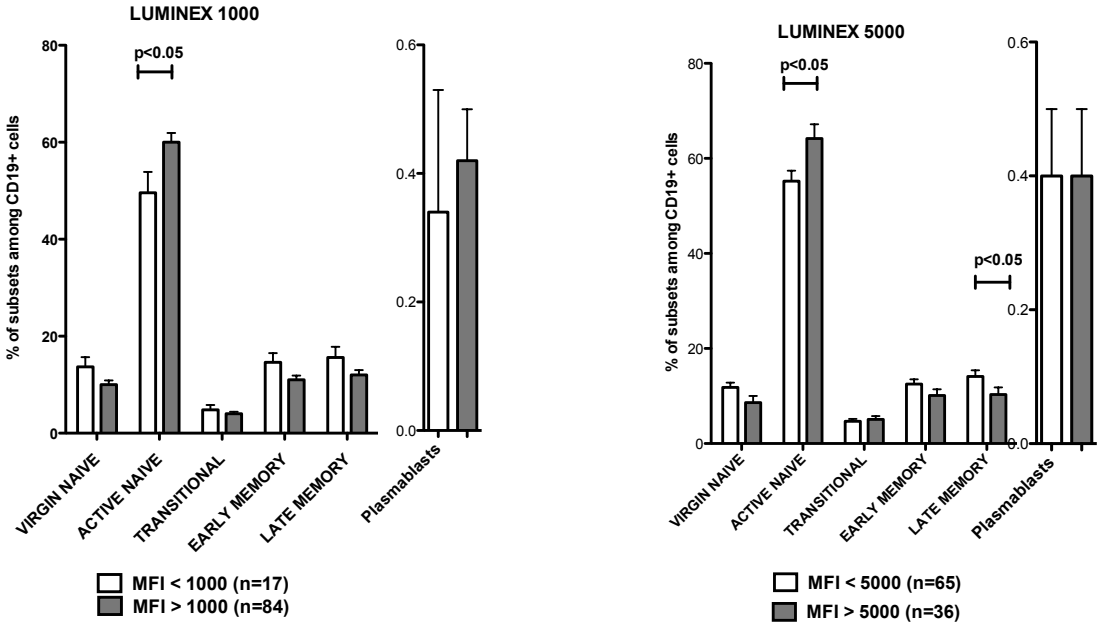
SDC, Figure 2: Proportions of day-0 B cell subsets in the whole population of ESRD patients prior to transplant and in healthy controls

Comparison of B cell subsets proportions according to the Bm classification in CD19 gate in healthy volunteers (HV, n=17) and in the whole population of ESRD patients (WP, n=101), at day-0 transplant before administration of immunosuppressive treatment. Values correspond to mean ± SEM.



SDC Figure 3: Pre-transplant B cell phenotype according to the presence of anti-HLA antibodies with two other MFI thresholds, 1000 and 5000.

Comparison of day-0 B cell subsets with Bm1-Bm5 classification in patients with and without HLA antibodies, as defined with at least one antibody with a MFI greater than 1000 (left panel) or 5000 (right panel).



Discussion des résultats

Nous avons montré dans ce travail que la présence et la diversité des anticorps anti-HLA avant transplantation étaient associées à une augmentation de la proportion des lymphocytes B naïfs activés Bm2 (aux dépens des populations mémoire) et au niveau sérique de BAFF. Cette association, en ce qui concerne la proportion de lymphocytes B naïfs, était indépendante de l'autre facteur majeur impliqué dans la synthèse des anticorps anti-HLA, les évènements immunisants.

On pourrait donc considérer que la proportion de lymphocytes Bm2 et BAFF constituent des facteurs de risque, en présence d'un événement immunisant, de développer des anticorps anti-HLA, selon le modèle proposé **figure 10 haut** (cf discussion). L'excès de BAFF (majoré par la lymphopénie inhérente à l'insuffisance rénale chronique) et l'exposition à l'alloantigène pourraient favoriser la sélection positive, au stade transitionnel, de clones alloréactifs. L'augmentation de la fréquence des lymphocytes B naïfs activés pourrait ainsi favoriser le contact avec l'antigène en augmentant le nombre de lymphocytes B circulants entre les organes lymphoïdes secondaires, parmi lesquels les lymphocytes B alloréactifs.

Nous avons également observé une association entre les concentrations sériques de BAFF d'une part, et la présence et la diversité des anticorps anti-HLA chez les patients immunisés en attente de transplantation d'autre part. Ceci participerait, avec l'exposition à l'antigène, à augmenter les chances d'initier la réponse humorale allogénique.

Deux limites doivent être néanmoins soulignées lors de l'énoncé de cette hypothèse. D'abord, la valeur de BAFF n'apparaît pas comme indépendamment associée à la présence des anticorps anti-HLA. Ceci suggère une relation avec les autres facteurs testés que sont les évènements immunisants, les différentes sous-populations lymphocytaires B et l'âge. Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en analyse univariée une telle relation. De plus, il faut préciser que cette hypothèse est faite *a posteriori*, c'est-à-dire à un temps où les anticorps sont déjà synthétisés. Pour être vérifiée, c'est lors des évènements immunisants que doit être déterminée la relation entre anticorps anti-HLA, BAFF et phénotype lymphocytaire B. La situation la plus appropriée pour établir une telle relation est la grossesse, car, contrairement à la transplantation, aucun traitement immunosuppresseur ne vient interférer avec la réponse allo-immune.

Partie 2 – Second article

ROLE DES LYMPHOCYTES B MEMOIRE ALLOREACTIFS DANS LA SYNTHESE DES ALLOANTICORPS CIRCULANTS CHEZ LES PATIENTS EN ATTENTE DE TRANSPLANTATION

Article soumis à la revue ***American Journal of Transplantation***

"Restricted specificity of alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation"

Renaud Snanoudj, Frans H. Claas, Sebastiaan Heidt, Christophe Legendre,
Lucienne Chatenoud and Sophie Candon

Objectifs et présentation de l'étude

Les cellules impliquées dans la synthèse et le maintien des alloanticorps chez les patients immunisés en attente de transplantation restent mal connues. Certaines études préliminaires ont montré qu'il était possible d'isoler, chez des patients immunisés, à la fois des lymphocytes B mémoire circulants et des plasmocytes médullaires alloréactifs, mais leur contribution relative n'a pas été étudiée. Cette question a un impact pratique important car de nombreux patients immunisés sont en attente d'un rein compatible. Seuls des protocoles de désensibilisation permettent de réduire le titre et la diversité des anticorps anti-HLA pour transplanter ces patients, mais la cible cellulaire exacte reste non définie, et l'efficacité de ces protocoles modérée.

Dans ce travail, nous avons étudié la présence et la spécificité des lymphocytes B mémoire alloréactifs chez des patients porteurs d'anticorps anti-HLA en attente de transplantation. Nous avons utilisé un test de stimulation polyclonale permettant la différenciation *in vitro* des lymphocytes B mémoire en plasmablastes. Nous avons recueilli le surnageant de culture et détecté la présence des anticorps anti-HLA par la technique Luminex®. Nous avons étudié la spécificité de ces anticorps à l'échelon de l'épitope grâce au logiciel HLAMatchmaker puis nous l'avons comparée à celle des anticorps présents dans le sérum. Le but était de déterminer si les spécificités des anticorps du surnageant et du sérum étaient comparables, ce qui serait en faveur de l'implication des lymphocytes B mémoire dans la synthèse des alloanticorps sériques. Cette implication consisterait en un renouvellement du pool des plasmocytes alloréactifs par des lymphocytes B mémoire sous l'effet de divers stimulus possibles (persistance de l'antigène, stimulation bystander par des cytokines, CD40L, TLR…). Dans le cas contraire, le maintien des alloanticorps dans le sérum serait dû à leur synthèse continue par des plasmocytes à longue durée de vie, indépendants du renouvellement par les lymphocytes B mémoire et de la présence de l'antigène.

Par ailleurs, l'analyse avec HLAMatchmaker des spécificités du surnageant et du sérum permet d'approcher l'oligoclonalité ou la polyclonalité des lymphocytes B mémoire et des cellules impliquées dans la synthèse des anticorps du sérum. En effet, l'observation des nombreuses spécificités antigéniques détectées par Luminex® chez les sujets immunisés suggère une réponse polyclonale. Néanmoins, les différents antigènes HLA partagent de nombreux épitopes, qui constituent la cible de l'immunisation. Ainsi, la réponse vis-à-vis d'un épitope partagé par de nombreux antigènes pourrait être clonale et s'accompagner de la détection par Luminex® de multiples spécificités antigéniques.

Restricted specificity of alloreactive memory B cells in HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation.

Snanoudj R[1,2,3], Claas FH[4], Heidt S[4], Legendre Ch[2,3], Chatenoud L[1,2*], Candon S[1,2*]

1 INSERM U1013, Necker Hospital, Paris, France

2 Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cite, Paris, France.

3 Service de Transplantation Rénale Adulte, Hôpital Necker, Assistance Publique- Hopitaux de Paris, Paris, France.

4 Leiden University Medical Center, Department of Immunohaematology, Leiden, the Netherlands

Abstract

The relative contribution of memory B cells and long-lived plasma cells in the production of alloantibodies remains poorly understood. We tested the presence of circulating alloreactive memory B cells in 69 patients awaiting a kidney transplant using an *in vitro* memory B cell assay. HLA antibody-producing memory B cells were evidenced only in patients carrying serum HLA antibodies following multiple classical HLA immunizing events. In patients having previously received a renal allograft, alloreactive memory B cells could be detected up to 32 years (13.2 ± 8.4 years) after transplantation. HLA antibodies produced by memory B cells were also detected in the corresponding serums and showed a restricted reactivity, targeting only few epitopes shared by several HLA antigens. In contrast, serum HLA antibodies not associated with the detection of specific memory B cells, showed a broader pattern of specificities. These results suggest that generation and survival of alloreactive memory B cells is alloantigen driven and that their frequency is related to the 'strength' of HLA immunization. Detection of alloreactive memory B cells before transplantation may help in the management of HLA-sensitized patients and the choice of adequate therapeutic strategies to prevent antibody-mediated rejection.

Introduction

Antibody-mediated rejection due to donor-specific anti-HLA alloantibodies (DSA) represents the primary cause of late kidney allograft loss (1–4). Therapies to control antibody-mediated rejection (AMR) and improve graft survival in patients carrying DSA are only partially effective. In order to develop more appropriate therapeutic tools, there is a real need to better defining the precise nature of B cells that are involved in DSA production.

During immune responses towards protein antigens, both memory B cells and plasma cells are generated. Continuous synthesis of antibodies by long-lived plasma cells can provide durable humoral protection through the production of high affinity antibodies that may persist for decades (serological memory) (5–7). In addition, upon reencounter with the antigen, memory B cells can rapidly differentiate into short-lived and long-lived plasma cells, thus enhancing the titers of specific antibodies. The mechanisms sustaining memory B cells and plasma cells survival for such remarkably long periods of time are still poorly defined.

A critical question, particularly under conditions in which the antigen is cleared, is whether the pool of long-lived plasma cells is replenished through plasma cell differentiation from memory B cells. Two arguments are against this potential replenishment. First, the lack of correlation observed between the frequency of peripheral specific memory B cells and antibody levels (8,9) and secondly, the frequent lack of effect of anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) treatment, which depletes all mature CD20+ B cells, including memory B cells but not plasma cells, on the titer of specific antibodies (10–14).

Concerning humoral alloimmunity, the relative contribution of memory B cells and plasma cells in the production of DSA are also still ill-defined although alloreactive memory B cells (15–18) as well as bone marrow-derived (19) have been detected in HLA-immunized patients. This is relevant because currently two B-cell directed treatments for AMR are proposed namely, anti-CD20 monoclonal antibody, targeting mature B cells including memory B cells and bortezomib, a proteasome inhibitor that induces apoptosis of neoplastic and presumably normal plasma cells. If confirmed, replenishment of the long-lived plasma cell pool by memory B cells would argue, to diminish the pre-transplant titer of HLA antibodies, for the use of B cell depletion rather than proteasome inhibition.

Here we studied whether circulating alloreactive memory B cells can be detected in patients awaiting a kidney transplant and HLA-sensitized following different immunizing events. To further evaluate the contribution of memory B cells in the synthesis HLA antibodies detected pretransplant as well as their fine specificity, we evaluated at the epitope level the

alloreactivity pattern of circulating alloreactive memory B cell-derived antibodies in comparison to that of HLA antibodies present in the serum.

Patients and methods

Patients and immunosuppression

Patients with end-stage renal failure included in this study were admitted for transplantation in our department between 2007 and 2012. If DSA were identified at day-0, patients received induction therapy with rabbit anti-thymoglobulin (ATG), intravenous immunoglobulins and CD20 monoclonal antibody(rituximab) if, on the day of transplantation, the mean fluorescence intensity (MFI) of DSA using the multiplex-bead array Luminex© was greater than 1000, or a CD25 monoclonal antibody (Basiliximab) otherwise (MFI<1000). Maintenance therapy consisted in steroids, mycophénolate mofetil, and tacrolimus or cyclosporin. The diagnosis of AMR was based on the presence of circulating DSA and biopsy-proven using the histological criteria of the revised Banff 97 classification (20), with or without concurrent positive C4d staining. Informed consent was obtained from all patients.

Isolation of peripheral mononuclear cells

Peripheral blood (30 mL) was collected in citrate dextrose solution-containing tubes on the day of admission for transplantation, before any immunosuppressive treatment was administered. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cell suspensions were isolated by centrifugation on a Ficoll-Hypaque density gradient and frozen in liquid nitrogen until used.

Alloreactive memory B cell assay

The in vitro assay used was adapted from that described by Crotty et al.(21). Briefly, PBMCs were seeded at 5x105 cells/mL in 24-well plates, in complete culture medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 mM 2-mercaptoethanol, 10 ng/mL pokeweed mitogen extract (PWM, batch 1303H, ICN; MP Biomedicals, Aurora, OH), a 1/10 000 dilution of fixed Staphylococcus aureus Cowan extract (SAC; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 6 mg/mL fully phosphothioated CpG (ODN-2006,15 Proligo; Sigma-Aldrich), 100 U/mL IL-2 (kindly provided by Roussel Uclaf) and 10 ng/mL ofIL-4, IL-6 and IL-21 (Miltenyi Biotec, France). Cells were cultured for 10 days at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO2. At day-6 of culture, 100 U/mL IL-2 were added in each well. Supernatants were recovered on day 10, concentrated 30 times using Amicon Ultra-15 centrifugal filters (Millipore), and screened for the presence of anti-HLA antibodies.

Anti-HLA antibodies

Class I and class II HLA antibodies were detected and identified on sera collected pre-transplant (day-0) and on concentrated supernatants by means of a multiplex-bead arrays using Luminex® xMAP® Single Antigen beads (One Lambda, Canoga Park, CA, USA). The fluorescence of the beads was measured using the LABScan™100 flow analyzer and the data was analyzed using the HLA Fusion software. All beads showing a normalized MFI >300 were considered positive.

Analysis of HLA-epitopes specific antibodies with HLAMatchmaker

The HLAMatchmaker is a Microsoft Excel-based software, analyzing the structural basis of HLA antigen immunogenicity and allowing to explore at the epitope level reactivity patterns of anti-HLA antibodies (22,23). It was originally introduced as a donor/recipient matching algorithm whereby each HLA antigen is viewed as a string of polymorphic amino acid residues (or "eplets") in antibody-accessible positions. Eplets are considered key elements of epitopes that can induce the formation of specific antibodies (22,23). Early studies have shown correlations between the number of mismatched eplets between donor and recipient and the incidence of humoral sensitization (24–26). HLAMatchmaker is also used to analyze at the structural level the reactivity of sera from immunized patients analysis and the identification of potential donors with acceptable mismatches (27). The first step is to incorporate the recipient's HLA typing determined preferably by DNA methods or converted from serology to four-digit alleles based on its frequency or best estimates of haplotypes for class II. Inclusion of HLA information of a previous donor (in case of retransplantation) will identify structurally defined epitopes the patient has been exposed to.

For analysis of anti-HLA antibodies reactivity, the panel of single-antigen beads is imported from Fusion software, and the beads that give negative reactions with the patient’s serum or supernatant are recorded. The HLA antigens bound to negative beads can be expected to express eplets that are not recognized by the patient’s antibodies and the program automatically exclude them from the analysis. The remaining eplets expressed on antigens bound to reactive beads can be sorted to identify shared and unshared antibody-reactive eplets highlighting those expressed by a previous donor.

Flow cytometry.

Counting and phenotyping of lymphocyte subsets was performed on day-0 and day-6 of culture. Immunophenotyping of B cell subsets was performed on a FACSCaliburTM or CANTO IITM cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and analysis was carried out using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). The following monoclonal antibodies used were from BD Biosciences: CD19 (SJ25C1), CD20 (L27), CD38 (HB7), IgD (IA6-2), CD27 (L128). Peripheral B cell subsets were defined according to the IgD/CD38 (Bm1-Bm5) classification (28).

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± SD for continuous variables or percentages for categorical data. Comparisons were based on the c2 test for categorical data and the Student's t test for normally distributed continuous data. A two-sided p-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using JMP software version 5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Results

Characteristics of the alloreactive memory B cell assay

As already described this assay detects circulating antigen reactive memory B cells (21). In the present study, we performed it using cells from patients with end-stage renal disease on the day of transplantation before any treatment was administered. In these patients, plasmablasts accounted for a very low percentage of circulating B cells (IgD-CD38hi: 0.5±0.9% of total CD19+ cells). To differentiate memory B cells into plasmablasts, we cultured total PBMC with a polyclonal stimulation cocktail. Unstimulated control cultures in presence of only IL-2 were also performed. After 6 days of culture, the percentage of plasmablasts increased to 36.3±24.4%. Plasmablasts were not detected in control cultures (Figure 1A). In preliminary experiments, in vitro cultures lasting from 6 to 12 days were tested. The maximum concentration of IgG in culture supernatants was observed after ten days of culture, which explains that this condition was selected for further experiments. The presence of alloreactive memory B cells in the PBMCs before culture was assessed by detecting anti-HLA antibodies in culture supernatants using the HLA multiplex-bead array. The specificity and the MFI of anti-HLA antibodies measured in the supernatants was compared to that of anti-HLA antibodies detected in the serum collected on the same day as circulating PBMCs (Figure 1B).

Circulating alloreactive memory B cells are only detected in patients displaying anti-HLA antibodies following classical immunizing events

To test the specificity of the assay, we screened three populations of patients (Figure 2) namely, patients with no HLA antibodies (group 1), patients with HLA antibodies but without a history of immunizing events (group 2) and patients with HLA antibodies and a history of pregnancy, transfusion and/or previous transplantation (group 3). After 6 days of culture, the percentage of plasmablasts was similar in patients with or without circulating alloreactive memory B cells (40.7 ± 21.5 versus 31.4 ± 27.5, p=0.4), ruling out a problem of differentiation into plasmablasts in patients presenting no HLA antibodies in the supernatants. Moreover, the concentration of total IgG1 in supernatants was similar in patients with or without circulating alloreactive memory B cells (70.2 ± 53.3 versus 80.6 ± 93.2 mg/L).

Compared with group 1, patients in group 3 were more frequently women (Table 1). Compared with patients in group 2, patients in group 3 expressed more frequently class II anti-HLA antibodies and a higher percentage of positive single-antigen flow beads, i.e. a greater diversity of HLA reactivities. No circulating alloreactive memory B cells were detected in patients from group 1 and group 2 (Figure 2). At variance they were observed in 18 out of 39 patients of patients in group 3.

Detection of circulating alloreactive memory B cells is associated with the 'strength' of HLA immunization

In group 3, patients displaying alloreactive memory B cells were more frequently women (the difference is significant) having received a previous transplant (the difference is not significant) (Table 2). Patients displaying circulating alloreactive memory B cells frequently had more than one immunizing event: one, two or three different immunizing events were experienced by 22.2, 38.9 and 38.9% respectively of patients with alloreactive memory B cells versus 42.9, 52.4 and 4.7% of patients with no alloreactive memory B cells, p=0.028 (Figure 3). Accordingly, the mean number of immunizing events was higher: 2.2 ± 0.8 versus 1.6 ± 0.6, p=0.018 in patients who exhibited alloreactive memory B cells as compared to those who did not. Moreover, patients with alloreactive memory B cells had a higher maximal HLA antibody MFI as well as a greater percentage of positive single-antigen flow beads (Table 2). The counts of CD19+ peripheral B cells, as well as the proportions of the different B cells subsets were similar in patients with or without alloreactive memory B cells (Figure S1).

Alloreactive memory B cells are present decades after the immunizing event

The only immunizing event that can be precisely dated is a previous transplantation. Twelve patients with alloreactive memory B cells had received one or more previous transplants. In 9 of them, we found alloantibodies specific for alloantigens from a previous transplant in the supernatants (Table 3). In the three remaining patients, (# M, N, Q, Table 3), the presence of alloantibodies reactive to a previous graft could not be excluded due to the lack of DQ and DP typing of the donors. The delay between the previous transplant and the day of testing ranged from 6 to 32 years (mean 13.2 ± 8.4 years), highlighting a very long survival of these alloantibody producing B cells. Noteworthily memory B cells specific for antigens of a previous graft were detected in 5 cases after graft removal (#A, C, I, O, K).

The reactivity pattern of memory B cell-derived HLA antibodies is restricted.

We compared the target HLA specificities and the MFI of alloantibodies detected in memory B cell culture supernatants with those of alloantibodies present in the serum of the same patients (Table 3). We found fewer antigenic specificities for class I and II alloantibodies in supernatants when compared to the corresponding serum (figure 4A): 9 ± 9 class I or class II specificities in supernatants versus 34 ± 21 in serum ($p<0.0001$). In the supernatants we observed alloantibodies to class I alloantigens only in 8 patients, to class II alloantigens only in 6 patients and to both class I and II alloantigens in 4 patients (Figure 2). All patients with alloreactive memory B cells but one had both class I and II alloantibodies in the serum. Most HLA reactivities found in the supernatants were also present in the serum collected on the same day (86% on average, Table 3). Alloantibodies targeting one or two mismatched antigens from a previous donor (underlined bold antigens in Table 3, Figure 4A and B) were found concomitantly in the supernatants and in the serum of all patients in this category except one (patient #Q). In 6 cases, these antibodies were detected in the serum together with 1 to 6 additional donor-specific reactivities present in serum only.

When assessing the relative titer of the different HLA specificities by means of their respective MFI, we did not find the same hierarchy in the supernatants and in the serum from the same patients (Table 3). In other words, reactivities presenting the highest titers were distinct in the supernatants and the serums. For example (figure 4A), in patient #F.1 who had received two previous transplants, the anti-HLA-A1 antibody targeting a mismatched antigen of the second donor was the highest ranked antibody in the culture supernatant but not in the serum. The anti-A32 directed against the first donor showed one of the weakest MFI in the supernatant and a medium MFI in the serum.

In order to evaluate the repertoire of alloreactive memory B cells detected in the in vitro assay, we took advantage of the HLAMatchmaker analysis. In 14 patients (78%), the pattern of supernatants' alloantibody reactivities was restricted to only one or two shared eplets (Table 3: #A.1, B.2, D, E, G, H, I, J, K, L.2, M, N, O, Q; Figure 4B).

The number of eplets targeted by serum antibodies was significantly higher, ranging from one to more than 10 (Figure 4C). In 11 patients (64.7%) eplets targeted by supernatants' alloantibodies were also targeted by serum alloantibodies. Interestingly, in patient F, different eplets of the HLA class I mismatched antigens from previous donors were targeted by supernatant and serum alloantibodies. In 6 patients, some eplets were targeted exclusively by supernatants' alloantibodies, corresponding in 5 cases to HLA antigenic specificities identified only in the supernatants (Table 3: #B, C, D, L and P). In 8 of the 12 retransplanted recipients, alloantibodies in the supernatants were directed against mismatched eplets between donor and recipient (patients #A, C, D, F, I, J, K, O; eplets marked with * in Table 3). These donor-specific eplets were also targeted by serum alloantibodies in 6 of these 8 patients (75%).

Discussion

In this study, we describe the presence of alloreactive memory B cells in end-stage renal failure patients admitted for transplantation following HLA-immunizing events.

The memory B cell in vitro assay used was adapted from the procedure of Crotty et al. developed to track antigen specific IgG-producing memory B cells by ELISPOT (21). The assay is based on the use of polyclonal mitogens in combination with CpG, a TRL9 ligand, which triggers preferential proliferation and differentiation of memory B cells in absence of a B cell receptor (BCR) signal (29). The readout following B cell stimulation was the measurement of IgG HLA antibodies in culture supernatants using a highly sensitive bead array technology allowing the detection of a broad diversity of HLA specificities. Detection of alloreactive memory B cells was a specific phenomenon in HLA-sensitized patients as it never occurred in non-sensitized patients (i.e. without serum HLA antibodies).

Our study confirms the presence of memory B cells in pre-transplant immunized patients already reported in a few preliminary studies (15–18). In addition, results evidenced an impact of the 'strength' of HLA immunizing events (i.e. transfusion, pregnancy and transplantation) on the detection of alloreactive memory B cells. Indeed, patients with anti-HLA antibodies but without a history of immunizing event had no detectable alloreactive

memory B cells. These HLA antibodies, now frequently identified using solid-phase assays, may reflect the cross-reactivity between HLA molecules and bacterial, fungal or viral antigens, or an autoreactive response to HLA class I antigens (30,31).

In contrast, alloreactive memory B cells were detected in patients with a high burden of immunizing events and a higher titer and diversity of serum anti-HLA antibodies. Transfusion on its own, a mild immunizing event compared to pregnancy or previous transplants, was not associated with detectable alloreactive memory B cells (32). These observations suggest that repeated HLA-immunizations with shared antigens or epitopes of different sources (red blood cells, fetopaternal cells, previous grafts) may favor expansion, selection and survival of alloreactive memory B cells. This may relate first to the persistence of alloantigens in patients harboring a previous transplant, or after pregnancies through fetomaternal chimerism (33) promoting the long lifespan of memory B cells. Noteworthily, transfusions that as mentioned above were not associated on their own with detection of alloreactive memory B cells, rarely induce alloantigen persistence through microchimerism (34). Secondly, one may invoke the generation of an antigen recall response after each immunization, that drives an accelerated clonal expansion and rapid differentiation of memory B cells into high-affinity plasma cells (35). Recent evidence suggested that following such a recall, memory B cells can re-initiate a germinal center reaction (36,37). Interestingly, we detected alloreactive memory B cells up to several decades after the HLA immunizing events, as demonstrated by the presence in culture supernatants of anti-HLA antibodies targeting mismatched antigens of previous transplants, even after graft removal. This is reminiscent of the study by Mamani-Matsuda et al. showing that circulating vaccinia virus–specific memory B cells may be identified several decades after smallpox vaccination, thus demonstrating that they have the capacity to survive in the absence of the antigen (38). For retransplantation, as long as the graft is not removed, its presence probably provides a sustained stimulation of memory B cells, especially after weaning from immunosuppression following the transplant failure. After graft removal, persistence of memory B cells may indeed suggest an antigen-independent survival although durable microchimerism between the recipient and the graft cannot be excluded (39,40).

Another issue addressed by our work is the involvement of alloreactive memory B cells, relative to that of plasma cells, in the production of serum anti-HLA antibodies in immunized patients awaiting a transplant. In most cases, all HLA antibody specificities identified in culture supernatants were also present concomitantly in the corresponding serum, but with a different MFI hierarchy. In contrast, many specificities were only detected in the serum and not the corresponding supernatants. This suggests that presence of detectable alloreactive

memory B cells does not correlate with HLA antibody titers and suggest the contribution of other cellular sources such as plasma cells. Similar observations have been made for humoral memory to some infectious antigens. Mamani-Matsuda et al. did not find a correlation between the titer of anti-vaccinia virus IgG and the frequency of specific memory B cells (38). Similar results were obtained by Amanna et al. for five of eight viral antigens tested (8). Noteworthily, Perry et al., using an ELISPOT technique, identified specific alloreactive plasma cells in the bone marrow of nine immunized patients but no correlation between the number of PCs and the titer of serum alloantibodies (21). This suggests that the relation between serum antibodies and antibody-producing cells is not a simple quantitative one and that other factors may intervene.

Using HLAMatchmaker, we could show that the specificity of alloantibodies produced by alloreactive memory B cells was very restricted when compared to that of serum HLA antibodies. In more than half of the cases, all supernatants' antibodies recovered were directed against groups of antigens sharing only one or two eplets. These eplets included in 75% of retransplanted patients at least one mismatched eplet expressed by a previous donor. This strongly suggests an oligoclonality of alloreactive memory B cells driven most likely by antigen and affinity-maturation in germinal centers.

The reactivity pattern of serum alloantibodies was more diverse, often targeting numerous eplets and reactive to higher numbers of HLA class I and class II antigens. Such polyreactivity may be the consequence of multiple expositions to different alloantigens with authentic antigen-driven affinity matured antibody responses with differentiation of memory B cells yet below the detection threshold of the in vitro assay. Alternatively, these serum alloantibodies could be produced independently of alloantigen exposure through bystander B cell activation (29,41) of polyclonal cross-reactive B cells.

In conclusion, our study provides evidence for the presence of circulating alloreactive memory B cells in a subset of HLA-sensitized patients. Alloreactive memory B cells show a restricted pattern of epitope specificity and their detection is linked to the strength of previous HLA immunizing events. The in vitro assay described here combined with HLA matchmaker analysis may be useful in improving antibody-mediated rejection risk assessment before transplantation. The detection on the day of transplantation of circulating alloreactive memory B cells against a mismatched epitope expressed by the donor may constitute a high-risk situation requiring an adapted immunosuppression to prevent a recall response.

References

1. Einecke G, Sis B, Reeve J, et al. Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2009; 9: 2520–31.
2. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. Transplantation. 2010; 90: 68.
3. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010; 21: 1398–406.
4. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, et al. Donor-Specific Antibodies Adversely Affect Kidney Allograft Outcomes. J Am Soc Nephrol. 2012; 23: 2061–71.
5. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory B cell development. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 487–513.
6. Elgueta R, De Vries VC, Noelle RJ. The immortality of humoral immunity. Immunol Rev. 2010; 236: 139–50.
7. Good-Jacobson KL, Tarlinton DM. Multiple routes to B-cell memory. Int Immunol. 2012; 24: 403–8.
8. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. N Engl J Med. 2007; 357: 1903–15.
9. Leyendeckers H, Odendahl M, Löhndorf A, et al. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. Eur J Immunol. 1999; 29: 1406–17.
10. Ahuja A, Anderson SM, Khalil A, Shlomchik MJ. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 4802–7.
11. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JCW, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2003; 48: 2146–54.
12. Van Assen S, Holvast A, Benne CA, et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. Arthritis Rheum. 2010; 62: 75–81.
13. Van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MHJ. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. Blood. 2002; 100: 2257–9.
14. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. Clin Immunol Orlando Fla. 2007; 122: 62–74.

15. Mulder A, Eijsink C, Kardol MJ, et al. Identification, isolation, and culture of HLA-A2-specific B lymphocytes using MHC class I tetramers. J Immunol Baltim Md 1950. 2003; 171: 6599–603.

16. Han M, Rogers JA, Lavingia B, Stastny P. Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. Hum Immunol. 2009; 70: 29–34.

17. Zachary AA, Kopchaliiska D, Montgomery RA, Leffell MS. HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. Transplantation. 2007; 83: 982–8.

18. Heidt S, Roelen DL, de Vaal YJH, et al. A Novel ELISPOT Assay to Quantify HLA-Specific B Cells in HLA-Immunized Individuals. Am J Transplant. 2012; 12: 1469–78.

19. Perry DK, Pollinger HS, Burns JM, et al. Two novel assays of alloantibody-secreting cells demonstrating resistance to desensitization with IVIG and rATG. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2008; 8: 133–43.

20. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2008; 8: 753–60.

21. Crotty S, Aubert RD, Glidewell J, Ahmed R. Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. J Immunol Methods. 2004; 286: 111–22.

22. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. Hum Immunol. 2002; 63: 339–52.

23. Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. Hum Immunol. 2006; 67: 847–62.

24. Lobashevsky AL, Senkbeil RW, Shoaf JL, et al. The number of amino acid residues mismatches correlates with flow cytometry crossmatching results in high PRA renal patients. Hum Immunol. 2002; 63: 364–74.

25. Dankers MKA, Witvliet MD, Roelen DL, et al. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. Transplantation. 2004; 77: 1236–9.

26. Goodman RS, Taylor CJ, O'Rourke CM, Lynch A, Bradley JA, Key T. Utility of HLAMatchmaker and single-antigen HLA-antibody detection beads for identification of acceptable mismatches in highly sensitized patients awaiting kidney transplantation. Transplantation. 2006; 81: 1331–6.

27. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome. Transplantation. 2004; 78: 190–3.

28. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol Baltim Md 1950. 2001; 167: 3610–8.

29. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Science. 2002; 298: 2199–202.

30. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation. 2008; 86: 1111–5.

31. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in Nonalloimmunized Males: Pattern of HLA-Ia Reactivity of Anti–HLA-E–Positive Sera. J Immunol. 2010; 185: 1935–48.

32. Scornik JC, Meier-Kriesche H-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. 2011; 11: 1785–91.

33. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93: 705.

34. Bloch EM, Jackman RP, Lee T-H, Busch MP. Transfusion-associated microchimerism: the hybrid within. Transfus Med Rev. 2013; 27: 10–20.

35. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol. 2011; 12: 24–34.

36. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. Nat Immunol. 2009; 10: 1292–9.

37. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. Nature. 2011; 470: 543–7.

38. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus–specific memory B cells. Blood. 2008; 111: 4653–9.

39. SivaSai KS, Jendrisak M, Duffy BF, et al. Chimerism in peripheral blood of sensitized patients waiting for renal transplantation: clinical implications. Transplantation. 2000; 69: 538–44.

40. Sahota A, Gao S, Hayes J, Jindal RM. Microchimerism and rejection: a meta-analysis. Clin Transplant. 2000; 14: 345–50.

41. Baumjohann D, Preite S, Reboldi A, et al. Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. Immunity. 2013; 38: 596–605.

Table 1: baseline characteristics of the three groups of patients

Abbreviations: Ab anti-HLA antibodies, IE immunizing events

Characteristics of patients	Group 1 No Ab (n = 18)	Group 2 Ab+ / no IE (n=12)	Group 3 Ab+/IE+ (n=39)	p
Age of recipient, yrs (mean ± SD)	48.0 ± 12.2	41.9 ± 13.1	46.0 ± 13.5	0.59/0.36
Sex, n (% female)	4 (22.2)	11 (8.3)	21 (61.5)	**0.006/0.001**
Retransplant, n (%)	4 (22.2)	-	20 (51.3)	**0.039**
Transfusion, n (%)	9 (50.0)	-	31 (81.6)	**0.015**
Pregnancy, n (%)	3/4 (75.0)	-	22/24 (91.7)	0.32
No immunizing event, n (%)	9 (50.0)	12 (100)	-	
Class I Antibodies, n (%)	-	7 (58.3)	30 (83.3)	0.07
Class II Antibodies, n (%)	-	5 (41.7)	28 (77.8)	**0.019**
HLA Antibodies class I – MFI max	-	3658 ± 2972	7413 ± 6310	0.10
HLA Antibodies class II – MFI max	-	2410 ± 2482	8497 ± 7802	0.17
Positive class I beads, %	-	2.2 ± 2.5	15.3 ± 18.8*	**0.021**
Positive class II beads, %	-	2.1 ± 4.4	17.8 ± 21.2*	**0.015**

Table 2: Characteristics of group 3 patients with circulating alloreactive memory B cells

Abbreviations: CAMBC circulating alloreactive memory B cells, MFI mean florescence intensity

	POSITIVE CAMBC N=18	NEGATIVE CAMBC N=21	P
Age yrs, mean ±SD	48.3 ± 11.3	44.0 ± 15.1	0.33
Sex female, n(%)	14 (77.8)	10 (47.6)	0.050
Rank mean ±SD	1.9 ± 0.7	1.5 ± 0.7	0.06
Rank 1st	6 (33.3)	13 (61.9)	0.075
2nd	8 (44.4)	6 (28.6)	
3rd and more	4 (22.3)	2 (9.5)	
Detransplantation	7/11 (63.6)	3/8 (37.5)	0.3
Pregnancy	13/14 (92.9)	9/10 (90)	0.80
Transfusion	14 (77.8)	17 (85)	0.56
Higher MFI of class I Anti-HLA Antibodies	11273 ± 5085	4147 ± 5435	**0.003**
Higher MFI of class II Anti-HLA Antibodies	14077 ± 6907	3383 ± 4326	**0.0002**
Higher MFI of class I or II Anti-HLA Antibodies	16495 ± 3602	4810 ± 5590	**< 0.0001**
Positive class I beads, %	27.4 ± 18.5	7.9 ± 14.9	**0.002**
Positive class II beads, %	33.0 ± 22.4	7.0 ± 12.0	**< 0.0001**

Table 3: Immunizing event, HLA types, analysis of serum and supernatant anti-HLA antibodies at the antigenic and epitopic level (with HLA matchmaker)

Patient – (Male/Female – Age) Year of PBMCs harvesting	Immunizing event, Year of previous transplant(s)	HLA Type (Recipient – Donor if previous transplant), mismatches underlined	Serum Antibodies (ordered by decreasing MFI) – Superscript numbers refer to shared eplets – Underlined specificities correspond to mismatched antigens expressed by previous transplant.	Eplets shared by serum antibodies	Supernatant Antibodies (ordered by decreasing MFI) – Superscript numbers refer to shared eplets – Underlined specificites correspond to mismatched antigens expressed by previous transplant.	Eplets shared by supernatant antibodies
#A – (M-63) 2011	R T 1993 (removed)	R: A1 A26 B8 B56 D: A1 A24 B8 B14	B77[1], B51[1], B59[1], B53[1], B44[1], B47[1], B52[1], B63[1], B27[1], B58[1], B38[1], B37[1], B49[1], B57[1], B13[1], **A24[1],** A25[1], A32[1], A23[1], A2, A68, Cw5, A69, A29, A80, A66	**1**:82LR*	**A24[1]**, A23[1], A32[1], B49[1], B59[1], B51[1], B57[1], B38[1], B52[1], B53[1], B58[1], B63[1], A25[1], B77[1], B37[1], B27[1], B44[1], B13[1], B47[1]	1: 82LR*
#B.1 – (F-31) 2008	R T 1997	R: A1 B49 D: A1 A23 B49 B50	B81, B7, B42, **A23[1]**, B55, B8, B51, B48, B82, B35, B78, B61, B62, A24[1], B60, B71, B76, B61, B53, B67, B18, *B39, B54, B56, B13*, B72, B27, *B41, B38, B52*, Cw2, B37, B46, *B59*, Cw15, B75, B64, B13	**1**:66GK*+ multiple eplets	B8, B59, B7, B81, B55, B13, B48, B42, B61, B27, B72, B60, **A23**, B37	No common eplet
#B.2		R: DR4 DR53 DQ3 D: DR4 DR53 DR8 -	DR12[1], **DR8[1]**, DQ4, DQ2, DR13[1], DR17[1], DR11[1], DR14[1], DR16, DQ7, DR18[1], DQ8, DP4, DR52[1], DR7, DQ6, DP5, DR15, DP23, DP2, DR103, DP4, DP18, DR15, DR9	**1** : 149H* + multiple eplets	DQ5[1], DP2, DP23,	1: 125 SQ DP: no common eplet
#C.1 – (F-63) 2011	R P T 1990 (removed) 2002	R: A2 B58 B44 D1: A2 A29 B7 B44 D2: A2 A32 B53 B57	Cw6, Cw18, **B53**, **A32**, **B7**, Cw4, B51, B35, Cw15, Cw12, B78, **A29**, A36, B81, A66, B56, B52, A33, B55, B82, Cw17, B75, A43, B42, A25	Multiple eplets	Cw6, Cw18, B71, B64, B62, B65	No common eplet
#C.2		R: DR13 DQ6 D1: DR15 DR7 D2: DR1 DQ5 DQ6	**DQ5[1,4]**, DR11[5], DQ9[2], DQ7[2], DR53[6,7], DQ8[2], DQ2[1], DQ4[3], DR1[6], **DR7[7]**, **DR15[8]**, DR16[8], DR10[8], DR51[6], DR9[6,7], DQ6, DR103[6]	**DQ eplets** **1**: 77DR;**2**: 55PPP; **3**:23L;**4**:14GL/30HYV/70GA/87AY/116GL* **DR eplets** : **5**:57DE;**6**:32IYN; **7**: 4Q;**8**: 96QV	DP9[2,3], DP18[1], **DQ5[4]**, DP17[2], DP3[3], DP14[2,3], DP6[2], DP5, DP1[3], DP10[3], DP13[2], DP28[1], DP15[1], DP2, DP23	**DP eplets** **1**: 84VG **2**: 56ED **3**: 76V **4**:14GL/30HYV/70GA/87AY/116GL*
#D – (F-60) 2007	R P T 1992	R: A23 A33 B7 B45 D: A3 A25 B44 B47	A66[1], A26[1], **A25[1]**, **A3[1]**, B57[4], A11[2], A43[1], B58[4,7], **B47[3,8]**, **B44[3]**, B63[5], B37[3,7,8], B27,[38], A34[1], B13[3], B52[7], A1[2,5], B51[7], A36[5], A80, A2[4], Cw9[6], B77, A32, B78[7], Cw10[6], B56, B62, B71, B49, B46, B72, B53[7], B67, B18[7], B38, A74, B50, A68, B35[7], B75, A24	**1**: 151ahe*;**2**: 161ER*;**3**: 79RT* **4**: 62GE;**5**: 66RNM **6**: 173K;**7**:44RT **8**:76ed*	**B47[1]**, B37[1], B27[1], B13, B67[2], B18, B38[2], B39[2], B65	**1**: 76ed* **2**: 158t
#E – (F-45)	R P	R: A2 B14 B15	A32[1], B51[2,6], B53[2,6], B57[1], A25[1], B49[3], B52[2], A24[3], B38[3], A23[3], B63[1], B27[3], B59[3], B58[2], B77[3], B44[3], B37[2], B13[3], B35[2,6], B47[3], A33[4], A34[1], A68[1], A69[1], B78[2,6], A66[1], Cw18[5], A11[1], A31[4], B75, A29[4], A26[1], B50, B73[5], A1[1], B56, A30[1], Cw4[5], A80[1], Cw6[5], A36[1], A43[1], A3[1], B18[2], Cw7[5], A74[1], B60, B61, B71	**1**: 66rn; **2**:44RT **3**:82LR; **4**:138MI **5**:90d ;**6**:qif	B35[1], B51[1], B53[1], B78[1]	**1**:66qif

Table 3: Immunizing event, HLA types, analysis of serum and supernatant anti-HLA antibodies at the antigenic and epitopic level (with HLA matchmaker)

#F.1 – (M-49) 2007	T 1975 1981	R: A2 B51 B62 D1: A32 B5* D2: A1 A2 B5*	Cw7[3], Cw6[3], Cw2[4], Cw15[4], B73[3], B76, Cw5[4], Cw18[3,4], B82[6], B44[6], Cw4[3], B63[2], A24[1], Cw17[4], B45[6], A30[1], A34[1], A3[1], A33[1], Cw12[5], A74[1], A29[1], B57[2], A66[1], B7, **A32**[1], A31[1], A23[1], A11[1], A26[1], B81[7], Cw16, B48[7], B61, B60[7], A43[1], A25[1], B58[2], A80, A68, A36[1], B13, B27, **A1**[1], B38, Cw10, Cw8, B37, Cw14, Cw1, B59, B55	**1**:138 MI*, **2**:66RNM* ; **3**:90d* **4**:79RK ; **5**: 73as **6**:167ES ; **7**: 147I	**A1**[1,2], B76[2], A24[2], A23[2], A36[1], A43, A80[2,3], A29[3], A11[1,3], A30[1], A3[1,3], Cw7, A25, A34, A66, A74, [1]A33, A31[1], **A32**[1]	**1**:62QE* **2**: 167DG* **3**:113yr*
#F.2		R: DR1 DR4 DQ5 DQ8 D1: - - D2: DR3 DR6	DR11[1], DQ9[4,6], DR8[1], DQ2[5], DR52[1], DR14[1], DR15[2], DR12[1], DR9[1], DR7[1], DR13[1], DR103[3], DQ7[4,6], DR16[2], DQ6[6], DR18[1], DR17[1], DR4[3], DQ4, DR10[2], DR51, DR53, DP18, DP11, DP5, DP3, DP6, DP19, DP13, DP1, DP23	1: 96HV* 2: 96QV 3:71DEA 4:56PPD 5:45GES 6: 167HG	DQ2[3], DR13[1], DR17[1], DR14[1], DR11[1], DR8[2], DR18[1], DR12[2]	1: 12 STS 2:14GEY 3:45GES or 56LPA
#G – (F-42)	P	R: A24 A33 B35 B65	A80[2], B67, B73[1], B63, A2[3], A29, B37, A11[4], A25, A1, A66, Cw17[5], Cw7[5], Cw6, B8, B58, B82	1: 267Q 2: 56E 3:63GEK 4:AHA 5:267Q	B73[1], A80[2]	1: 267Q 2: 56E
#H – (F-32)	P	R: A2 A2 B13 B61 Cw3 Cw4	A29, A26, A24, B7, A80, B76, A23, A43, B42, B55, B81, B82, B67, A11, B54, A3, B27, A1[1], B63, B57, A36[1], B56, B73, B48, B60, Cw1, B58, B45, Cw14, B41, B8, B44, A66, Cw4, A25	1:44KM + multiple eplets	A1[1], A36[1]	1:44KM
#I – (F-61) 2008	R P T 1999 (removed)	R: A1 A2 B8 B27 D: A1 A2 B57 B8	B56[1], B58[1,2], **B57**[1,2], B35[1], B62[1], B13[2], B49[1], B50[1], B75[1], B71[1], Cw5, B63[1], B72[1], B61, B45, B53[1], B77[1], B60, B41, B47, B13, Cw10[1], B61, B52[1], B78[1], B51[1], Cw15, A23, Cw9[1], Cw18, B44, B46[1], B75[1], A24, Cw6, A31, A74, A33, Cw17, A68, B38, A33, B76, B59, Cw4, A30, Cw8, B55, A66, A32, B39, A25, B18, B67, A69, Cw16, Cw12, Cw1, B54, A34, B48, Cw14, Cw7, B37	**1: 163LW* 2:63GEN*+ multiple eplets**	**B57**[1], B58[1]	1:63GEN*
#J – (F-62) 2008	R P T 2002	R: A32 A74 B8 B72 D: A1 A68 B51 B81	**A1**[1,2], A36[1], B76[2], A29, B45, B44[3], A24[2], A80[2], A23[2], B63, Cw7[4]	1:44KM* 2:167DG* 3:199v 4: 193PL	**A1**[1], A36[1]	1:44KM*
#K – (M-55) 2012	R T 1993 2004 (removed) 2007	R: A1 A2 B7 B49 D1: A3 A2 B7 B27 D2: A1 A2 B8 B51 D3: A11 A2 B62	**B51**[1,2,3], B35[1,2,3], B53[1,2,3], B78[1,2,3], B75, **B62**, B18[1], B77, B75, B76, B52[1,2], B37[1], B72, B48, B71, **A11**, B38, Cw12[2], Cw2[2], Cw5[2], Cw6[2], Cw15[2], B64, Cw4[2], Cw7, B46, Cw18[2], Cw10[2], A43, Cw9, B82, B61, A23, Cw17[2], B8[3], B65, B59, Cw16[2], A66, B58[2], Cw1, A80, Cw10[2], Cw8[2], A36, A26, B63, A29, A34, A33, A25, B67, B39, Cw14[2]	1:44RT* 2:193pv* 3:66qif* + multiple eplets	B35[1], **B51**[1], B78[1], **B62**, B75, B53[1], B18, B72, B77, B76, B48, B37, B8, B38, B52, B71, B39, B59[1]	1:66qif*

Table 3: Immunizing event, HLA types, analysis of serum and supernatant anti-HLA antibodies at the antigenic and epitopic level (with HLA matchmaker)

#L.1 – (F-29)	R P	R: A68 B35 B55 Cw04 Cw09	A32[1], B49[1], A25[1], B44[2], A24[1], B76, B57[1], B52[1], B51[1], A23[1], B53[1], B58[1], B63[1], B38[1], B59[1], B27[1], B77[1], B45, A1	**1**:79RI **2**:199v	A25	none
#L.2		R: DR13 DR17 DQ2 DQ6 DP1 DP2	DR4[1], DR13, DR51[2], DQ4, DR1	**1**:96YL4 **2**:6C	DQ7[1]	1:45EV
#M – (F-41) 2007	R P T 2000 (removed)	R: DR1 DR7 DQ5 DQ2 D: DR4 DR7	DQ6[4,5], DQ7[4,5], DQ8[4,5], DQ4[4,5], DQ9[4,5], DR13[1], DR11[1], DR14[1], DR17[1], DP9, DR8[2,3], DP14, DP17, DR18[1], DP18, DP3, **DR4**[2], DP28, DP6, DP4, DP2, DR15[2], DR16[2], DR52[2], DP5, DP1, DR12[3], DP10, DP13	DR 1:12STS 2:40DFD* 3:14GEY DQ 4:77DT 5:55PPP	DQ7[1], DQ8[1], DQ9[1]	1:55PPP
#N – (F-41) 2007	R P T 1993 (removed)	**R**: DR3 *DR52* DQ2 **D**: DR3	DR12[1], DR51[1], DR16[1], DR4[1], DR8[2], DR13[1], DQ8[3], DQ6[4], DR14[1], DR15[1], DR103[1], DR11[1], DR7, DR1[1], DR9[2], DQ7[3], DQ4[3], DQ9[3], DR10[1], DQ5[4]	**DR 1**: 73AADT **2**: 67FR **DQ 3**:52PL/140T2 **4**:84EV	DQ7[1], DQ8[1], DQ9[1], DQ4[1]	52PL or 140T2
#O – (M-48) 2008	R T 1987 (removed)	**R**: DR11 DR13 DQ7 DQ9 **D**: DR2 DR4 DR53	DQ6[5], DQ5[5], DR53[1], DQ4[6], DR51[2,3], DR9[3], DR4[4], DP11, DR1[2], DR103[2], DP4, DP17, DR13[4], DP2, DR14[4]	**1**:48YQ6* **2**:96EV **3**: 40HFD **4**:71Qk/rA **5**:52PQ/84EV **6**:26G/57LD/70ED /74SV	DR53[1]	**1**:48YQ6*
#P – (F-48)	RP	**R** : DR3 DR52 DQ2 DQ4	DQ6[3], DQ5[3], DR13[1], DR12[2], DR103[1], DR16[2], DR4[1], DR11[2], DR51[2], DR8[2], DQ8[4], DQ7[4], DQ9[4]	**DR eplets** **1**:71DEA/74DEAA **2**: 71 DRA/74DRAA **DQ eplets** **3** :52PQ/84EV **4**:55PPP/66EV/67 VVT/70RT/71VRT /74EL	DQ6, DQ5, DR4[1], DR12[2], DR13[3], DQ7[7], DQ8[7], DQ9[7], DR53[4], DR15[5], DR7[6]	**1**:96YL4 **2**:25YRL **3**:67IK **4**:48YQ6; **5**:31QFHY **6**:26QF3/67IR/ 67GDT **7**:55PPP/66EV/6 7VVT/70RT/71V RT/74EL
#Q – (F-42) 2006	R P T 1988 1998 (removed)	**R** : DR15 DR13 DQ5 DQ6 **D1**: DR16 DR13 **D2** : DR15 DR13 DQ6	DQ7[1], DQ9[1], DQ8[1], DQ2[1], DQ4[1], DP3[2], DP1[2], DP11[2], DP9[2], DP6[2], DP14[2], DP19[2], DP5[2], DP17[2], DP10[2], DP13[2], DR8, DR4, **DR16**, DR1, DR52, DR17	1: 84QL2 2: 84DEAV	DQ7[1], DQ2[1], DQ4[1], DQ8[1], DQ9[1], DP9[2], DP5[2], DP11[2], DP3[2], DP14[2], DP6[2], DP1[2], DP17[2], DP13[2], DP19[2], DP10[2]	1: 84QL2 2: 84DEAV
#R – (F-57)	P	**R**: DR11 DR17 DQ2 DQ7	DR10[1], DQ4[2], DQ5[3], DQ6[3], DR1[1], DR103[1]	1: 25HRL 2: 57LD/70ED 3: 57PV	DR1	none

Abbreviations R: Red Cell Transfusion, **P**: Pregnancy, **T**: Previous transplant; * mismatched eplets between previous donor and recipient; /: several eplets possible

Figures

Figure 1: Description of the alloreactive memory B cells specificity assay

A. Memory B cells were differentiated into plasmablasts through polyclonal stimulation (see methods) of total PBMC. After 6 days of culture with polyclonal stimuli or only IL-2 (control culture), the percentage of $CD19^{+}IgD^{-}CD38^{hi}$ plasmablasts rose to 35.4% (or remained equivalent to day-0 around 0.2%). **B**. Culture was pursued for 4 days after adding IL-2, IL-4, IL-6 and IL-21 at day-6. Supernatant (SN) was recovered at day-10 and concentrated 30 times. Anti-HLA antibodies were screened and analyzed with multiplex-beads arrays. Specificities and level of anti-HLA antibodies in serum and supernatant were compared. In this patient representative of others, more specificities were found in serum than in SN and hierarchy of different antibodies in terms of MFI was different. This patient had in serum and SN antibodies, among others, directed against the A24 mismatch of his first transplant in 1993 (**MM**).

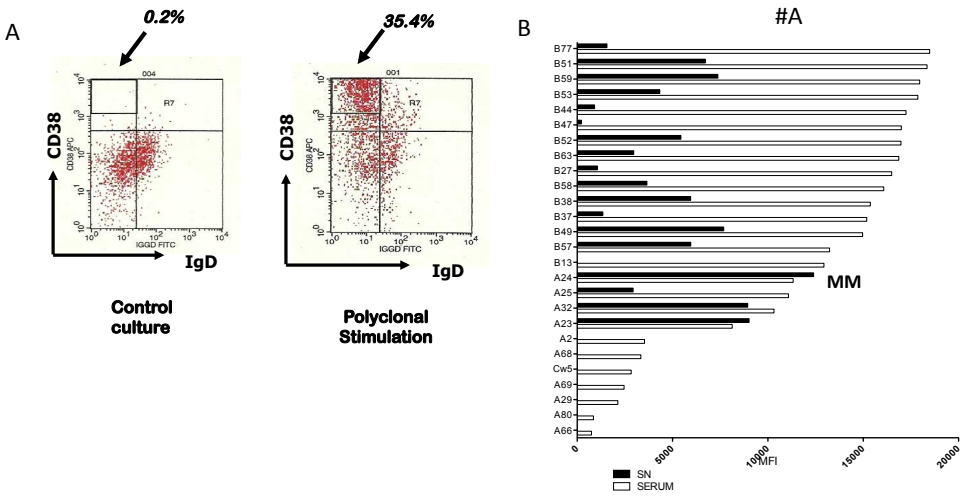


Figure 2: Screening of Circulating Alloreactive Memory B cells in the three groups of ESRD patients prior to transplantation

CAMBC are present when anti-HLA antibodies are found in supernatant recovered from 10 days of culture of PBMCs with polyclonal stimuli. Anti-HLA antibodies were only found in SN in the group 3 of patients who developed anti-HLA antibodies following a classical immunizing event (transplantation, pregnancy, transfusion).

Abbreviations: ESRD end-stage renal disease, SN supernatant

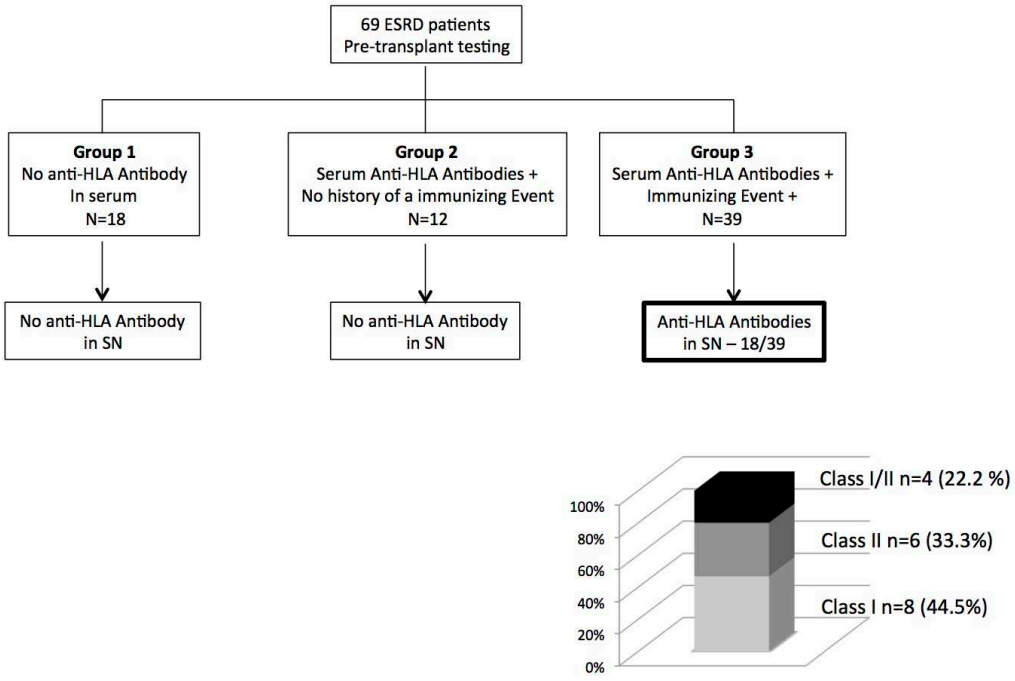


Figure 2

Figure 3: Presence of circulating alloreactive memory B cells is associated with the number of immunizing events

The patients of group 3 who have anti-HLA antibodies in supernatant experienced more frequently multiple sources of immunizing events than patients without HLA antibodies in SN. Abbreviations, IE: immunizing event.

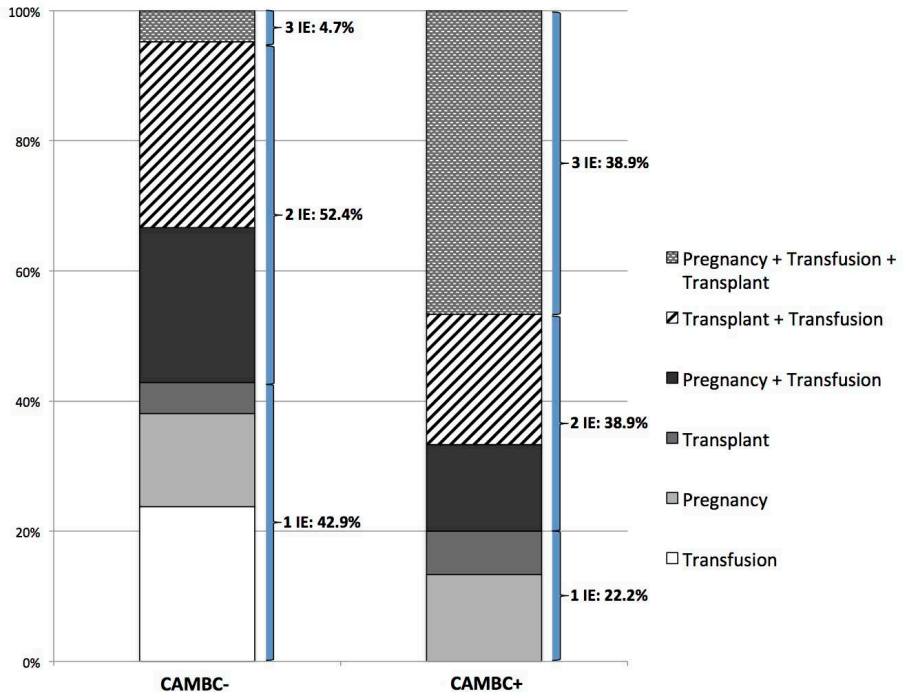
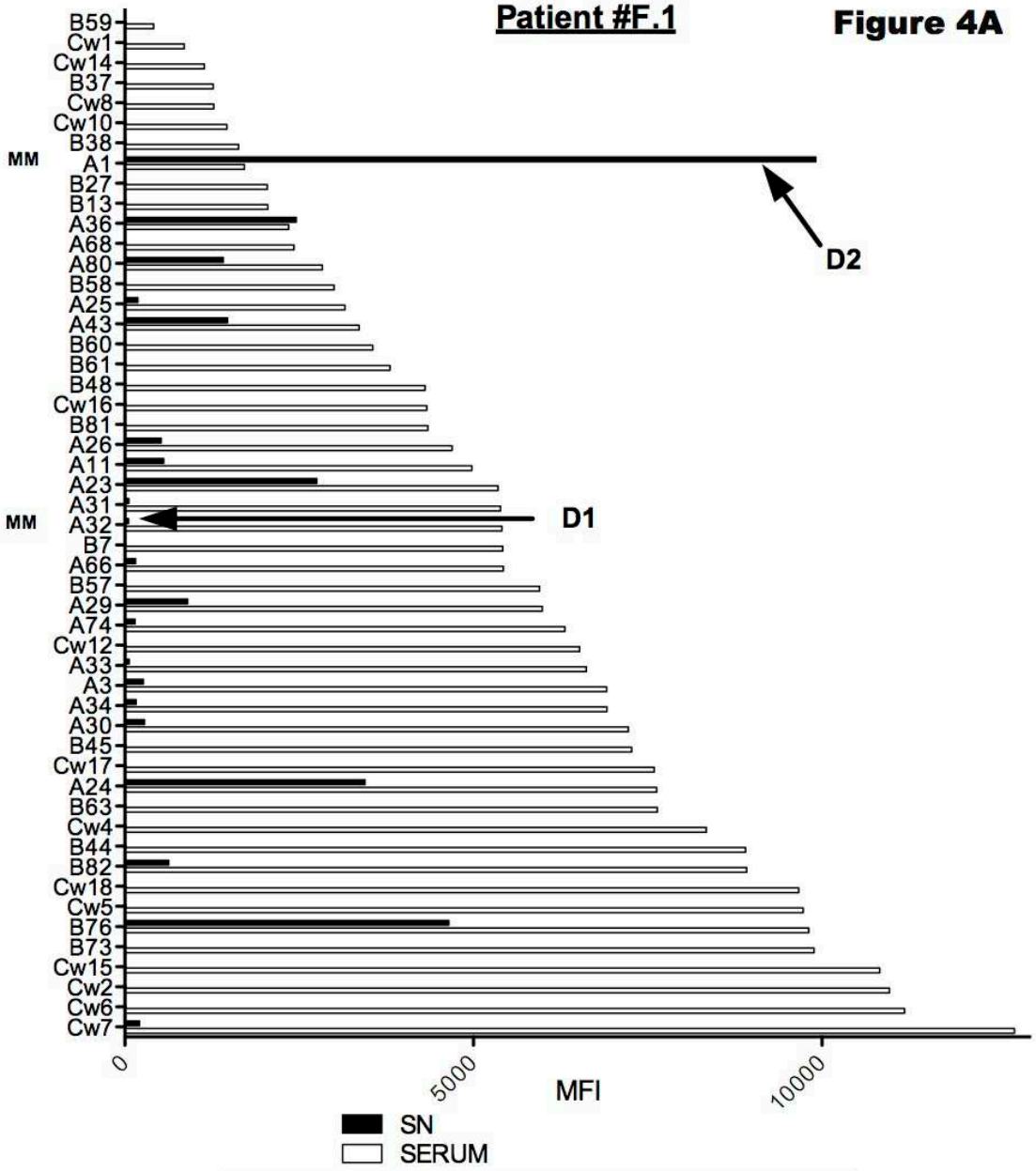


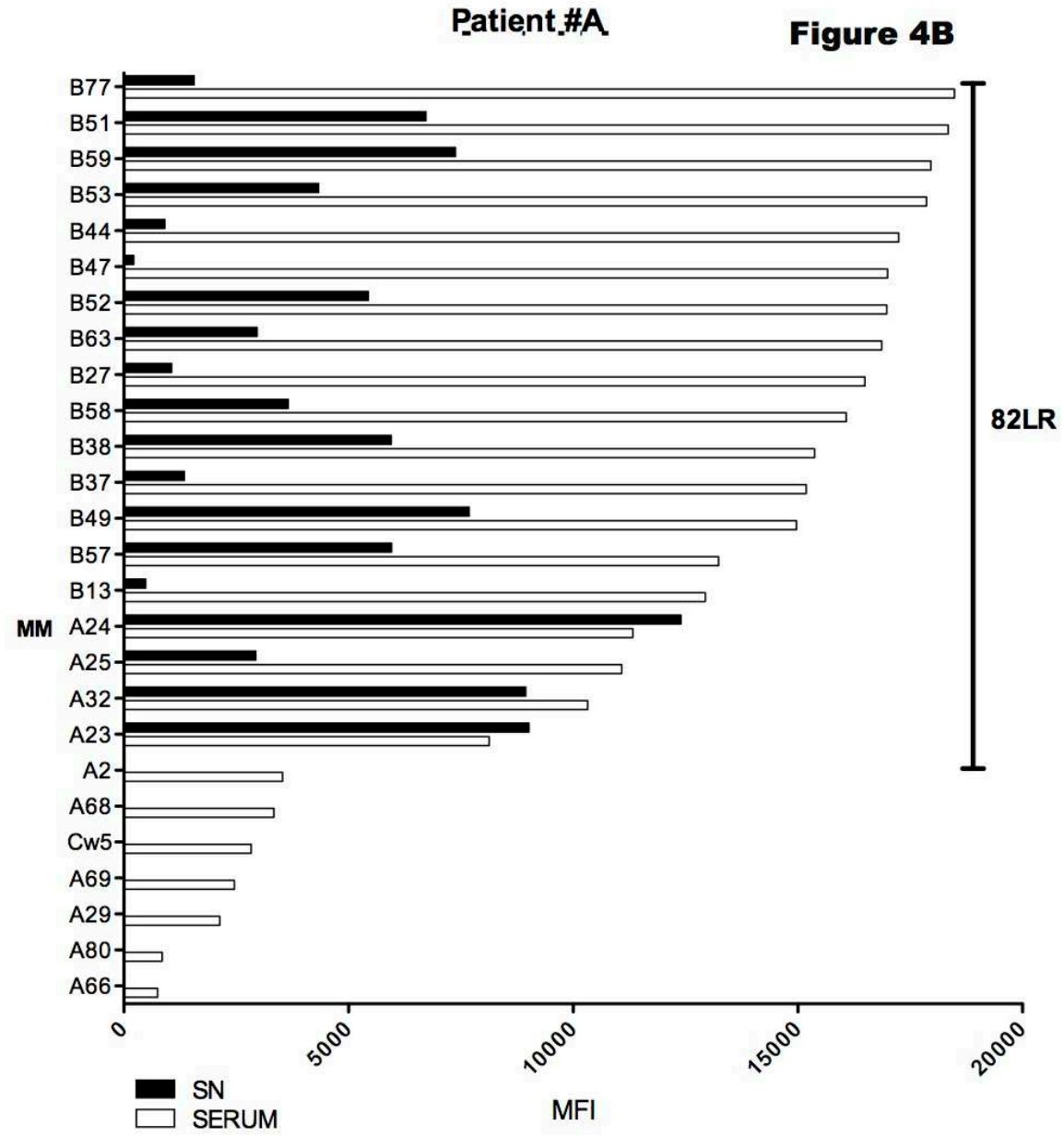
FIGURE 3

Figure 4: Comparison between supernatant and serum alloantibodies in patients with CAMBC

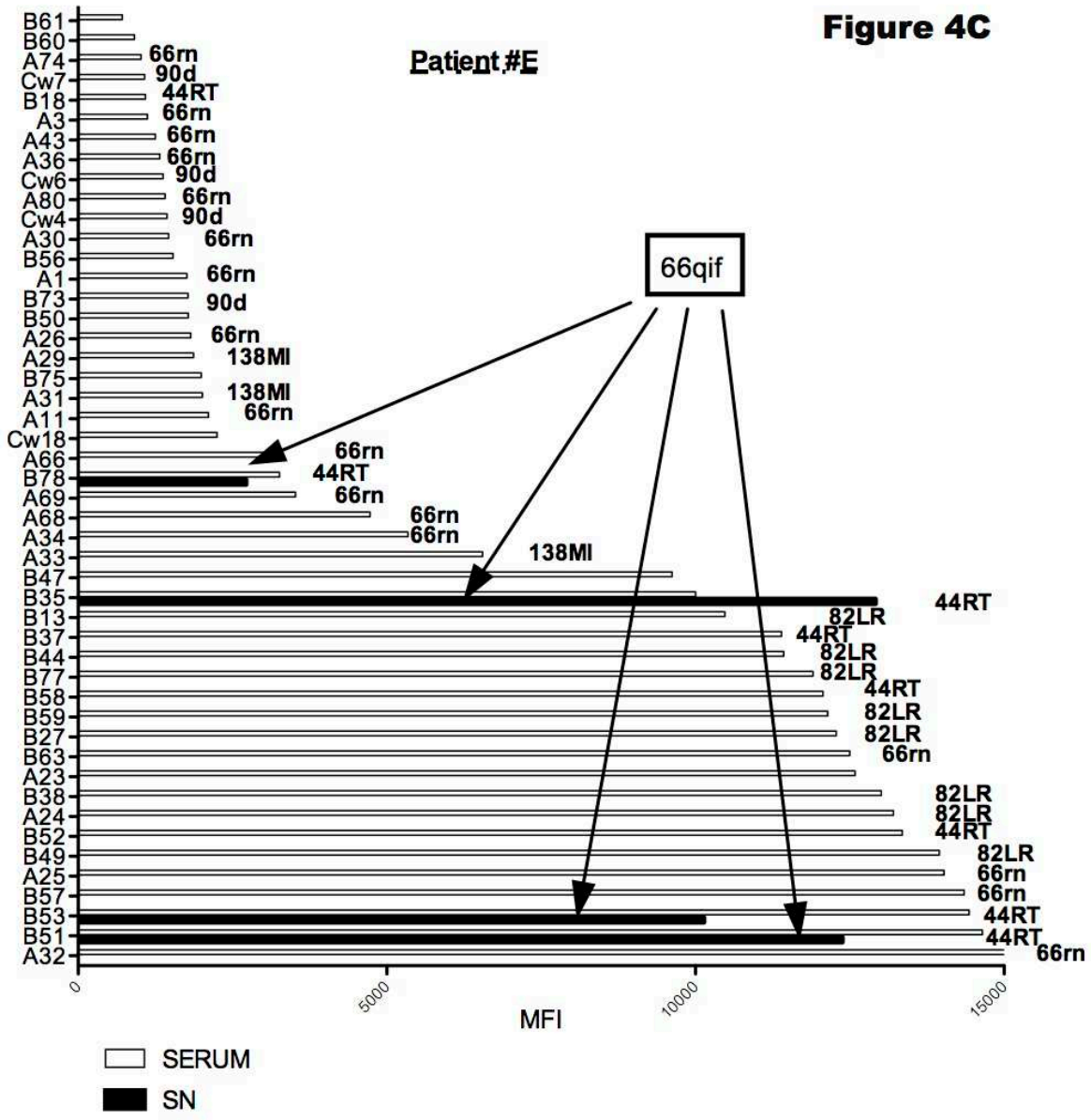
A/ Patient # F.1. Specificities of supernatant and serum antibodies in 49-year old male the day of his third transplant in 2007. Analysis of serum antibodies (white bars) revealed a higher number of HLA specificities than in supernatant (black bars). All HLA reactivities found in supernatant are also present in serum but with a different MFI hierarchy. Some of them are directed against mismatches (MM) of previous transplant: A32 (D1 first transplant in 1975) and A1 (D2 second transplant in 1981). B/ Patient #A. Specificities of alloantibodies in a 63-year old man the day of his second transplant in 2011. All antibodies found in supernatant share a common epitope 82LR, expressed by A24, the mismatch of his first transplant performed in 1993. These antibodies are also found in serum, in association with other alloantibodies. C/Patient #E. Specificities of alloantibodies in 45-year old woman the day of her first transplant. Antibodies found in supernatant share the 66qif epitope. In the serum there are several anti-class I antibodies (n=49), not found in supernatant, and corresponding for 45 of them to five other epitopes 66rn, 44RT, 82LR, 138MI, and 90d, in addition to 66qif.



R	A2	--	B51	B62
D1 (1975)	A32	--	B51	B62
D2 (1981)	A2	A1	B51	--



Recipient HLA typing	A*01:01	A*26:01	B*08:01	B*56:01
Donor HLA typing	A*01:01	A*24:02	B*08:01	B*14:02
Number of mismatched eplets	0	16	0	6
Mismatched epelts	--	9s,62EE,66GK,69kah,76en,77eni, 79RI,**82LR**,83alr,105s,113yh,127K, 150AAH,151ahv,156qa,163tg,	--	11av,12avr,66qic, 113yn,116f,151are,


Figure 4C
Patient #E
66qif
B61
B60
A74
Cw7
B18
A3
A43
A36
Cw6
A80
Cw4
A30
B56
A1
B73
B50
A26
A29
B75
A31
A11
Cw18
A66
B78
A69
A68
A34
A33
B47
B35
B13
B37
B44
B77
B58
B59
B27
B63
A23
B38
A24
B52
B49
A25
B57
B53
B51
A32
66rn
90d
44RT
66rn
66rn
66rn
90d
66rn
90d
66rn
66rn
138MI
138MI
66rn
66rn
44RT
66rn
66rn
66rn
138MI
44RT
82LR
44RT
82LR
82LR
44RT
82LR
82LR
66rn
82LR
82LR
44RT
82LR
66rn
66rn
44RT
44RT
66rn
0
5000
10000
15000
MFI
SERUM
SN

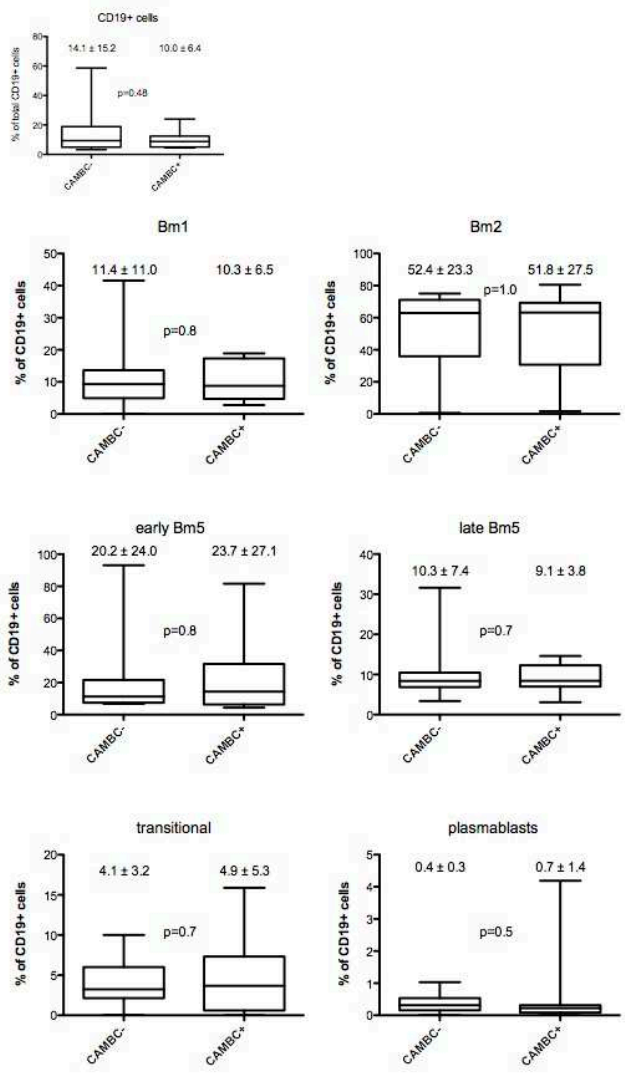


Figure S1 : Pre-transplant B cell subsets in patients with and without CAMBC

Discussion des résultats

Nous avons montré dans cette étude qu'il était possible de détecter des lymphocytes B mémoire alloréactifs de nombreuses années après un événement immunisant. Ces lymphocytes constituent donc une population à longue durée de vie, comme ce qui a également été montré vis-à-vis de certains agents infectieux. Le seul événement qui pouvait être daté avec précision étant une transplantation rénale préalable, nous avons pu détecter dans le surnageant de culture des lymphocytes B des anticorps ciblant les mismatches des transplantations préalables chez tous les patients retransplantés pour lesquels le typage du donneur était disponible.

Les lymphocytes B mémoire alloréactifs n'ont été détectés que chez des sujets présentant plusieurs évènements immunisants, et jamais chez les patients présentant des anticorps anti-HLA en l'absence d'événement immunisant. Au sein des différents évènements immunisants, les antigènes portés par un greffon antérieur constituent la principale cible des lymphocytes B alloréactifs mémoire. En effet, un antécédent de transplantation est retrouvé chez 12 des 19 patients ayant un surnageant positif.

Néanmoins, la persistance de l'antigène HLA ne semble pas être un facteur nécessaire pour la survie prolongée des lymphocytes B mémoire alloréactifs, puisque ils ont été également détectés chez des patients ayant été détransplantés ou n'ayant comme événement immunisant qu'une grossesse associée ou non à des transfusions. L'existence d'un microchimérisme pourrait expliquer la persistance de l'antigène chez les patients détransplantés ou après grossesse. Néanmoins, la fréquence de ce microchimérisme est faible dans la littérature, diminue avec le temps et n'a jamais été corrélée directement avec les anticorps anti-HLA.

La comparaison des spécificités des anticorps anti-HLA présents dans le sérum – nettement plus nombreuses – et dans le surnageant de culture – presque toujours présentes dans le sérum et reflétant la spécificité des lymphocytes B mémoire – sont en faveur de deux bras indépendants de la réponse humorale : les lymphocytes B mémoire et probablement les plasmocytes présumés à longue durée de vie. En effet, en étudiant avec le logiciel HLAMatchmaker les anticorps des patients ayant une retransplantation, ce qui permet de cerner l'influence de l'antigène, on observe que le mismatch antigénique exprimé par le greffon antérieur est toujours ciblé par les anticorps présents dans le surnageant. Par comparaison, la réactivité des anticorps sériques est beaucoup plus large et comporte les anticorps spécifiques du 1er greffon, en plus de nombreux anticorps non spécifiques. Cependant, les patients transplantés avaient également été exposés à des alloantigènes via des grossesses et/ou des transfusions, qui peuvent expliquer la présence d'autres anticorps.

Au vu de ces résultats on peut faire deux hypothèses principales, non mutuellement exclusives, quant aux mécanismes de synthèse et de maintien des alloanticorps **(Discussion, figure 10)** :

- l'exposition à plusieurs alloantigènes induit diverses réactions de centres germinatifs aboutissant à la génération de plasmocytes à longue durée de vie synthétisant les anticorps du sérum. Des antigènes infectieux peuvent être à l'origine également d'une réaction croisée avec les antigènes polymorphes du système HLA et donner lieu à une réponse humorale. Ces anticorps ciblent des épitopes différents, chacun partagés par un nombre variable d'antigènes, ce qui explique la diversité des anticorps du sérum. Un ou plusieurs épitopes « dominants », particulièrement ceux portés par un transplant antérieurement greffé, sont associés à l'expansion clonale de lymphocytes B mémoire spécifiques qui sont détectés en périphérie par notre test alors que la fréquence des autres lymphocytes B mémoire est en dessous du seuil de détection.
- une autre hypothèse serait qu'à côté de ce clone issu d'une expansion induite par un antigène dominant, des anticorps polyréactifs (allo- et autoréactifs) d'isotype IgM mais aussi IgG, dits « naturels » car non déterminés par un contact antigénique spécifique, soient synthétisés. Ces anticorps pourraient être de la même origine que ceux détectés chez les patients n'ayant pas d'antécédent d'évènement immunisant conventionnel (cf annexe 2). L'observation de tels anticorps polyréactifs pourrait expliquer ces spécificités multiples chez les patients du groupe 3 n'ayant pas de lymphocyte B mémoire détecté ou chez ceux ayant des lymphocytes B mémoire alloréactifs d'une spécificité plus restreinte, car différenciés à la suite d'une réaction immune conventionnelle vis-à-vis d'un alloantigène HLA.

DISCUSSION

Méconnaissance des cibles thérapeutiques dans le traitement du rejet humoral en transplantation

Ces dix dernières années ont été marquées en transplantation par la découverte de l'importance du rejet humoral lié aux anticorps anti-HLA dirigés contre le greffon. En effet, le rejet chronique humoral est considéré par de nombreux auteurs comme la première cause de perte de fonction tardive (262–264). Ces progrès ont été réalisés grâce à la reconnaissance des signes histologiques caractéristiques du rejet humoral, dont le marquage C4d, et à l'avènement de techniques de détection des anticorps anti-HLA dites de phase solide (comme le Luminex) qui ont permis de relier présence de DSA, lésions histologiques, et dysfonction du greffon.

Néanmoins les avancées thérapeutiques dans la prise en charge préventive ou curative des patients présentant un rejet humoral n'ont pas été aussi importantes que les avancées diagnostiques. L'identification des patients à risque de rejet humoral par des tests sensibles de détection des anticorps anti-HLA a certes permis de les faire accéder à la transplantation grâce à l'utilisation anticipée de protocoles de désensibilisation. Cependant, il n'existe pas de traitement préventif ou curatif ayant permis une diminution de l'incidence du rejet humoral, à l'instar de celle observée pour le rejet aigu cellulaire lors de l'introduction des inhibiteurs de la calcineurine dans les années 80. Or, c'est vers le rejet chronique qu'évoluent au bout de quelques années de greffe à la fois les patients qui ont pu être transplantés avec des DSA préformés et les patients qui vont développer des DSA *de novo*, probablement en raison d'une immunosuppression insuffisante.

Une des raisons de cet échec réside dans notre méconnaissance des mécanismes qui conduisent à la synthèse des anticorps anti-HLA, et particulièrement des cellules impliquées dans cette synthèse, qui constitueraient la cible d'un traitement efficace. Les protocoles immunosuppresseurs utilisés à l'heure actuelle sont des combinaisons de traitements agissant pour la plupart sur les lymphocytes T (globulines anti-thymocytaires, inhibiteurs de la calcineurine, inhibiteurs de la synthèse des purines, stéroïdes), en association avec des plasmaphérèses et/ou des immunoglobulines intraveineuses visant à éliminer/neutraliser transitoirement les anticorps anti-HLA. Ces protocoles font parfois appel à un traitement visant à éliminer les lymphocytes B (anticorps anti-CD20) ou les plasmocytes (inhibiteurs du protéasome). Il a récemment été proposé l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le fragment C5 du complément, l'eculizumab – actuellement en cours d'évaluation dans des

essais cliniques en transplantation rénale – dans le but de bloquer la formation du complexe d'attaque membranaire, soit la partie la plus terminale de l'effet des anticorps anti-HLA, au bout de la chaîne d'évènements qui débute par l'immunisation d'un individu lors du contact avec les antigènes HLA.

Au sein de cet arsenal, c'est l'utilisation de traitements ciblant les lymphocytes B qui paraît la plus logique, avec deux grandes cibles potentielles : le lymphocyte B mémoire et le plasmocyte. La principale propriété du lymphocyte B mémoire – cellule sentinelle – est de se différencier en cellules sécrétant des anticorps lors d'un contact de rappel avec l'antigène. La fonction du plasmocyte, notamment médullaire à longue durée de vie, est de maintenir un taux constant et durable d'anticorps, indépendamment de la présence de l'antigène. Cette vision dichotomique dérivée des connaissances sur l'immunité humorale anti-infectieuse est probablement limitative et n'a pas été explorée dans le domaine de la transplantation. C'est l'objectif de la seconde partie de notre travail que d'essayer d'appréhender le rôle des lymphocytes B mémoire dans la synthèse des anticorps anti-HLA.

Aucun des deux traitements proposés ciblant l'un les lymphocytes B matures, et l'autre les plasmocytes n'a fait la preuve de son efficacité. Le seul essai contrôlé dans le traitement du rejet humoral concernait l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-CD20 rituximab dans le traitement curatif du rejet aigu humoral. Alors que ce traitement était devenu d'utilisation courante dans cette indication, basé sur de rares expériences monocentriques rétrospectives, l'essai RITUXERAH vient de révéler l'inefficacité de l'anticorps en traitement curatif du rejet (267). Pourtant ce traitement permet d'obtenir une déplétion profonde et durable des lymphocytes B matures circulants mais aussi dans les organes lymphoïdes secondaires (268). Les expériences avec le bortezomib, un inhibiteur du protéasome induisant l'apoptose des plasmocytes, sont très hétérogènes dans les indications (désensibilisation pré-greffe et post-greffe, traitement du rejet aigu ou du rejet chronique) et le mode d'utilisation, et montrent au mieux un effet partiel (269–271).

Il apparaît donc essentiel, dans l'objectif de déterminer un traitant anti-B efficace, d'identifier au mieux le ou les populations lymphocytaires B impliquées dans la synthèse des anticorps anti-HLA et dans le rejet humoral. De plus, il est important de distinguer les situations cliniques différentes où ce traitement pourrait être utilisé, car elles correspondent à des réponses immunitaires humorales probablement différentes. En effet, on distingue:

- la désensibilisation pré-greffe visant à éliminer ou diminuer le titre des anticorps anti-HLA chez un sujet immunisé. La présence de l'antigène durant cette phase est probablement inconstante, lorsque notamment un greffon préalable non fonctionnel a été retiré. La cinétique de variation du titre des anticorps est lente durant cette phase.

- la période post-greffe chez un sujet préalablement immunisé. Le but du traitement est ici de prévenir ou contrôler une réaction de rappel, lors du nouveau contact avec l'antigène, et ainsi de contrôler le rebond du titre des DSA.
- la période post-transplantation chez un sujet non immunisé. Ici, la réponse immunitaire qui conduira à la synthèse des anticorps anti-HLA est une réponse primaire qui fait suite à un premier contact avec l'antigène.

Nous nous sommes intéressés, dans les travaux présentés ici, à l'étude des lymphocytes B en relation avec la synthèse des anticorps anti-HLA durant la période pré-transplantation. Nos travaux s'articulent en deux parties :

- la compréhension des phénomènes favorisant l'initiation de la réponse allo-immune au cours d'un événement immunisant. Nous avons cherché à savoir notamment si les différentes sous-populations lymphocytaires B périphériques et la principale cytokine régulant l'homéostasie des lymphocytes B périphériques, c'est à dire BAFF, étaient liées à l'immunisation anti-HLA avant transplantation.
- le rôle des lymphocytes B mémoire dans le maintien de l'allo-immunité humorale, c'est-à-dire la persistance au long cours des anticorps anti-HLA chez les patients immunisés avant transplantation.

Définition de l'immunisation anti-HLA à l'ère du Luminex ®

Avant de détailler ces deux parties, il paraît important de discuter la définition actuelle de l'immunisation anti-HLA. En effet, l'utilisation de techniques très sensibles, dites de phase solide de détection des anticorps anti-HLA, en particulier le Luminex®, a rendu difficile la définition actuelle de l'immunisation anti-HLA. A l'ère de la lymphocytoxicité (LCT), la définition de l'immunisation correspondait simplement à la présence d'anticorps anti-HLA déterminée par le taux de PRA (Panel Reactive Antibody). Il s'agissait d'une circonstance rare, particulièrement chez les receveurs de premières et même de secondes transplantations. Le haut risque immunologique concernait un nombre minime de patients, ayant eu un ou deux échecs de greffe d'origine immunologique, souvent combinés à des grossesses et/ou des transfusions sanguines multiples. Seuls ces patients recevaient alors un traitement immunosuppresseur plus puissant. Actuellement, le Luminex® est devenu dans beaucoup de pays, mais pas tous, la technique de référence pour la recherche des anticorps anti-HLA avant transplantation, la LCT étant parfois abandonnée. D'autres au contraire pensent que le Luminex®, par son excès de sensibilité, conduit à considérer un trop grand nombre de patients comme à risque de rejet humoral, et le réservent au contraire à la détermination des

antigènes permis (c'est à dire les antigènes négatifs par Luminex®) chez des patients hyperimmunisés, tels que définis par la LCT.

En effet, l'analyse de l'immunisation de notre cohorte de 100 patients non sélectionnés admis consécutivement pour une transplantation rénale montre qu'en choisissant un seuil de MFI inférieur à 1000, reconnu comme techniquement significatif (131), 83% des patients sont considérés comme immunisés. Parmi ces patients, 30% n'ont pas d'antécédent d'événement immunisant conventionnel. Les caractéristiques de ces patients et de ces anticorps particuliers sont discutées plus loin et font l'objet d'une publication présentée en annexe 2. En augmentant le seuil de MFI à 3000 – seuil qui, appliqué aux DSA est associé à une diminution de la survie du greffon et à une augmentation significative du risque de rejet aigu humoral (265) – la fréquence de l'immunisation anti-HLA est de 50% dans notre étude. Ce seuil de 3000 est le plus souvent associé à une réaction de LCT négative. Des fréquences similaires sont retrouvées par d'autres équipes (265,272). Dans une étude récente portant sur une liste d'attente de 500 patients, la fréquence de l'immunisation est de 81% par Luminex (seuil à 1000), de 14% par ELISA et 5% par LCT (272).

On mesure ainsi la différence de sensibilité entre les techniques. Il ne fait pas de doute que le Luminex® seul permet de détecter des DSA de titres faibles à modérés associés à un risque de rejet humoral. Une méta-analyse récente a conclu que des DSA détectés uniquement par Luminex® étaient associés à une augmentation de 100% du risque de rejet aigu humoral et de 76% d'échec de greffe (266).

Mais par ailleurs, l'excès de sensibilité de la technique se traduit par une mauvaise valeur prédictive positive de la survenue du rejet aigu humoral chez les patients porteurs de DSA (35% en prenant en considération la MFI au pic avant transplantation) (265). Cette mauvaise valeur prédictive conduit vraisemblablement à traiter par excès avec un protocole immunosuppresseur lourd des patients dont le risque de rejet humoral est en réalité faible. La recherche d'un seuil universel de MFI est vaine, d'une part du fait de la moyenne reproductibilité inter-laboratoire des résultats du Luminex® malgré des efforts récents de standardisation (131) et, d'autre part, parce que la MFI est un continuum dont l'augmentation progressive, dès les plus faibles scores, est associée à une augmentation parallèle du risque de rejet aigu humoral (265).

Des efforts doivent donc être faits pour améliorer la valeur prédictive de ces techniques. Ainsi, une étude française évaluant le couplage de la technique Luminex® à la détection de la fixation du C1q par l'anticorps, a montré que les patients développant en post-transplantation des DSA $C1q^+$ ont un risque relatif de perte de greffon de 4.8, indépendamment de la valeur de la MFI par la technique Luminex® habituelle (273). Les premiers résultats montrent qu'il

existe également une augmentation du risque de perte de greffon lorsque ces anticorps sont présents à J0, mais bien moindre qu'en post-transplantation. Cette technique permet donc d'améliorer la valeur prédictive des DSA au moins après transplantation probablement en identifiant les anticorps les plus pathogènes, par leur capacité à fixer le complément.
Le Luminex® a donc permis de prendre la mesure de la fréquence de l'immunisation anti-HLA à un niveau inattendu, ce qui amène à reconsidérer l'influence des évènements immunisants sur le développement des anticorps anti-HLA. Parallèlement, les études de population menées avec le Luminex® ont totalement recentré le caractère pathogène des anticorps anti-HLA sur les DSA dans la mesure où la présence d'anticorps anti-HLA non dirigés contre le donneur n'a plus d'impact sur la survie du greffon (265), comme ceci était le cas avec la LCT. Une hypothèse était que les patients immunisés en LCT qui avaient une moins bonne survie ou un risque de rejet humoral avaient des DSA dont le titre était en dessous du seuil de détection de la technique, qui auraient été mis en évidence par le Luminex® si la technique avait été disponible.

Rôle des voies d'exposition aux alloantigènes dans l'initiation de la réponse humorale allo-immune : importance de l'exposition à l'antigène

La première étape de la synthèse des anticorps anti-HLA réside dans le contact entre l'antigène HLA et le lymphocyte B naïf dans les organes lymphoïdes secondaires. Les trois voies d'exposition aux alloantigènes sont les transplantations, les grossesses et les transfusions sanguines. L'allo-immunisation vis-à-vis des molécules du HLA n'est pas associée à un "fort taux de réussite". En d'autres termes l'exposition à un alloantigène ne conduit pas systématiquement, comme on peut le voir au cours de certaines infections ou vaccinations, au développement d'anticorps spécifiques. La répétition des expositions aux alloantigènes augmente les chances pour un individu de s'immuniser et ainsi de développer des anticorps anti-HLA. Ainsi, l'incidence des anticorps anti-HLA liés aux grossesses augmente avec le nombre de grossesse de 11% (une grossesse) à 32% (4 grossesses et plus) (163). De façon similaire, les transfusions sanguines (169,170,274) induisent rarement une réponse humorale chez les sujets naïfs. A l'opposé, chez les sujets préalablement immunisés (175), les transfusions induisent par une probable réponse immune secondaire une augmentation du titre et de la diversité des anticorps anti-HLA (275). Le recours à des transfusions massives peut conduire de façon similaire à une forte allo-immunisation (176). Concernant les transplantations, un greffon est évidemment une source massive et durable d'alloantigènes, mais dont l'effet est contrôlé par le traitement immunosuppresseur, ce qui n'est pas le cas des

grossesses et des transfusions. Le nombre de transplantations augmente bien sur le risque de développer des alloanticorps. Pour les transplantations, la durée d'exposition probablement rapportée aux modulations d'intensité du traitement immunosuppresseur, est un facteur important dans la mesure où l'incidence des DSA *de novo* augmente avec le délai post-transplantation et est favorisée par une mauvaise observance du traitement immunosuppresseur.

On voit donc que l'exposition à l'alloantigène recouvre plusieurs caractéristiques que sont la quantité d'alloantigènes présentée à l'hôte (greffon *versus* concentrés érythrocytaires), la répétition des immunisations avec le même alloantigène (grossesses multiples, mismatches répétés lors des retransplantations), et la durée d'exposition (transplantation, chimérisme durable foeto-maternel). Le premier effet d'une forte exposition à l'alloantigène, par l'une des voies évoquées, est vraisemblablement d'augmenter la probabilité du contact entre l'antigène et le lymphocyte B naïf spécifique et ainsi d'initier la réponse humorale primaire. Il existe de plus une notion qui est spécifique à la greffe et qui est le degré d'incompatibilité existant entre le greffon et l'hôte. Longtemps limitée au nombre d'incompatibilités HLA, l'appréciation du degré d'incompatibilité peut désormais être sensiblement augmentée grâce à la comparaison des séquences d'acides aminés des molécules HLA, par exemple à l'aide du logiciel HLAMatchmaker (114). Ainsi, pour une incompatibilité antigénique HLA portée par un donneur, différents receveurs, selon leur degré de différences structurelles avec les molécules HLA du donneur, pourront avoir un nombre variable d'eplets incompatibles. Cette « charge épitopique » conditionne le risque de développer des anticorps anti-HLA et un rejet humoral. Il a été ainsi bien montré que les transplantations rénales incompatibles en termes d'antigène, mais avec une charge épitopique nulle, avaient la même survie que les transplantations sans incompatibilité (115). Il faut également distinguer l'antigénicité d'un épitope, c'est-à-dire sa capacité à être lié par un anticorps anti-HLA, et son immunogénicité, c'est-à-dire sa capacité à induire la synthèse d'anticorps anti-HLA spécifiques. Les épitopes n'ont ainsi pas tous la même immunogénicité et donc probablement pas la même importance clinique en transplantation. Il existe cependant probablement un lien entre charge épitopique et immunogénicité, le nombre d'eplets incompatibles ayant une valeur prédictive du développement d'anticorps après une grossesse ou une transplantation (116,117).

Dans notre premier article, l'analyse multivariée que nous avons réalisée (table 2 et SDC table 2) retrouve en effet que les grossesses et les transplantations – mais pas les transfusions – sont indépendamment associées à la présence et à la diversité des anticorps anti-HLA. Les transfusions ne constituent pas un facteur de risque dans notre analyse car elles existent

rarement dans notre cohorte en tant qu'événement immunisant isolé. De plus le nombre de transfusions n'a pas été pris en compte.

L'augmentation des lymphocytes B naïfs circulants et du niveau sérique de BAFF pourraient être favorables à l'initiation de la réponse immune anti-HLA

La première partie de nos travaux suggère que deux autres facteurs peuvent intervenir lors de l'initiation de la réponse humorale allo-immune : le phénotype des lymphocytes B circulants et les taux de BAFF. En effet, nous avons observé que la présence des anticorps anti-HLA avant transplantation, et leur niveau de diversité étaient associés à une augmentation de la proportion des lymphocytes B naïfs activés Bm2 aux dépens des autres populations mémoire (Bm5 et Bm1, ces derniers correspondant aux lymphocytes mémoire $CD27^+$ IgD^+). Mais nous avons également observé que la proportion des lymphocytes Bm2 le jour de la transplantation était associée au développement des anticorps anti-HLA après greffe. Notre travail apporte ainsi également une large étude phénotypique de patients insuffisants rénaux chroniques terminaux, qui nous a permis d'observer qu'il existe chez ces patients une lymphopénie B globale, comme d'autres études l'avaient mis en évidence (276,277), que les lymphocytes naïfs activés Bm2 représentent la principale population B circulante comme dans la population générale (216), et que les populations B mémoire (Bm1, Bm5) ainsi que les plasmablastes sont diminués, ce qui participe probablement à l'altération de leurs réponses humorales (278).

On pourrait s'attendre à une surreprésentation des populations mémoire en association à la présence d'anticorps anti-HLA avant transplantation. La proportion des lymphocytes B mémoire alloréactifs spécifiques d'un antigène donné est certes très faible (199). Un biais de différenciation vers les lymphocytes B mémoire, favorisant ainsi la synthèse prolongée des anticorps anti-HLA, aurait néanmoins pu être observé. Une telle anomalie de différenciation a bien été observée au cours du lupus érythémateux (232) avec une augmentation de la fréquence des lymphocytes B $CD27^+$ et des plasmablastes. C'est au cours d'une autre maladie auto-immune, le syndrome de Sjögren, qu'a été observée une augmentation de la proportion des lymphocytes naïfs activés Bm2 (212), associée à la production d'autoanticorps.

Un résultat important de notre étude est que cette association entre anticorps anti-HLA et augmentation des lymphocytes Bm2 n'a été décelée que chez les patients ayant un antécédent d'évènements immunisants conventionnels, 30% des patients de notre cohorte n'étant pas dans cette situation. Notre analyse multivariée a montré que les évènements immunisants (grossesse et transplantation) et les lymphocytes Bm2 (en proportion des lymphocytes B totaux et en valeur absolue) étaient deux facteurs indépendamment associés à la présence et à

la diversité des anticorps anti-HLA (Tables 2 et SDC2). Nous avons également montré qu'il n'y avait pas d'association directe entre la survenue d'un événement immunisant et le phénotype B (Table SDC1). Ainsi, la proportion de lymphocytes B naïfs pourrait être considérée comme un facteur favorisant la synthèse des anticorps anti-HLA. Les lymphocytes Bm2 constituent, avec les cellules transitionnelles en proportion très inférieure, le principal contingent de lymphocytes B activés circulants, alors que les lymphocytes B mémoire Bm1 et Bm5 sont des cellules au repos (212). Au cours d'un événement immunisant, l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B naïfs activés pourrait ainsi favoriser le contact avec l'antigène en augmentant le nombre de lymphocytes B circulant entre les organes lymphoïdes secondaires (1,2).

La baisse des lymphocytes B mémoire associée à cette augmentation des Bm2 pourrait être liée à l'existence d'un biais de différenciation vers les plasmocytes après la réaction de centre germinatif. Un tel mécanisme a été évoqué chez les patients porteurs d'un syndrome de Sjögren (212). De plus, ces patients présentent des autoanticorps, des facteurs rhumatoïdes et des anticorps anti-Ro, avec un faible degré de mutations somatiques, qui pourrait être expliqué par l'hyperactivation des lymphocytes B naïfs et une différenciation plus rapide en plasmocytes de faible affinité (279).

Nous avons également observé une association entre les concentrations sériques de BAFF d'une part, et la présence et la diversité des anticorps anti-HLA, chez les patients immunisés en attente de transplantation, d'autre part. Comme pour l'augmentation des lymphocytes Bm2 cette observation n'a été faite que chez les patients ayant présenté des évènements immunisants. BAFF est le principal facteur régulant l'homéostasie des lymphocytes B matures. Il permet la maturation des lymphocytes B et leur survie comme lymphocytes B périphériques. Mais il intervient également dans la sélection périphérique des clones autoréactifs. En effet, une fois que les lymphocytes B immatures ont quitté la moelle osseuse, leur devenir, s'ils rencontrent l'autoantigène dépend à la fois de la force du signal BCR mais aussi de la compétition vis-à-vis de BAFF avec les cellules non autoréactives. Ainsi, lorsque le niveau de BAFF est élevé dans une situation "d'espace libre" dans le pool lymphocytaire B (au cours d'une lymphopénie par exemple), la signalisation via le récepteur BAFF-R est maximale, et la sélection positive des clones autoréactifs via le BCR sera plus large (202). Au cours des maladies auto-immunes dont le lupus érythémateux (224) et le syndrome de Sjögren (222,223), BAFF est en excès. De plus, la lymphopénie B est une situation fréquente chez ces patients. L'excès de BAFF est donc renforcé par une diminution de la compétition pour BAFF pour aboutir à une plus large sélection des lymphocytes B autoréactifs.

L'insuffisance rénale chronique terminale réunit des conditions analogues à celles observées dans ces maladies auto-immunes. Le niveau sérique de BAFF y est plus élevé que dans la population générale (276), possiblement sous l'influence de l'état inflammatoire chronique rencontré au cours de l'insuffisance rénale chronique terminale et de la lymphopénie B, que d'autres auteurs et nous-même avons mis en évidence. Ces deux conditions augmentent donc la disponibilité de BAFF pour les lymphocytes B (276,277). Nous n'avons pas retrouvé de corrélation entre le niveau sérique de BAFF et le nombre de lymphocytes B. Ceci suggère que d'autres facteurs interviennent, dont possiblement l'état inflammatoire. On peut donc supposer que, en présence de l'alloantigène qui délivre un signal au BCR, une augmentation de la signalisation induite par BAFF sur son récepteur BAFF-R permet la sélection de clones B alloréactifs au stade transitionnel c'est à dire ayant récemment émigré de la moelle osseuse, de façon analogue à ce qui est observé pour la sélection des clones B autoréactifs. Ceci aurait pour conséquence une augmentation de la fréquence des lymphocytes B alloréactifs naïfs circulants et participerait, avec l'exposition à l'antigène et l'augmentation de la fréquence des lymphocytes B naïfs circulants, à augmenter les chances d'initier la réponse humorale allogénique, selon le schéma proposé figure 10.

Pour vérifier le caractère favorisant du pourcentage de lymphocytes Bm2 et du niveau de BAFF sur la synthèse des anticorps anti-HLA, il faudrait étudier ces deux facteurs chez des femmes enceintes lors de leur première grossesse. En effet, la grossesse constitue la situation d'allo-immunisation la plus « pure ». Il serait intéressant de suivre le phénotype B et le niveau de BAFF durant la grossesse, et de voir si les femmes qui développent des anticorps anti-HLA en général au 3ème trimestre ont bien un phénotype et un niveau de BAFF différents de ceux des femmes qui ne s'immunisent pas.

Rôle de BAFF après transplantation

Les conditions de ce modèle semblent pouvoir tout-à-fait être réunies dans la période post-transplantation, notamment lorsqu'une induction déplétive est utilisée. En effet, en transplantation rénale, trois traitements induisant une déplétion lymphocytaire B sont utilisés:

- le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, administré pour la prévention et le traitement du rejet humoral,
- l'alemtuzumab, un anticorps monoclonal anti-CD52, utilisé en traitement d'induction et entraînant une déplétion lymphocytaire T et B prolongée,
- et les globulines anti-thymocytaires (ATG), utilisées très couramment en induction en transplantation rénale, particulièrement chez les patients porteurs de DSA ou à haut risque de rejet humoral.

L'utilisation du rituximab (280) et de l'alemtuzumab (242) a été associée en transplantation rénale avec une augmentation très prolongée des niveaux sériques de BAFF lors de la reconstitution immunitaire. Cette observation est à interpréter dans le contexte des études montrant une augmentation du risque de rejet humoral et du développement de DSA chez les patients traités par alemtuzumab, mais principalement chez ceux ayant reçu une monothérapie par rapamycine (sirolimus) plutôt que par un inhibiteur de la calcineurine (240,241). Heidt et coll. ont étudié de façon précise le phénotype des lymphocytes B après induction par alemtuzumab (281). Lors de la reconstitution immunitaire, il existe une augmentation transitoire, maximale à 6 mois, des lymphocytes B transitionnels. Pour ces auteurs, les cellules transitionnelles $CD24^{hi}CD38^{hi}$ ont le phénotype caractéristique des lymphocytes B régulateurs, tel que décrit par Blair et coll. (282): $IgM^{hi}IgD^{hi}CD5^{+}CD10^{+}CD20^{+}CD27^{-}CD1d^{+}$. Néanmoins, la nature régulatrice de ces cellules transitionnelles ne peut être affirmée sur les seuls marqueurs de surface (283). Il manque des données sur les capacités de cette population à sécréter de l'IL-10 et à exercer des fonctions suppressives *in vitro* ou *in vivo*. La déplétion lymphocytaire induite par l'alemtuzumab est suivie d'une reconstitution immune qui ferait émerger une population de lymphocytes B ayant une fonction régulatrice protectrice, et susceptibles de protéger de la survenue d'un rejet humoral, voire de favoriser un état de tolérance opérationnelle. En effet, plusieurs études ont montré que l'état de tolérance opérationnelle du greffon était associée à une augmentation de lymphocytes B ayant un phénotype de cellules transitionnelles sécrétant de l'IL-10 (244–246). En accord avec cette hypothèse, Liu et coll. avaient montré qu'après une induction par ATG et rituximab, la survie d'une allogreffe de singe était augmentée chez les animaux dont la reconstitution s'accompagnait de l'émergence d'une large proportion de lymphocytes B immatures et transitionnels IgM^{+} maintenue de façon durable. A l'opposé, chez les singes rejetant leur allogreffe, cette population immature était remplacée par une population composée majoritairement de lymphocytes B matures IgG^{+} (284). La fonction régulatrice de ces cellules transitionnelles n'était pas étudiée. L'incidence augmentée de rejets humoraux observée après induction par alemtuzumab peut être expliquée par une immunosuppression insuffisante du fait de la rapamycine utilisée en monothérapie. Cependant, dans l'étude de Heidt et coll., les phénotypes des lymphocytes B circulants chez les patients traités par ciclosporine ou par rapamycine étaient tout-à-fait similaires (281).

Plusieurs données plaident en revanche pour un effet propice de la déplétion lymphocytaire B pour la sélection de clones auto- ou alloréactifs. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'utilisation de l'anticorps anti-CD20 rituximab dans le traitement des maladies auto-immunes

s'accompagne dans certains cas de la survenue de rechutes lors de la reconstitution immunitaire, associées à des taux élevés de BAFF circulant (238). En transplantation, l'utilisation du rituximab chez 20 enfants transplantés rénaux, administré pour traiter des rejets aigus comportant un infiltrat lymphocytaire $CD20^+$ s'est accompagnée, durant le reconstitution, d'une élévation de la concentration sérique de BAFF, corrélée positivement à la MFI des DSA (285). Le lien entre le haut niveau de BAFF et la survenue d'épisodes de rejets pourrait être expliquée par une sélection positive à la périphérie de clones alloréactifs récemment issus de la moelle lors de la reconstitution immunitaire, favorisée par un niveau élevé de BAFF, à l'instar de ce qui observé pour la sélection des clones autoréactifs.

Au cours de notre étude complémentaire, portant sur l'évolution du phénotype lymphocytaire B après transplantation rénale présentée en annexe 1, nous avons constaté qu'à un an d'une induction par ATG, les patients avaient une augmentation de la concentration sérique de BAFF et du pourcentage de lymphocytes B transitionnels, comparés aux patients ayant reçu une induction par basiliximab, un anticorps anti-CD25 n'entraînant pas de déplétion lymphocytaire B (annexe 1). La petite taille de la population étudiée ne nous a pas permis d'observer un effet favorisant sur la survenue d'un rejet humoral ou sur la synthèse de DSA *de novo*. Une étude cinétique longitudinale du niveau de BAFF conduite sur une large population de patients à haut risque immunologique recevant une induction déplétant les lymphocytes B pourrait permettre de montrer si une augmentation de la concentration sérique de BAFF précède la survenue d'un épisode de rejet humoral, ou l'apparition d'alloanticorps. Il serait également intéressant d'isoler cette population de lymphocytes B transitionnels et de vérifier par des tests fonctionnels s'ils sécrètent de l'IL-10 et auraient ainsi un effet régulateur, ou au contraire s'ils comportent une population B alloréactive, mise en évidence par des tests de stimulation polyclonale, tels que nous les avons réalisés dans la seconde partie de notre travail. Dans l'attente de telles études, il n'est pas possible de conclure définitivement. Il faut tout de même noter une différence notable qui existe entre l'alemtuzumab et l'ATG. L'alemtuzumab induit une déplétion profonde et durable (au moins jusqu'à un an après le traitement) des lymphocytes B mémoire au profit des lymphocytes B naïfs (281). Après une induction par ATG, nous avons observé au contraire une baisse du nombre des lymphocytes B totaux mais dont le phénotype était similaire à celui de J0, c'est-à-dire avec une proportion similaire de lymphocytes B naïfs et mémoire. Ceci est une donnée importante dans le cadre d'une transplantation réalisée chez un sujet hautement immunisé vis-à-vis des molécules HLA, car l'alemtuzumab, et non l'ATG, permet probablement d'obtenir une élimination quasi-totale, du répertoire B alloréactif. L'apparition d'anticorps spécifiques du donneur dans ce

contexte ne peut s'expliquer que par une réponse humorale primaire qui suppose la présence de clones alloréactifs nouvellement sélectionnés.

Ces données, si elles étaient vérifiées par l'étude cinétique proposée, suggèreraient de cibler BAFF durant les phases de reconstitution immune après utilisation d'alemtuzumab, d'ATG, voire de rituximab, pour bloquer le rôle de BAFF sur la sélection des clones alloréactifs. L'anticorps monoclonal anti-BAFF, belimumab, employé dans plusieurs pathologies auto-immunes, dont le lupus erythémateux (286), pourrait être utilisé dans cette indication.

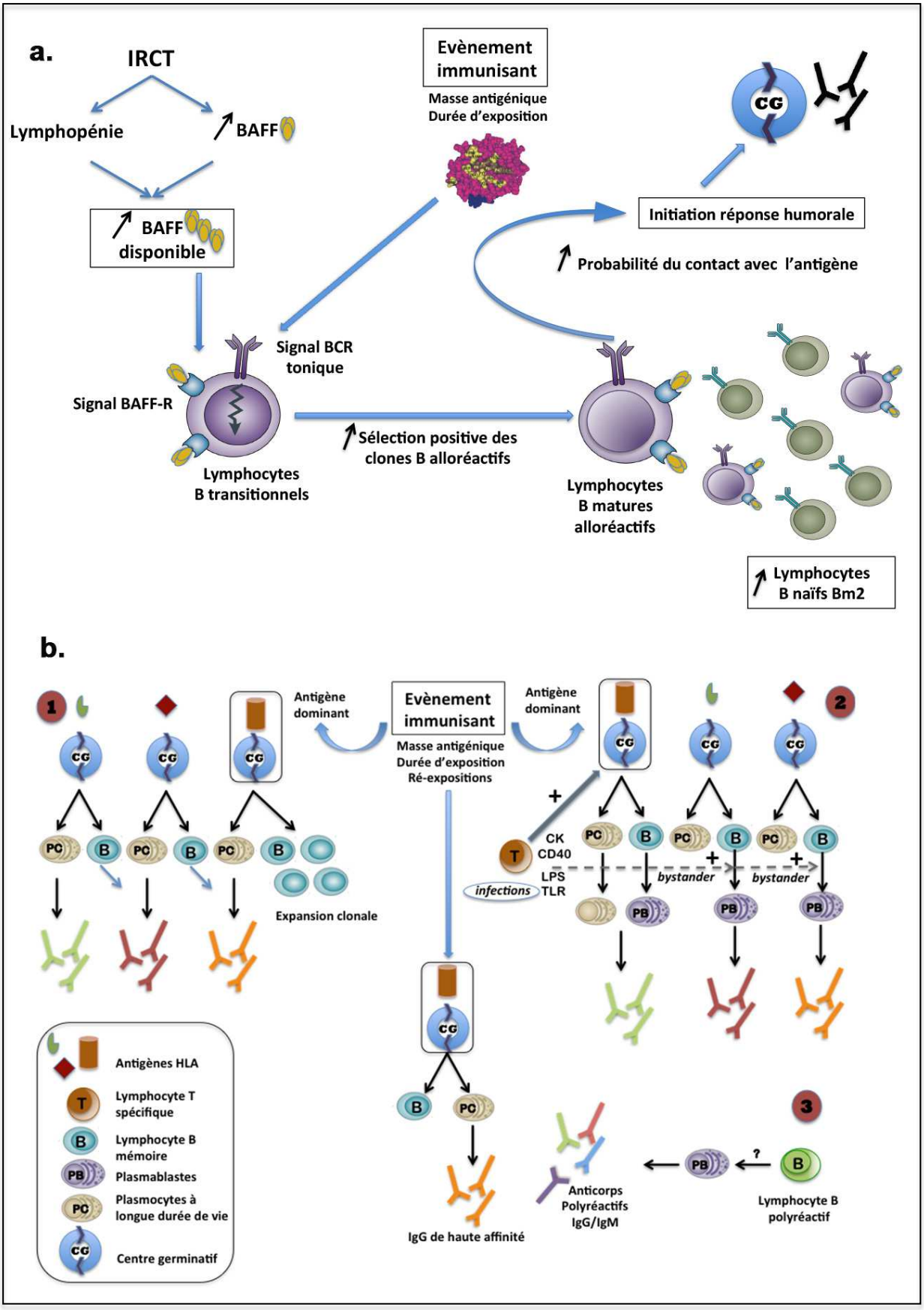
Légende de la figure 10 (page suivante)

a) Initiation de la réponse humorale alloréactive. Dans ce modèle, BAFF et l'exposition à l'alloantigène, en délivrant respectivement un signal BAFF-R et un signal BCR, permettent la sélection positive de clones alloréactifs. Un niveau élevé de BAFF et une augmentation des lymphocytes B naïfs circulants pourraient faciliter chez certains sujets le développement d'anticorps anti-HLA en réponse à un événement immunisant. En effet, ces deux facteurs pourraient augmenter la proportion de lymphocytes B naïfs circulants alloréactifs et augmenter la probabilité du contact avec l'alloantigène, donc de l'initiation de la réponse immune T dépendante.

b) Trois mécanismes possibles du maintien de la mémoire humorale alloréactive. Trois hypothèses peuvent être faites pour expliquer le maintien et la polyspécificité des alloanticorps détectés dans le sérum de sujets immunisés. (1) L'individu est exposé au cours de sa vie à plusieurs alloantigènes ce qui génère plusieurs réactions de centre germinatifs aboutissant à la synthèse par les plasmocytes à longue durée de vie d'anticorps ciblant plusieurs antigènes partageant les épitopes à l'origine de la réaction immune. Au cours de cette réponse, la collaboration se fait avec des lymphocytes T spécifiques de chaque antigène. Un ou plusieurs antigènes « dominants » sont associés à l'expansion clonale de lymphocytes B mémoire spécifiques qui restent détectables en périphérie. (2) Les contacts successifs avec un antigène dominant génèrent une réponse T auxiliaire spécifique (cytokines/CD40L) vis-à-vis des lymphocytes B spécifiques ce qui aboutit à la synthèse d'anticorps de haute affinité. Par un effet bystander, cette aide T pourrait induire la différenciation de divers lymphocytes B mémoire allogéniques en plasmocytes spécifiques d'autres antigènes, en l'absence de l'antigène. Cette activation bystander pourrait expliquer la détection d'alloanticorps de spécificités variées, alors que seul le clone de lymphocytes B activés par l'antigène est à une fréquence suffisante pour être détecté. (3) Là encore, l'antigène dominant est à l'origine d'une réaction de immune aboutissant à la synthèse d'anticorps de haute affinité par les plasmocytes. En parallèle, des lymphocytes B polyréactifs, sous l'effet de stimulus inflammatoires (par exemple la présence d'un greffon en rejet chronique), se différencient en plasmablastes et synthétisent des anticorps polyréactifs (allo et autoréactifs) d'isotype IgM ou IgG, dits « naturels » car non déterminés par un contact antigénique spécifique.

Abréviations : IRCT, insuffisance rénale chronique terminale ; CG : centre germinatif.

Figure 10. Initiation et maintien de la mémoire humorale alloréactive avant transplantation



Les lymphocytes B mémoire alloréactifs constituent une population à longue durée de vie

La seconde partie de notre travail a concerné l'étude des lymphocytes B mémoire en relation avec l'immunisation anti-HLA chez les patients en attente de transplantation. Leur détection a été basée sur un test de stimulation polyclonale des lymphocytes B totaux circulants induisant *in vitro* leur différenciation en plasmocytes. La détection d'anticorps anti-HLA dans le surnageant des cultures signait la présence lymphocytes B mémoire alloréactifs circulants. En effet, *in vitro*, les lymphocytes B humains mémoire, contrairement aux lymphocytes B naïfs, se différencient en plasmocytes en présence de l'oligonucléotide CpG, un agoniste des TLR-9, et de différentes cytokines, et de façon indépendante de la stimulation par le BCR (53).

Ces lymphocytes B mémoire étaient détectés chez des patients immunisés de nombreuses années après un événement immunisant. Le seul événement qui pouvait être daté avec précision étant une transplantation rénale préalable, nous avons pu détecter dans le surnageant de culture des lymphocytes B des anticorps ciblant les antigènes d'histocompatibilité des transplantations préalables chez tous les patients retransplantés pour lesquels le typage du donneur était disponible. Le délai qui séparait la transplantation du test était compris entre 6 ans et 32 ans, ce qui montre la durée de vie prolongée de ces lymphocytes B mémoire alloréactifs. Ces lymphocytes B mémoire alloréactifs constituent donc une population à longue durée de vie, comme ce qui a également été montré vis-à-vis de certains agents infectieux. Dans l'étude de Mamani-Matsuda et coll. des lymphocytes B mémoire spécifiques de la vaccine ont été retrouvés dans le sang et majoritairement dans la rate plusieurs décennies après une vaccination anti-variolique (37).

La persistance de l'antigène HLA ne semble pas être un facteur nécessaire pour la survie prolongée des lymphocytes B mémoire alloréactifs

Quatre patients avaient été détransplantés du greffon vis-à-vis duquel ils ont développé des lymphocytes B mémoire, et 6 autres patients n'avaient comme événement immunisant qu'une grossesse associée ou non à des transfusions. La détransplantation du greffon précédent a même été réalisée un peu plus fréquemment chez les patients présentant des lymphocytes B mémoire circulants que chez les patients n'en présentant pas (Article 2, Table 2). La procédure de détransplantation pourrait même constituer en soi un événement immunisant, comme cela a été évoqué dans les études retrouvant une fréquence d'immunisation anti-HLA supérieure chez les patients détransplantés après un échec de greffe (287). Cependant, si la présence de l'antigène est évidente lorsque le greffon antérieur est encore en place, il n'est pas évident que l'antigène soit définitivement absent de l'organisme à distance d'un détransplantation, d'une transfusion et d'une grossesse. En effet, alors que le plus souvent, les

anticorps qui apparaissent au cours d'une grossesse disparaissent à distance de l'accouchement ils peuvent chez certaines femmes, persister pendant plusieurs années (164). Le mécanisme de cette persistance des anticorps serait le microchimérisme constitué par la persistance de cellules fœto-paternelles chez la mère (165). De même, un microchimérisme des cellules du donneur est détecté chez les receveurs de tous types de transplantations d'organe, mais avec une tendance à la diminution à distance de la greffe (288,289). La question reste posée de savoir si ces deux phénomènes sont suffisants pour induire une stimulation antigénique durable à l'origine d'une réaction de centre germinatif chronique, comme on peut l'observer au cours des réactions auto-immunes. Dans l'étude de Sivasai et coll., le microchimérisme est détecté trois ans au moins après les trois types d'évènements immunisants, y compris chez des hommes seulement transfusés (166). Ce microchimérisme a été détecté chez 66% des patients immunisés *versus* 25% des patients non immunisés en lymphocytotoxicité (p=0.07). Le microchimérisme précédant la transplantation pourrait donc être impliqué, à la suite d'un événement immunisant, dans le maintien du taux des anticorps anti-HLA.

Concernant l'effet du microchimérisme sur l'évolution des transplantations d'organe, les données sont controversées dans la littérature. Certaines études ont montré que la détection du microchimérisme après transplantation était associée à une augmentation de la survie du greffon et à une diminution des épisodes de rejet aigu, en accord avec de nombreux modèles expérimentaux (289). Cependant les études les plus récentes conduites avec les protocoles immunosuppresseurs actuels retrouvent au contraire une association entre microchimérisme post-transplantation et augmentation du risque de rejet pour tous les organes, à l'exception du foie (290). A l'opposé et par analogie avec les patients en attente de transplantation de notre étude, dans l'étude de Joo et coll., l'effet du microchimérisme détecté avant transplantation (dans 20% des cas) a récemment été associé à une réduction du risque de rejet aigu (291). Cette dernière étude ne comportait pas d'analyse de l'immunisation anti-HLA et ne précisait pas le type de rejet aigu qui était observé chez les patients porteurs ou non d'un microchimérisme. Cependant, cet effet bénéfique associé au microchimérisme est en contradiction avec un effet favorisant la synthèse des anticorps anti-HLA.

En conclusion le microchimérisme pourrait théoriquement constituer une source d'antigène prolongée capable de stimuler de façon chronique les lymphocytes B mémoire. Cependant, il paraît peu probable, compte tenu des fluctuations du microchimérisme dans le temps, qu'il puisse être responsable d'une stimulation aussi prolongée. De plus, aucune étude n'a à ce jour corrélé formellement les antigènes du donneur ainsi exprimés chez le receveur et la spécificité des anticorps anti-HLA.

Cette question de la persistance de l'antigène est importante car elle permet d'expliquer la survie très prolongée de certains lymphocytes B mémoire, comme celle observée dans notre étude. Les données expérimentales sont controversées, certains travaux montrant que la présence de l'antigène n'est pas nécessaire à la survie des lymphocytes B mémoire (41,42), d'autres au contraire que l'expression d'un BCR fonctionnel permettant la présentation de l'antigène au lymphocyte B par les CFD était indispensable aux réponses secondaires (43,44). Cependant, il existe des situations chez l'homme où la persistance des lymphocytes B mémoire n'est pas associée de façon certaine à la présence de l'antigène, comme c'est le cas des décennies après une vaccination anti-variolique (37). Concernant le microchimérisme, il serait intéressant de réaliser de nouvelles études corrélant la spécificité des antigène du donneur détectés chez le receveur avant transplantation, et la spécificité des anticorps anti-HLA présents dans le sérum de façon concomitante. Ceci permettrait d'étayer un lien de causalité entre microchimérisme et immunisation anti-HLA en l'absence apparente de l'antigène.

Deux contingents cellulaires indépendants sont impliqués dans la réponse mémoire humorale allo-immune, la fréquence des lymphocytes B mémoire alloréactifs étant liée à l'exposition à l'alloantigène

La comparaison des spécificités des anticorps anti-HLA présents dans le sérum et dans le surnageant de culture (Article 2 - Tableau 3), ces dernières reflétant la spécificité des lymphocytes B mémoire, sont en faveur de deux bras indépendants de la réponse humorale allo-immune. En effet, les spécificités antigéniques HLA des anticorps sériques sont significativement plus nombreuses que celles des surnageants, qui sont, pour la majorité, également présentes dans le sérum. En étudiant les sérums des patients ayant subi une retransplantation, ce qui permet de cerner l'influence de l'antigène, avec le logiciel HLAMatchmaker qui permet de préciser la spécificité épitopique des anticorps anti-HLA, nous avons observé que l'incompatibilité du greffon antérieur est toujours ciblée par les anticorps présents dans le surnageant (et dans le sérum). A l'échelon épitopique, l'incompatibilité épitopique exprimée par le greffon antérieur est le plus souvent le seul épitope reconnu ou est associé à un faible nombre d'autres épitopes. De plus, on retrouve également chez plusieurs patientes immunisées à la suite une grossesse - avec ou sans transfusion - un ou deux épitopes ciblés dans le surnageant, dont on peut faire l'hypothèse qu'ils correspondent à l'exposition foetopaternelle. Par comparaison, la réactivité des anticorps sériques est beaucoup plus large et comporte les DSA spécifiques du premier

greffon, en plus de nombreux anticorps non spécifiques. Néanmoins, il faut signaler deux limitations relatives à cette dernière interprétation :

1) les patients transplantés avaient également été exposés à des alloantigènes via des grossesses et/ou des transfusions, qui peuvent expliquer la présence d'autres alloanticorps ;

2) l'analyse par HLAMatchmaker des spécificités présentes dans le sérum montre qu'à l'échelon des épitopes, le nombre de spécificité est souvent bien moindre que celui des spécificités antigéniques du fait des épitopes partagés.

On peut néanmoins dégager de nos résultats deux conclusions importantes:

1) **Les lymphocytes B mémoire alloréactifs n'ont été détectés que chez des sujets présentant plusieurs évènements immunisants** (Tableau 2 et Figure 3). En effet, aucun patient du groupe 2, c'est-à-dire les patients présentant des anticorps anti-HLA en l'absence d'événement immunisant, n'avait de lymphocyte B mémoire alloréactifs détectables. L'origine de ces anticorps, qui font l'objet d'une publication présentée en annexe 2, n'est pas clairement établie et sera discutée plus loin. Néanmoins, l'immunisation ne provient pas du contact avec des antigènes HLA sous leur forme native, et on pourrait faire l'hypothèse que, compte tenu de leur titre et de leur diversité, en général faibles, l'exposition à l'antigène qui suscite une réaction croisée est d'intensité moindre que celle qui est observée chez des patients ayant subi une immunisation anti-HLA conventionnelle. De plus, parmi les patients du groupe 3, ceux qui avaient des lymphocytes B mémoire alloréactifs circulants avaient eu plus fréquemment des sources multiples d'immunisation (Figure 3 du 2nd article).

2) **Au sein des différents évènements immunisants, les antigènes portés par un greffon antérieur constituent la principale cible des lymphocytes B alloréactifs mémoire**. En effet, un antécédent de transplantation est retrouvé chez 12 des 19 patients ayant un surnageant positif. De plus, nous venons de voir que chez les patients ayant plusieurs évènements immunisants, les antigènes et épitopes du greffon sont les principales spécificités cibles des anticorps anti-HLA retrouvés dans les surnageants de culture.

On peut déduire de ces deux observations que la fréquence des lymphocytes B mémoire alloréactifs semble liée à l'exposition à l'alloantigène, qui regroupe la quantité d'antigènes exprimés, la durée d'exposition et la répétition de l'exposition. Ainsi les patients qui ont eu une exposition prolongée avec une forte « masse antigénique » sous la forme d'une transplantation rénale et des pré-sensibilisations ou ré-expositions sous la forme de grossesses et de transfusions ont initié une réponse immunitaire suivie d'une réaction de centre germinatif, qui a abouti à la formation de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes. La présence continue du greffon est vraisemblablement responsable d'une stimulation

antigénique chronique, à l'instar de ce qui est observé au cours des maladies auto-immunes, modulée par l'importance du traitement immunosuppresseur.

Plusieurs mécanismes peuvent être évoqués pour expliquer comment une stimulation antigénique chronique peut augmenter le pool et l'affinité des lymphocytes B mémoire :

- **des réactions répétées de centre germinatif,** après chaque réaction de rappel, comme cela a été rapporté avec certains antigènes notamment particulaires, qui pourraient être la continuation ou la ré-expansion d'une réaction de centre germinatif primaire (33,292). Ces réactions peuvent induire une expansion clonale accélérée des lymphocytes B mémoire et une différenciation rapide en plasmocytes de haute affinité.

- **l'exposition à l'antigène dans le cadre de la signalisation via les récepteurs Toll-like (TLR)**. Kasturi et coll. ont montré que l'immunisation de souris par des particules contenant à la fois l'antigène et des agonistes des TLR 4 et 7 induisait la formation de centres germinatifs ayant une longue persistance dans les organes lymphoïdes secondaires et une déviation de la différenciation des lymphocytes B vers un phénotype mémoire (293).

- **la néogénèse lymphoïde**, c'est-à-dire le développement de structures lymphoïdes dites « tertiaires » en dehors des organes lymphoïdes secondaires canoniques (294). En effet, il est fréquent d'observer, dans les organes qui expriment un antigène cible d'une réponse inflammatoire chronique, un infiltrat composé de lymphocytes T, B, plasmocytes, macrophages et cellules dendritiques, s'organiser anatomiquement et fonctionnellement en organe lymphoïde secondaire. Ces structures lymphoïdes ectopiques sont le siège de réactions de centre germinatif ayant les mêmes propriétés que celles développées dans les organes lymphoïdes secondaires, c'est-à-dire maturation d'affinité, commutation isotypique, et sélection. Elles aboutissent au développement de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes de haute affinité, et à la synthèse d'anticorps. Ce phénomène est observé dans de nombreuses maladies auto-immunes, avec l'activité desquelles il est corrélé, et également dans des greffons en situation de rejet chronique (295). Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi les épitopes portés par les greffons précédemment transplantés sont prédominants dans le surnageant de culture des lymphocytes B mémoire. En effet, les anticorps apparaissent dans les suites d'une transplantation, particulièrement lorsque celle-ci a été perdue de cause immunologique, c'est-à-dire à la suite d'un déséquilibre entre réponse allo-immune et contrôle de la réponse par le traitement immunosuppresseur. Ceci aboutit à une réaction inflammatoire chronique, au développement de structures lymphoïdes tertiaires spécifiques et ainsi à la génération d'un clone lymphocytaire B mémoire de grande taille**,** et de plasmocytes qui synthétisent *in situ* des alloanticorps spécifiques.

On pourrait donc proposer le modèle suivant **(figure 10 bas) :** au cours de la vie d'un individu, celui-ci est exposé à diverses reprises à des alloantigènes différents. Diverses réponses immunitaires sont ainsi initiées aboutissant à des réactions de centre germinatif, et à la génération de lymphocytes B mémoire et de plasmocytes. Ces plasmocytes s'établissent dans des niches et synthétisent pendant de longues périodes des anticorps anti-HLA ciblant les différents alloantigènes rencontrés. Les lymphocytes B mémoire voient leur fréquence diminuer avec le temps (32,33), probablement en dessous du seuil de détection de notre technique. Il faut rappeler que la fréquence à l'état basal d'un lymphocyte B mémoire alloréactif spécifique d'un antigène donné est très basse, comprise entre 1 et 150/million de lymphocyte B mémoire (199). Cependant, les lymphocytes B mémoire spécifiques d'un antigène porté par un greffon antérieur et qui a fait l'objet d'une réponse inflammatoire chronique, par les mécanismes évoqués plus haut, ont subi une expansion clonale qui explique la possibilité de les détecter grâce au test de culture *in vitro* que nous avons utilisé.

Le lien que nous observons entre la fréquence des évènements immunisants et la diversité des anticorps détectés dans le sérum peut certes être expliquée par une exposition à plusieurs alloantigènes HLA, ce qui par le jeu des épitopes partagés, peut conduire à augmenter de façon très importante le nombre de spécificités antigéniques présentes dans le sérum. On devrait alors avoir un nombre limité de ces eplets ciblés lors de l'analyse par HLAMatchmaker des anticorps du sérum. Cependant l'analyse du tableau 3 montre que certains patients ont un nombre très important de spécificités épitopiques ou de nombreuses spécificités antigéniques qui ne sont pas expliquées par des éplets partagés. Pour expliquer ces observations, on peut imaginer que les contacts successifs avec un antigène dominant, particulièrement celui porté par un transplant antérieurement greffé, génèrent une réponse T auxiliaire vis-à-vis des lymphocytes B spécifiques, comportant la sécrétion de cytokines et le signal CD40L/CD40. Par un effet bystander, cet effet auxiliaire ou herper T pourrait induire la différenciation de divers lymphocytes B mémoire allogéniques en plasmocytes, en l'absence de l'antigène. Cette activation bystander pourrait expliquer la détection d'alloanticorps de spécificités vairées, alors que seul le clone de lymphocytes B activé par l'antigène est à une fréquence suffisante pour être détecté par notre test de stimulation polyclonale. Les épisodes infectieux peuvent également induire une stimulation bystander des lymphocytes B mémoire, en l'absence de l'antigène, via la stimulation des TLR (53).

Enfin, une dernière hypothèse dans le cadre d'une réponse immune T-dépendante de type centre germinatif serait l'existence d'un seul bras impliqué dans la mémoire humorale allo-immune, celui des lymphocytes B mémoire. L'implication des lymphocytes B mémoire dans la synthèse de tous les anticorps détectés dans le sérum se ferait par le renouvellement

plasmocytaire induit par l'antigène ou une stimulation polyclonale. Ceci impliquerait dans le premier cas la persistance de tous les alloantigènes via un microchimérisme, ce qui paraît peu probable compte tenu de la fréquence (autour de 20%) et de la variabilité du microchimérisme rapportés dans la littérature. Dans le second cas, les titres d'anticorps anti-HLA présents dans le sérum dans notre étude devraient être directement corrélés à la fréquence des lymphocytes B mémoires. Or, nous n'avons pas observé que les spécificités présentes dans les surnageants de culture étaient les spécificités les plus souvent retrouvées dans le sérum.

Des lymphocytes B polyréactifs pourraient également être impliqués dans la synthèse des anticorps anti-HLA sériques.

Porcheray et coll. ont immortalisé par transformation induite par le virus d'Epstein Barr (EBV) les lymphocytes B issus d'un greffon explanté pour cause de rejet chronique (296). Parmi les 107 clones B issus de cette immortalisation, trois synthétisaient des anticorps anti-HLA spécifiques et non spécifiques du donneur, et sept des autoanticorps incluant des anticorps anti-DNA. Deux clones étaient communs et synthétisaient donc des anticorps polyréactifs, allo- et autoréactifs, à la fois d'isotype IgM et IgG. L'un des trois clones alloréactifs 4G10 avait les caractéristiques des lymphocytes B mémoire, dont l'expression de CD27 et la présence de mutations somatiques dans la région variable du gène des immunoglobulines, alors que pour les deux autres ces gènes étaient en conformation germinale. Ce clone 4G10 était retrouvé avec une fréquence augmentée dans le sang. Les anticorps allo- et autoréactifs synthétisés par le clone 4G10 étaient présents dans le sérum du patient, avec d'autres alloanticorps. Ceci suggère que ce clone, avec sa haute fréquence dans le sang, est impliqué dans la synthèse de ces anticorps. La détection d'autoanticorps est un phénomène connu au cours du rejet chronique humoral (297). L'hypothèse est que ces anticorps détectés au cours du rejet chronique humoral soient analogues aux anticorps polyréactifs IgM, tels que fréquemment mis en évidence chez les sujets sains (298). L'hypothèse de Porcheray et coll. est que ce clone polyréactif n'est pas isolé mais fait partie d'un groupe de plusieurs clones polyréactifs synthétisant des IgM, et qui, sous l'influence d'évènements infectieux induisant une signalisation via des TLR ou dans l'environnement inflammatoire du rejet chronique, seraient le siège d'une prolifération et d'une commutation isotypique.

Dans une autre étude du groupe de M. Nussenszweig, il a été montré qu'après l'élimination des lymphocytes B auto- et polyréactifs aux points de contrôle médullaire et périphérique, le répertoire des lymphocytes B pouvaient à nouveau s'enrichir de cellules polyréactives suite à des mutations somatiques durant des réactions de centre germinatif (299). Dans ce travail

réalisé chez des volontaires sains, la polyréactivité était surtout étudiée vis-à-vis d'autoantigènes et ne comportait pas d'étude de l'alloréactivité. Cependant, un tel mécanisme pourrait expliquer la présence d'alloanticorps d'isotype IgG non induits suite à un contact antigénique spécifique et expliquer ainsi le large profil de réactivité des anticorps dans le sérum des patients. Rapportée à notre étude cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi la spécificité des lymphocytes B mémoire est plus restreinte, conditionnée par un contact antigénique préalable, et pourquoi la réactivité des anticorps du sérum est plus large.

L'existence de ces lymphocytes B polyréactifs pourrait expliquer le développement d'anticorps anti-HLA "naturels".

L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer la présence d'anticorps anti-HLA chez des individus n'ayant pas d'antécédent d'événement immunisant conventionnel est l'existence d'une réaction croisée entre des antigènes infectieux ou des autoantigènes, et des antigènes HLA (184). Nous avons montré dans l'article présenté en annexe 2 que ces anticorps n'étaient pas isolés, avaient plusieurs spécificités, étaient détectables de façon durable et réagissaient bien contre des antigènes HLA sous leur forme native, tels qu'exposés à la surface des cellules. De plus, dans le contexte d'une transplantation rénale, ces anticorps sont pathogènes puisque lorsqu'ils sont dirigés contre des antigènes du greffon et sont présents avant la transplantation, ils peuvent être responsables d'épisodes de rejet aigu humoral.

L'existence d'une réactivité croisée entre des antigènes infectieux ou du soi et les antigènes du HLA rendrait impropre l'utilisation du terme « anticorps anti-HLA naturels » puisque ces anticorps se développeraient à la suite d'une réponse humorale immune conventionnelle, aboutissant à une réaction de centre germinatif générant des lymphocytes B mémoire, des plasmocytes et des anticorps d'isotype IgG. L'absence de détection de lymphocyte B mémoire dans le groupe 2 dans notre seconde étude serait alors expliquée par une fréquence faible de ces lymphocytes B mémoire, elle-même expliquée par une stimulation antigénique moins forte qu'au cours d'une immunisation avec des antigènes HLA. Ces anticorps sont en effet d'un titre et d'une diversité modérés, bien inférieurs à ceux des patients du groupe 3 porteurs de lymphocytes B circulants mémoires alloréactifs.

Mais on pourrait également faire l'hypothèse qu'il s'agit réellement d'anticorps naturels. Ces anticorps naturels sont définis comme des anticorps circulant chez des individus sains, et dont la synthèse n'est pas la conséquence d'une stimulation antigénique conventionnelle (300). Ils sont le plus souvent d'isotype IgM, codés par des gènes d'immunoglobuline en configuration germinale, c'est-à-dire n'ayant pas fait l'objet de mutations somatiques, et ont une polyréactivité et une faible affinité vis-à-vis notamment d'antigènes du soi. Nous venons de

voir au paragraphe précédent qu'ils peuvent aussi être d'isotype IgG par le fait d'une commutation isotypique déclenchée dans un contexte inflammatoire, et le siège de mutations somatiques sans qu'il y ait eu de contact avec l'antigène (296,299).

Nous comptons essayer d'approfondir l'origine de ces anticorps d'étiologie indéterminée en testant chez les patients qui en sont porteurs la présence d'IgM de même spécificité que les IgG, qui serait en faveur d'une origine naturelle de ces anticorps. De plus, nous souhaitons analyser avec le logiciel HLAMatchmaker la spécificité de ces anticorps. L'existence dune spécificité restreinte, c'est-à-dire que les anticorps présents chez ces patients seraient dirigés contre un ou deux épitopes partagés, serait en faveur d'anticorps immuns dirigés contre un épitope induisant une réactivité croisée. Au contraire de multiples spécificités HLA et la présence concomitante d'autoanticorps seraient en faveur d'une origine naturelle polyréactive de ces cellules.

L'observation d'anticorps polyréactifs pourrait expliquer ces spécificités multiples chez les patients du groupe 3 n'ayant pas de lymphocyte B mémoire détecté ou ceux ayant des lymphocytes B mémoire alloréactifs d'une spécificité plus restreinte, car différenciés à la suite d'une réaction immune conventionnelle vis-à-vis d'un alloantigène HLA.

Implications thérapeutiques des deux composantes de la mémoire humorale

La comparaison des profils d'alloanticorps présents dans le sang et les surnageants de culture des lymphocytes B mémoire alloréactifs suggère qu'il existe deux bras indépendants participant à la mémoire humorale allogénique. Parmi les hypothèses que nous avons évoquées dans le paragraphe précédent, l'une est la plus conforme au modèle évoqué le plus souvent dans le cadre de l'immunité infectieuse. Les plasmocytes à longue durée de vie alloréactifs sont présents dans la moelle, comme ceci a été montré (200) et synthétisent les alloanticorps de façon prolongée et indépendante de l'antigène. Ils reçoivent des signaux de survie de l'environnement médullaire et ne nécessitent pas de renouvellement par les lymphocytes B mémoire. Les lymphocytes B mémoire ont une évolution et une fréquence indépendantes des anticorps présents dans le sérum. Ils restent en sentinelles dans les organes lymphoïdes secondaires dans l'attente d'un nouveau contact avec l'antigène pour initier une réponse secondaire.

Cette hypothèse a une implication dans le choix des agents thérapeutiques utilisés dans la désenbilisation pré-transplantation. Son but est de diminuer le titre des anticorps anti-HLA chez des patients fortement immunisés en attente d'une greffe afin de leur permettre un accès à la transplantation avec un risque diminué de rejet humoral. Il existe deux stratégies à ce jour utilisées pour cette désensibilisation. D'une part l'utilisation de rituximab couplé aux

immunoglobulines intraveineuses (126,258) ou aux plasmaphérèses (255,256) pour éliminer les anticorps anti-HLA. Si cette stratégie permet l'accès de ces patients à la transplantation, la fréquence des rejets aigus dans certaines études peut être très élevée, jusqu'à 70% (126,255,256,258,301,302). L'autre stratégie est d'utiliser le seul agent actif sur les plasmocytes, un inhibiteur du protéasome, afin de diminuer les anticorps anti-HLA. Les études sont encore plus modestes et ne montrent pour l'instant qu'une effet partiel (303–305). Néanmoins, l'utilisation de ce médicament utilisé pour induire l'apoptose des plasmocytes tumoraux au cours du myélome doit être approfondie. Son efficacité pourrait n'être que partielle sur des plasmocytes non tumoraux dont la synthèse protéique, qui conditionne la sensibilité à l'inhibition du protéasome, est moindre que celle de plasmocytes tumoraux.

Nos résultats plaident pour une utilisation préférentielle d'un traitement ciblant les plasmocytes dans le cadre d'une désensibilisation avant transplantation. Le rituximab a probablement une place dans l'arsenal thérapeutique des transplantations à haut risque de rejet humoral, mais plus dans la prévention de la réponse immune secondaire au cours de laquelle les lymphocytes B mémoire jouent un rôle prépondérant.

CONCLUSION

L'étude des lymphocytes B reste un champ peu exploré pour comprendre les mécanismes de la réponse allo-immune chez l'homme. L'étude du compartiment B « périphérique » sanguin ne donne probablement qu'une vision partielle mais elle est le plus souvent la seule possible chez l'homme. Néanmoins, nous avons montré qu'en utilisant un procédé d'amplification et de différenciation *in vitro* nous avions accès à de précieuses informations sur la spécificité des lymphocytes B mémoire alloréactifs, dont la fréquence est pourtant très faible.

Afin d'approfondir nos connaissances sur l'initiation de la réponse allo-immune chez l'homme, nous souhaiterions poursuivre l'analyse du rôle des sous-populations lymphocytaires B et de BAFF au cours de la grossesse. Celle-ci constitue un « modèle » en temps réel d'allo-immunisation, non modifié par une immunosuppression liée à l'insuffisance rénale ou induite par des traitements, comme peut l'être la transplantation rénale. De plus, il faut probablement avoir une approche cinétique afin d'appréhender le rôle de BAFF et des lymphocytes B naïfs. L'isolement et l'étude des fonctions de ces derniers apportera des renseignements probablement utiles.

Un autre projet concerne l'étude des facteurs impliqués dans la pathogénicité des anticorps anti-HLA. L'avènement des techniques sensibles de détection nous a conduit à reconsidérer la fréquence très élevée de ces anticorps sans que nous soyons en mesure d'en appréhender leur caractère pathogène.

Nous avons discuté le fait que l'origine des anticorps anti-HLA survenant en l'absence de tout événement immunisant conventionnel restait mal connue. Or, ces anticorps sont probablement présents également chez des sujets ayant eu des évènements immunisants, sans qu'il soit possible de les distinguer des alloanticorps originels. La recherche d'autoanticorps et d'IgM associés serait un élément en faveur de leur nature polyréactive.

Par ailleurs, peu d'attention a été portée jusqu'ici sur les bases moléculaires de la structure des anticorps anti-HLA (clonalité, affinité) pouvant expliquer leur pathogénicité différentielle. Nous proposons dans un futur projet d'identifier les paramètres associés à cette pathogénicité des anticorps HLA. En pratique, une analyse comparative des caractéristiques moléculaires d'anticorps anti-HLA identifiés et purifiés à l'aide de molécules HLA recombinantes soit chez des patients « naïfs » (sans antécédent d'événement immunisant) soit chez des patients hautement sensibilisés (transplantations antérieures) est proposée. L'hétérogénéité

moléculaire des anticorps isolés sera analysée biochimiquement. Enfin, l'affinité des ces anticorps sera analysée par résonance plasmonique de surface. L'identification de caractéristiques moléculaires différentielles selon l'existence ou l'absence d'événements immunisants, et selon une évolution après transplantation favorable ou non, devrait aboutir à l'élaboration de critères permettant une meilleure évaluation du risque immunologique avant transplantation, et par suite une meilleure adaptation thérapeutique au risque individuel de rejet humoral.

Bibliographie

1. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. Nat Rev Immunol. 2011; 12: 24–34.
2. Von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nat Rev Immunol. 2003; 3: 867–78.
3. Gretz JE, Anderson AO, Shaw S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. Immunol Rev. 1997; 156: 11–24.
4. Nolte MA, Beliën JAM, Schadee-Eestermans I, et al. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. J Exp Med. 2003; 198: 505–12.
5. Weill J-C, Weller S, Reynaud C-A. Human marginal zone B cells. Annu Rev Immunol. 2009; 27: 267–85.
6. Balázs M, Martin F, Zhou T, Kearney J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. Immunity. 2002; 17: 341–52.
7. Roozendaal R, Mempel TR, Pitcher LA, et al. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. Immunity. 2009; 30: 264–76.
8. Pape KA, Catron DM, Itano AA, Jenkins MK. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. Immunity. 2007; 26: 491–502.
9. Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. Nat Immunol. 2007; 8: 992–1000.
10. Junt T, Moseman EA, Iannacone M, et al. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. Nature. 2007; 450: 110–4.
11. Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. Science. 1998; 281: 96–9.
12. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. Immunol Rev. 1980; 53: 29–59.
13. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. J Immunol. 1998; 160: 5273–9.

14. Qin D, Wu J, Vora KA, et al. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall response. J Immunol. 2000; 164: 6268–75.
15. Heyman B. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. Annu Rev Immunol. 2000; 18: 709–37.
16. MacLennan IC. Germinal centers. Annu Rev Immunol. 1994; 12: 117–39.
17. Qi H, Egen JG, Huang AYC, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. Science. 2006; 312: 1672–6.
18. Amigorena S, Drake JR, Webster P, Mellman I. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. Nature. 1994; 369: 113–20.
19. Gondré-Lewis TA, Moquin AE, Drake JR. Prolonged Antigen Persistence Within Nonterminal Late Endocytic Compartments of Antigen-Specific B Lymphocytes. J Immunol. 2001; 166: 6657–64.
20. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. J Exp Med. 2010; 207: 365–78.
21. Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. J Exp Med. 1991; 173: 1165–75.
22. Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. Annu Rev Immunol. 2008; 26: 261–92.
23. Reinhardt RL, Liang H-E, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. Nat Immunol. 2009; 10: 385–93.
24. Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. J Exp Med. 2006; 203: 1081–91.
25. Allen CDC, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. Immunity. 2007; 27: 190–202.
26. Daniel JA, Nussenzweig A. The AID-Induced DNA Damage Response in Chromatin. Mol Cell. 2013; 50: 309–21.
27. Chaudhuri J, Alt FW. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. Nat Rev Immunol. 2004; 4: 541–52.
28. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annu Rev Biochem. 2007; 76: 1–22.

29. Allen CDC, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. Science. 2007; 315: 528–31.
30. Thaunat O, Granja AG, Barral P, et al. Asymmetric Segregation of Polarized Antigen on B Cell Division Shapes Presentation Capacity. Science. 2012; 335: 475–9.
31. 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.
32. Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. Science. 2011; 331: 1203–7.
33. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. Nat Immunol. 2009; 10: 1292–9.
34. Aiba Y, Kometani K, Hamadate M, et al. Preferential localization of IgG memory B cells adjacent to contracted germinal centers. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 12192–7.
35. Fazilleau N, Eisenbraun MD, Malherbe L, et al. Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. Nat Immunol. 2007; 8: 753–61.
36. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, et al. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. Nat Rev Immunol. 2006; 6: 741–50.
37. Mamani-Matsuda M, Cosma A, Weller S, et al. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus–specific memory B cells. Blood. 2008; 111: 4653–9.
38. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. N Engl J Med. 2007; 357: 1903–15.
39. Gray D, Kumararatne DS, Lortan J, Khan M, MacLennan IC. Relation of intra-splenic migration of marginal zone B cells to antigen localization on follicular dendritic cells. Immunology. 1984; 52: 659–69.
40. Gray D, Skarvall H. B-cell memory is short-lived in the absence of antigen. Nature. 1988; 336: 70–3.
41. Maruyama M, Lam KP, Rajewsky K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. Nature. 2000; 407: 636–42.
42. Anderson SM, Hannum LG, Shlomchik MJ. Cutting edge: memory B cell survival and function in the absence of secreted antibody and immune complexes on follicular dendritic cells. J Immunol. 2006; 176: 4515–9.
43. Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. Immunol Rev. 2007; 219: 157–66.

44. Hikida M, Casola S, Takahashi N, et al. PLCγ2 is essential for formation and maintenance of memory B cells. J Exp Med. 2009; 206: 681–9.
45. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 231–64.
46. Benson MJ, Dillon SR, Castigli E, et al. Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL. J Immunol. 2008; 180: 3655–9.
47. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. J Exp Med. 2003; 197: 939–45.
48. Martinez-Gamboa L, Mei H, Loddenkemper C, et al. Role of the spleen in peripheral memory B-cell homeostasis in patients with autoimmune thrombocytopenia purpura. Clin Immunol. 2009; 130: 199–212.
49. Yoshida T, Mei H, Dörner T, et al. Memory B and memory plasma cells. Immunol Rev. 2010; 237: 117–39.
50. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Hartson L, et al. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. Immunity. 2006; 25: 643–54.
51. Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz JE, Carragher DM, et al. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. Immunity. 2009; 30: 731–43.
52. Manz RA, Thiel A, Radbruch A. Lifetime of plasma cells in the bone marrow. Nature. 1997; 388: 133–4.
53. Bernasconi NL, Traggiai E, Lanzavecchia A. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. Science. 2002; 298: 2199–202.
54. Ochsenbein AF, Pinschewer DD, Sierro S, Horvath E, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97: 13263.
55. Shimoda M, Li T, Pihkala JPS, Koni PA. Role of MHC class II on memory B cells in post-germinal center B cell homeostasis and memory response. J Immunol. 2006; 176: 2122–33.
56. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. J Immunol. 2006; 177: 5236–47.

57. Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. J Immunol. 2004; 173: 657–65.

58. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. Immunity. 1998; 8: 363–72.

59. Ahuja A, Anderson SM, Khalil A, Shlomchik MJ. Maintenance of the plasma cell pool is independent of memory B cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 4802–7.

60. Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JCW, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2003; 48: 2146–54.

61. Vallerskog T, Gunnarsson I, Widhe M, et al. Treatment with rituximab affects both the cellular and the humoral arm of the immune system in patients with SLE. Clin Immunol. 2007; 122: 62–74.

62. Alexander T, Thiel A, Rosen O, et al. Depletion of autoreactive immunologic memory followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory SLE induces long-term remission through de novo generation of a juvenile and tolerant immune system. Blood. 2009; 113: 214–23.

63. Ward SM, Phalora P, Bradshaw D, Leyendeckers H, Klenerman P. Direct ex vivo evaluation of long-lived protective antiviral memory B cell responses against hepatitis B virus. J Infect Dis. 2008; 198: 813–7.

64. Leyendeckers H, Odendahl M, Löhndorf A, et al. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. Eur J Immunol. 1999; 29: 1406–17.

65. Leyendeckers H, Voth E, Schicha H, Hunzelmann N, Banga P, Schmitz J. Frequent detection of thyroid peroxidase-specific IgG+ memory B cells in blood of patients with autoimmune thyroid disease. Eur J Immunol. 2002; 32: 3126–32.

66. Leyendeckers H, Tasanen K, Bruckner-Tuderman L, et al. Memory B cells specific for the NC16A domain of the 180 kDa bullous pemphigoid autoantigen can be detected in peripheral blood of bullous pemphigoid patients and induced in vitro to synthesize autoantibodies. J Invest Dermatol. 2003; 120: 372–8.

67. Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. Immunity. 2002; 16: 745–54.

68. Fagraeus A. Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. Nature. 1947; 159: 499.

69. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Lang JE, Heath V, Craddock CG. Immunoglobulin synthesis by human lymphoid tissues: normal bone marrow as a major site of IgG production. J Immunol. 1972; 109: 1386–94.

70. Smith KG, Hewitson TD, Nossal GJ, Tarlinton DM. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. Eur J Immunol. 1996; 26: 444–8.

71. Benner R, Meima F, van der Meulen GM, van Muiswinkel WB. Antibody formation in mouse bone marrow. I. Evidence for the development of plaque-forming cells in situ. Immunology. 1974; 26: 247–55.

72. Holt PG, Sedgwick JD, O'Leary C, Krska K, Leivers S. Long-lived IgE- and IgG-secreting cells in rodents manifesting persistent antibody responses. Cell Immunol. 1984; 89: 281–9.

73. Miller JJ 3rd, Cole LJ. Resistance of long-lived lymphocytes and plasma cells in rat lymph nodes to treatment with prednisone, cyclophosphamide, 6-mercaptopurine, and actinomycin D. J Exp Med. 1967; 126: 109–25.

74. Van Assen S, Holvast A, Benne CA, et al. Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. Arthritis Rheum. 2010; 62: 75–81.

75. Van der Kolk LE, Baars JW, Prins MH, van Oers MHJ. Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. Blood. 2002; 100: 2257–9.

76. Tourigny MR, Ursini-Siegel J, Lee H, et al. CDK Inhibitor p18-INK4c Is Required for the Generation of Functional Plasma Cells. Immunity. 2002; 17: 179–89.

77. Mei HE, Yoshida T, Sime W, et al. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. Blood. 2009; 113: 2461–9.

78. Brieva JA, Roldán E, De la Sen ML, Rodriguez C. Human in vivo-induced spontaneous IgG-secreting cells from tonsil, blood and bone marrow exhibit different phenotype and functional level of maturation. Immunology. 1991; 72: 580–3.

79. Sze DM, Toellner KM, García de Vinuesa C, Taylor DR, MacLennan IC. Intrinsic constraint on plasmablast growth and extrinsic limits of plasma cell survival. J Exp Med. 2000; 192: 813–21.

80. Hoyer BF, Moser K, Hauser AE, et al. Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice. J Exp Med. 2004; 199: 1577–84.

81. O'Connor BP, Cascalho M, Noelle RJ. Short-lived and long-lived bone marrow plasma cells are derived from a novel precursor population. J Exp Med. 2002; 195: 737–45.

82. DiLillo DJ, Hamaguchi Y, Ueda Y, et al. Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. J Immunol. 2008; 180: 361–71.

83. Scholz JL, Crowley JE, Tomayko MM, et al. BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 15517–22.

84. Belnoue E, Pihlgren M, McGaha TL, et al. APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells. Blood. 2008; 111: 2755–64.

85. Mantchev GT, Cortesão CS, Rebrovich M, Cascalho M, Bram RJ. TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens. J Immunol. 2007; 179: 2282–8.

86. Kabashima K, Haynes NM, Xu Y, et al. Plasma cell S1P1 expression determines secondary lymphoid organ retention versus bone marrow tropism. J Exp Med. 2006; 203: 2683–90.

87. Pabst O, Peters T, Czeloth N, Bernhardt G, Scharffetter-Kochanek K, Förster R. Cutting edge: egress of newly generated plasma cells from peripheral lymph nodes depends on beta 2 integrin. J Immunol. 2005; 174: 7492–5.

88. Wehrli N, Legler DF, Finke D, et al. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. Eur J Immunol. 2001; 31: 609–16.

89. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. Immunity. 2004; 20: 707–18.

90. Cassese G, Arce S, Hauser AE, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. J Immunol. 2003; 171: 1684–90.

91. Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing. J Exp Med. 1997; 186: 931–40.

92. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. Immunity. 2008; 29: 138–49.

93. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4+ T cell-B cell collaboration. J Immunol. 2007; 179: 5886–96.

94. Avery DT, Deenick EK, Ma CS, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. J Exp Med. 2010; 207: 155–71.

95. Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. J Immunol. 2002; 169: 4213–21.

96. Roldán E, García-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. J Exp Med. 1992; 175: 1739–47.

97. Medina F. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. Blood. 2002; 99: 2154–61.

98. Schaumann DHS, Tuischer J, Ebell W, Manz RA, Lauster R. VCAM-1-positive stromal cells from human bone marrow producing cytokines for B lineage progenitors and for plasma cells: SDF-1, flt3L, and BAFF. Mol Immunol. 2007; 44: 1606–12.

99. Medina F, Segundo C, Rodríguez C, Brieva JA. Regulatory role of CD95 ligation on human B cells induced in vivo capable of spontaneous and high-rate Ig secretion. Eur J Immunol. 1997; 27: 700–6.

100. Odendahl M. Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. Blood. 2005; 105: 1614–21.

101. Van Hooff JP, van der Steen GJ, Schippers HM, van Rood JJ. Efficacy of HL-A matching in Eurotransplant. Lancet. 1972; 2: 1385–8.

102. Opelz G, Döhler B. Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades. Transplantation. 2007; 84: 137–43.

103. Opelz G, Wujciak T, Döhler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. Rev Immunogenet. 1999; 1: 334–42.

104. Claas FHJ, Roelen DL, Mulder A, Doxiadis IIN, Oudshoorn M, Heemskerk M. Differential immunogenicity of HLA class I alloantigens for the humoral versus the cellular immune response: “towards tailor-made HLA mismatching.”Hum Immunol. 2006; 67: 424–9.

105. Duquesnoy RJ. Clinical usefulness of HLAMatchmaker in HLA epitope matching for organ transplantation. Curr Opin Immunol. 2008; 20: 594–601.

106. Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP, Saul F. Three-dimensional structure of the Fab’ fragment of a human immunoglobulin at 2,8-A resolution. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70: 3305–10.

107. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol. 1987; 196: 901–17.
108. MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. J Mol Biol. 1996; 262: 732–45.
109. Novotny J. Protein antigenicity: a thermodynamic approach. Mol Immunol. 1991; 28: 201–7.
110. Laune D, Molina F, Ferrieres G, et al. Systematic exploration of the antigen binding activity of synthetic peptides isolated from the variable regions of immunoglobulins. J Biol Chem. 1997; 272: 30937–44.
111. Hülsmeyer M, Chames P, Hillig RC, et al. A major histocompatibility complex-peptide-restricted antibody and t cell receptor molecules recognize their target by distinct binding modes: crystal structure of human leukocyte antigen (HLA)-A1-MAGE-A1 in complex with FAB-HYB3. J Biol Chem. 2005; 280: 2972–80.
112. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. Hum Immunol. 2002; 63: 339–52.
113. El-Awar NR, Akaza T, Terasaki PI, Nguyen A. Human leukocyte antigen class I epitopes: update to 103 total epitopes, including the C locus. Transplantation. 2007; 84: 532–40.
114. Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. Hum Immunol. 2006; 67: 847–62.
115. Duquesnoy RJ, Takemoto S, de Lange P, et al. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. III. Effect of matching at the HLA-A,B amino acid triplet level on kidney transplant survival. Transplantation. 2003; 75: 884–9.
116. Dankers MKA, Witvliet MD, Roelen DL, et al. The number of amino acid triplet differences between patient and donor is predictive for the antibody reactivity against mismatched human leukocyte antigens. Transplantation. 2004; 77: 1236–9.
117. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Sharples LD, et al. Predicting the immunogenicity of human leukocyte antigen class I alloantigens using structural epitope analysis determined by HLAMatchmaker. Transplantation. 2008; 85: 1817–25.
118. Claas FHJ, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis IIN. The Acceptable Mismatch Program as a Fast Tool for Highly Sensitized Patients Awaiting a Cadaveric Kidney Transplantation: Short Waiting Time and Excellent Graft Outcome. Transplantation. 2004; 78: 190–3.

119. Pei R, Lee J-H, Shih N-J, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. Transplantation. 2003; 75: 43–9.

120. HLA nomenclature information | Anthony Nolan; Available from: http://www.anthonynolan.org/Healthcare-professionals/Services/HLA-nomenclature-information.aspx

121. Cai J, Terasaki PI. Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. Curr Opin Immunol. 2008; 20: 602–6.

122. Duquesnoy RJ, Marrari M. Correlations between Terasaki's HLA class I epitopes and HLAMatchmaker-defined eplets on HLA-A, -B and -C antigens. Tissue Antigens. 2009; 74: 117–33.

123. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. N Engl J Med. 1969; 280: 735–9.

124. Anglicheau D, Loupy A, Suberbielle C, et al. Posttransplant prophylactic intravenous immunoglobulin in kidney transplant patients at high immunological risk: a pilot study. Am J Transplant. 2007; 7: 1185–92.

125. Gloor JM, DeGoey SR, Pineda AA, et al. Overcoming a positive crossmatch in living-donor kidney transplantation. Am J Transplant. 2003; 3: 1017–23.

126. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. N Engl J Med. 2008; 359: 242–51.

127. Doxiadis II, Roelen D, Claas FH. Mature wines are better: CDC as the leading method to define highly sensitized patients. Curr Opin Organ Transplant. 2010; 15: 716–9.

128. Iwaki Y, Lau M, Cook DJ, Takemoto S, Terasaki PI. Crossmatching with B and T cells and flow cytometry. Clin Transpl. 1986 : 277–84.

129. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of Positive Flow Cytometric Crossmatch in the Era of the Single-Antigen Bead Assay. Transplantation. 2011; 91: 527–35.

130. Zoet YM, Eijsink C, Kardol MJ, et al. The single antigen expressing lines (SALs) concept: an excellent tool for screening for HLA-specific antibodies. Hum Immunol. 2005; 66: 519–25.

131. Reed EF, Rao P, Zhang Z, et al. Comprehensive Assessment and Standardization of Solid Phase Multiplex-Bead Arrays for the Detection of Antibodies to HLA. Am J Transplant. 2013; 13: 1859-70.

132. Van den Berg-Loonen EM, Terasaki P, Kohanof S, Christiaans MHL. Longitudinal testing of seventy-six renal allograft patients for HLA antibodies: Maastricht experience. Clin Transpl. 2006: 305–22.

133. Opelz G, Claas FHJ. Which human leukocyte antigen antibodies are really clinically relevant? Hum Immunol. 2009; 70: 561–2.

134. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. Nat Rev Immunol. 2005; 5: 807–17.

135. Baldwin WM 3rd, Kasper EK, Zachary AA, Wasowska BA, Rodriguez ER. Beyond C4d: other complement-related diagnostic approaches to antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2004; 4: 311–8.

136. Saadi S, Platt JL. Humoral rejection and endothelial cell activation, 2001. Xenotransplantation. 2002; 9: 239–41.

137. Albrecht EA, Chinnaiyan AM, Varambally S, et al. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. Am J Pathol. 2004; 164: 849–59.

138. Markiewski MM, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? Trends Immunol. 2007; 28: 184–92.

139. Smith JD, Lawson C, Yacoub MH, Rose ML. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. Int Immunol. 2000; 12: 563–71.

140. Rahimi S, Qian Z, Layton J, Fox-Talbot K, Baldwin WM 3rd, Wasowska BA. Non-complement- and complement-activating antibodies synergize to cause rejection of cardiac allografts. Am J Transplant. 2004; 4: 326–34.

141. Yuan FF, Watson N, Sullivan JS, et al. Association of Fc gamma receptor IIA polymorphisms with acute renal-allograft rejection. Transplantation. 2004; 78: 766–9.

142. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, et al. Anti-HLA antibodies can induce endothelial cell survival or proliferation depending on their concentration. Transplantation. 2006; 82: S33–35.

143. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. Am J Transplant. 2009; 9: 2459–65.

144. Jin Y-P, Korin Y, Zhang X, Jindra PT, Rozengurt E, Reed EF. RNA interference elucidates the role of focal adhesion kinase in HLA class I-mediated focal adhesion complex formation and proliferation in human endothelial cells. J Immunol. 2007; 178: 7911–22.

145. Jindra PT, Jin Y-P, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. J Immunol. 2008; 180: 2357–66.

146. Lepin EJ, Zhang Q, Zhang X, et al. Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts. Am J Transplant. 2006; 6: 1560–71.

147. Delgado JF, Manito N, Segovia J, et al. The use of proliferation signal inhibitors in the prevention and treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. Transplant Rev. 2009; 23: 69–79.

148. Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, et al. Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. Hum Immunol. 2000; 61: 518–27.

149. Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, et al. Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104: 1301–6.

150. Tang AH, Platt JL. Accommodation of grafts: implications for health and disease. Hum Immunol. 2007; 68: 645–51.

151. Delikouras A, Hayes M, Malde P, Lechler RI, Dorling A. Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-xl and protection from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactive natural antibody. Transplantation. 2001; 71: 599–605.

152. Bach FH, Ferran C, Hechenleitner P, et al. Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. Nat Med. 1997; 3: 196–204.

153. Park WD, Grande JP, Ninova D, et al. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. Am J Transplant. 2003; 3: 952–60.

154. Wang H, Arp J, Liu W, et al. Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. J Immunol. 2007; 179: 4451–63.

155. González-Stawinski GV, Tan CD, Smedira NG, Starling RC, Rodríguez ER. Decay-accelerating factor expression may provide immunoprotection against antibody-mediated cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant. 2008; 27: 357–61.

156. Tan CD, Sokos GG, Pidwell DJ, et al. Correlation of donor-specific antibodies, complement and its regulators with graft dysfunction in cardiac antibody-mediated rejection. Am J Transplant. 2009; 9: 2075–84.

157. Ding JW, Zhou T, Ma L, et al. Expression of complement regulatory proteins in accommodated xenografts induced by anti-alpha-Gal IgG1 in a rat-to-mouse model. Am J Transplant. 2008; 8: 32–40.

158. Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, et al. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. Am J Transplant. 2001; 1: 260–9.

159. Uehara S, Chase CM, Cornell LD, Madsen JC, Russell PS, Colvin RB. Chronic cardiac transplant arteriopathy in mice: relationship of alloantibody, C4d deposition and neointimal fibrosis. Am J Transplant. 2007; 7: 57–65.

160. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in Cynomolgus monkeys. Am J Transplant. 2008; 8: 1662–72.

161. Lo YM, Lo ES, Watson N, et al. Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. Blood. 1996; 88: 4390–5.

162. Regan L, Braude PR, Hill DP. A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. Hum Reprod. 1991; 6: 294–8.

163. Triulzi DJ, Kleinman S, Kakaiya RM, et al. The effect of previous pregnancy and transfusion on HLA alloimmunization in blood donors: implications for a transfusion-related acute lung injury risk reduction strategy. Transfusion. 2009; 49: 1825–35.

164. Van Kampen CA, Versteeg-vd Voort Maarschalk MFJ, Langerak-Langerak J, Roelen DL, Claas FHJ. Kinetics of the pregnancy-induced humoral and cellular immune response against the paternal HLA class I antigens of the child. Hum Immunol. 2002; 63: 452–8.

165. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. Proc Natl Acad Sci. 1996; 93: 705.

166. SivaSai KS, Jendrisak M, Duffy BF, et al. Chimerism in peripheral blood of sensitized patients waiting for renal transplantation: clinical implications. Transplantation. 2000; 69: 538–44.

167. Everett ET, Kao KJ, Scornik JC. Class I HLA molecules on human erythrocytes. Quantitation and transfusion effects. Transplantation. 1987; 44: 123–9.

168. Opelz G, Graver B, Mickey MR, Terasaki PI. Lymphocytotoxic antibody responses to transfusions in potential kidney transplant recipients. Transplantation. 1981; 32: 177–83.

169. Scornik JC, Pfaff WW, Howard RJ, et al. Increased antibody responsiveness to blood transfusions in pediatric patients. Transplantation. 1994; 58: 1361–5.

170. Karpinski M, Pochinco D, Dembinski I, Laidlaw W, Zacharias J, Nickerson P. Leukocyte reduction of red blood cell transfusions does not decrease allosensitization rates in potential kidney transplant candidates. J Am Soc Nephrol. 2004; 15: 818–24.

171. Pfaff WW, Fennell RS, Howard RJ, Ireland JF, Scornik JC. Planned random donor blood transfusion in preparation for transplantation. Sensitization and graft survival. Transplantation. 1984; 38: 701–3.

172. Salvatierra O Jr, Vincenti F, Amend W, et al. Deliberate donor-specific blood transfusions prior to living related renal transplantation. A new approach. Ann Surg. 1980; 192: 543–52.

173. Marti H-P, Henschkowski J, Laux G, et al. Effect of donor-specific transfusions on the outcome of renal allografts in the cyclosporine era. Transpl Int. 2006; 19: 19–26.

174. Aalten J, Bemelman FJ, van den Berg-Loonen EM, et al. Pre-kidney-transplant blood transfusions do not improve transplantation outcome: a Dutch national study. Nephrol Dial Transplant. 2009; 24: 2559–66.

175. Kakaiya RM, Triulzi DJ, Wright DJ, et al. Prevalence of HLA antibodies in remotely transfused or alloexposed volunteer blood donors. Transfusion. 2010; 50: 1328–34.

176. Reisner EG, Kostyu DD, Phillips G, Walker C, Dawson DV. Alloantibody responses in multiply transfused sickle cell patients. Tissue Antigens. 1987; 30: 161–6.

177. Sanfilippo FP, Bollinger RR, MacQueen JM, Brooks BJ, Koepke JA. A randomized study comparing leukocyte-depleted versus packed red cell transfusions in prospective cadaver renal allograft recipients. Transfusion. 1985; 25: 116–9.

178. Van de Watering L, Hermans J, Witvliet M, Versteegh M, Brand A. HLA and RBC immunization after filtered and buffy coat-depleted blood transfusion in cardiac surgery: a randomized controlled trial. Transfusion. 2003; 43: 765–71.

179. Lachmann N, Terasaki PI, Budde K, et al. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. Transplantation. 2009; 87: 1505–13.

180. Marrari M, Duquesnoy RJ. Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of a rejected kidney transplant. Transpl Immunol. 2010; 22: 105–9.

181. Scornik JC, Kriesche H-UM. Human leukocyte antigen sensitization after transplant loss: timing of antibody detection and implications for prevention. Hum Immunol. 2011; 72: 398–401.

182. Collins ZV, Arnold PF, Peetoom F, Smith GS, Walford RL. A naturally occurring monospecific anti-HL-A8 isoantibody. Tissue Antigens. 1973; 3: 358–63.

183. Tongio MM, Falkenrodt A, Mitsuishi Y, et al. Natural HLA antibodies. Tissue Antigens. 1985; 26: 271–85.

184. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation. 2008; 86: 1111–5.

185. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. Science. 1970; 168: 1095–6.

186. Hirata AA, McIntire FC, Terasaki PI, Mittal KK. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. Transplantation. 1973; 15: 441–5.

187. Archer JR. Search for cross-reactivity between HLA B27 and Klebsiella pneumoniae. Ann Rheum Dis. 1981; 40: 400–3.

188. Raybourne RB, Bunning VK, Williams KM. Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of Shigella species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. J Immunol. 1988; 140: 3489–95.

189. Gross U, Chen JH, Kono DH, Yu DT. A ribosomal protein of Yersinia pseudotuberculosis having partial epitope identity with HLA-B27. Autoimmunity. 1990; 7: 267–77.

190. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in Nonalloimmunized Males: Pattern of HLA-Ia Reactivity of Anti–HLA-E–Positive Sera. J Immunol. 2010; 185: 1935–48.

191. Calderon TE, Ferrero M, Marino GM, et al. Meat-specific IgG and IgA antibodies coexist with IgE antibodies in sera from allergic patients: clinical association and modulation by exclusion diet. J Biol Regul Homeost Agents. 2010; 24: 261–71.

192. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. Hum Immunol. 2009; 70: 844–53.

193. Burns JM, Cornell LD, Perry DK, et al. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. Am J Transplant. 2008; 8: 2684–94.

194. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. Eur J Immunol. 2006; 36: 810–6.

195. Mulder A, Eijsink C, Kardol MJ, et al. Identification, isolation, and culture of HLA-A2-specific B lymphocytes using MHC class I tetramers. J Immunol. 2003; 171: 6599–603.

196. Zachary AA, Kopchaliiska D, Montgomery RA, Leffell MS. HLA-specific B cells: I. A method for their detection, quantification, and isolation using HLA tetramers. Transplantation. 2007; 83: 982–8.

197. Zachary AA, Kopchaliiska D, Montgomery RA, Melancon JK, Leffell MS. HLA-specific B cells: II. Application to transplantation. Transplantation. 2007; 83: 989–94.
198. Han M, Rogers JA, Lavingia B, Stastny P. Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. Hum Immunol. 2009; 70: 29–34.
199. Heidt S, Roelen DL, de Vaal YJH, et al. A Novel ELISPOT Assay to Quantify HLA-Specific B Cells in HLA-Immunized Individuals. Am J Transplant. 2012; 12: 1469–78.
200. Perry DK, Pollinger HS, Burns JM, et al. Two novel assays of alloantibody-secreting cells demonstrating resistance to desensitization with IVIG and rATG. Am J Transplant. 2008; 8: 133–43.
201. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. Nat Rev Immunol. 2009; 9: 491–502.
202. Cancro MP. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. Nat Rev Immunol. 2009; 9: 657–61.
203. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 595–621.
204. Loder F, Mutschler B, Ray RJ, et al. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. J Exp Med. 1999; 190: 75–89.
205. Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. Science. 1992; 256: 105–7.
206. Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. J Exp Med. 1999; 190: 1697–710.
207. Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. Science. 2001; 293: 2111–4.
208. Bossen C, Schneider P. BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. Semin Immunol. 2006; 18: 263–75.
209. O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, et al. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. J Exp Med. 2004; 199: 91–8.
210. Yan M, Wang H, Chan B, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. Nat Immunol. 2001; 2: 638–43.
211. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, De Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. J Exp Med. 1994; 180: 329–39.

212. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. J Immunol. 2001; 167: 3610–8.
213. Sanz I, Wei C, Lee FE-H, Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. Semin Immunol. 2008; 20: 67–82.
214. Klein U, Rajewsky K, Küppers R. Human immunoglobulin (Ig) M+ IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. J Exp Med. 1998; 188: 1679–89.
215. Wei C, Anolik J, Cappione A, et al. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2007; 178: 6624–33.
216. Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. Cytometry B Clin Cytom. 2010; 78B: S47–S60.
217. Torres RM, Flaswinkel H, Reth M, Rajewsky K. Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. Science. 1996; 272: 1804–8.
218. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. Cell. 1997; 90: 1073–83.
219. Harless SM, Lentz VM, Sah AP, et al. Competition for BLyS-mediated signaling through Bcmd/BR3 regulates peripheral B lymphocyte numbers. Curr Biol. 2001; 11: 1986–9.
220. Lesley R, Xu Y, Kalled SL, et al. Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF. Immunity. 2004; 20: 441–53.
221. Thien M, Phan TG, Gardam S, et al. Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. Immunity. 2004; 20: 785–98.
222. Groom J. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome. J Clin Invest. 2002; 109: 59–68.
223. Mariette X, Roux S, Zhang J, et al. The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis. 2003; 62: 168–71.
224. Petri M, Stohl W, Chatham W, et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2008; 58: 2453–9.
225. 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: 34–9.

226. Candon S, Gottenberg JE, Bengoufa D, Chatenoud L, Mariette X. Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjögren syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. Ann Rheum Dis. 2009; 68: 1208–12.

227. Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, Randall TD, Sanz I. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. Immunol Res. 2009; 45: 144–58.

228. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. Curr Opin Immunol. 2008; 20: 332–8.

229. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat Immunol. 2000; 1: 475–82.

230. Zhong X, Gao W, Degauque N, et al. Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. Eur J Immunol. 2007; 37: 2400–4.

231. Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. Nat Rev Immunol. 2008; 8: 391–7.

232. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, et al. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2000; 165: 5970–9.

233. Thibault-Espitia A, Foucher Y, Danger R, et al. BAFF and BAFF-R Levels Are Associated With Risk of Long-Term Kidney Graft Dysfunction and Development of Donor-Specific Antibodies. Am J Transplant. 2012; 12: 2754-62.

234. Xu H, He X, Liu Q, et al. The abnormal high expression of B cell activating factor belonging to TNF superfamily (BAFF) and its potential role in kidney transplant recipients. Cell Mol Immunol. 2008; 5: 465–70.

235. Xu H, He X, Sun J, Shi D, Zhu Y, Zhang X. The Expression of B-Cell Activating Factor Belonging to Tumor Necrosis Factor Superfamily (BAFF) Significantly Correlated With C4D in Kidney Allograft Rejection. Transplant Proc. 2009; 41: 112–6.

236. Sarantopoulos S, Stevenson KE, Kim HT, et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. Blood. 2009; 113: 3865–74.

237. Lavie F, Miceli-Richard C, Ittah M, Sellam J, Gottenberg J-E, Mariette X. Increase of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) after rituximab treatment: insights into a new regulating system of BAFF production. Ann Rheum Dis. 2007; 66: 700–2.

238. Tchao NK, Turka LA. Lymphodepletion and Homeostatic Proliferation: Implications for Transplantation. Am J Transplant. 2012; 12: 1079–90.

239. Anolik JH, Barnard J, Owen T, et al. Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. Arthritis Rheum. 2007; 56: 3044–56.

240. Cai J, Terasaki PI, Bloom DD, et al. Correlation between human leukocyte antigen antibody production and serum creatinine in patients receiving sirolimus monotherapy after Campath-1H induction. Transplantation. 2004; 78: 919–24.

241. Knechtle SJ, Pirsch JD, H Fechner J Jr, et al. Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. Am J Transplant. 2003; 3: 722–30.

242. Bloom D, Chang Z, Pauly K, et al. BAFF is increased in renal transplant patients following treatment with alemtuzumab. Am J Transplant. 2009; 9: 1835–45.

243. Cherukuri A, Salama AD, Carter C, et al. An Analysis of Lymphocyte Phenotype After Steroid Avoidance With Either Alemtuzumab or Basiliximab Induction in Renal Transplantation. Am J Transplant. 2012; 12: 919–31.

244. Newell KA, Asare A, Kirk AD, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest. 2010; 120: 1836–47.

245. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. J Clin Invest. 2010; 120: 1848–61.

246. Pallier A, Hillion S, Danger R, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. Kidney Int. 2010; 78: 503–13.

247. Vela JL, Aït-Azzouzene D, Duong BH, Ota T, Nemazee D. Rearrangement of mouse immunoglobulin kappa deleting element recombining sequence promotes immune tolerance and lambda B cell production. Immunity. 2008; 28: 161–70.

248. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. Clin J Am Soc Nephrol. 2009; 4: 481–508.

249. 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: 2532–41.

250. 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 : 1157-67

251. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff ’09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups. Am J Transplant. 2010; 10: 464–71.

252. Loupy A, Hill GS, Suberbielle C, et al. Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies of Kidney Transplant Recipients with Preformed Donor-Specific Antibodies (DSA): Significance of C4d Banff Scores in Early Protocol Biopsies. Am J Transplant. 2011; 11: 56–65.

253. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. Nat Rev Nephrol. 2012; 8: 348–57.

254. Amico P, Hönger G, Steiger J, Schaub S. Utility of the virtual crossmatch in solid organ transplantation. Curr Opin Organ Transplant. 2009; 14: 656–61.

255. Magee CC, Felgueiras J, Tinckam K, Malek S, Mah H, Tullius S. Renal Transplantation in Patients With Positive Lymphocytotoxicity Crossmatches: One Center's Experience. Transplantation. 2008; 86: 96–103.

256. Thielke JJ, West-Thielke PM, Herren HL, et al. Living Donor Kidney Transplantation Across Positive Crossmatch: The University of Illinois at Chicago Experience. Transplantation. 2009; 87: 268–73.

257. Montgomery RA, Lonze BE, King KE, et al. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. N Engl J Med. 2011; 365: 318–26.

258. Vo AA, Peng A, Toyoda M, et al. Use of intravenous immune globulin and rituximab for desensitization of highly HLA-sensitized patients awaiting kidney transplantation. Transplantation. 2010; 89: 1095–102.

259. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. Am J Transplant. 2007; 7: 576–85.

260. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. Am J Transplant. 2009; 9: 2561–70.

261. Hill GS, Nochy D, Bruneval P, et al. Donor-specific antibodies accelerate arteriosclerosis after kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2011; 22: 975–83.

262. 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: 2520–31.

263. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. Transplantation. 2010; 90: 68.

264. El-Zoghby ZM, Stegall MD, Lager DJ, et al. Identifying specific causes of kidney allograft loss. Am J Transplant. 2009; 9: 527–35.

265. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2010; 21: 1398–406.

266. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, et al. Donor-Specific Antibodies Adversely Affect Kidney Allograft Outcomes. J Am Soc Nephrol. 2012; 23: 2061–71.

267. Sautenet et al. One Year Results of the Effects of Rituximab on Acute Humoral Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Randomized Placebo Controlled Trial - American Transplant Congress - Seattle, May 18-22 2013 - Abstract 266

268. Ramos EJ, Pollinger HS, Stegall MD, Gloor JM, Dogan A, Grande JP. The Effect of Desensitization Protocols on Human Splenic B-Cell Populations In Vivo. Am J Transplant. 2007; 7: 402–7.

269. Woodle ES, Alloway RR, Girnita A. Proteasome inhibitor treatment of antibody-mediated allograft rejection. Curr Opin Organ Transplant. 2011; 16: 434–8.

270. Walsh RC, Brailey P, Girnita A, et al. Early and late acute antibody-mediated rejection differ immunologically and in response to proteasome inhibition. Transplantation. 2011; 91: 1218–26.

271. Flechner SM, Fatica R, Askar M, et al. The role of proteasome inhibition with bortezomib in the treatment of antibody-mediated rejection after kidney-only or kidney-combined organ transplantation. Transplantation. 2010; 90: 1486–92.

272. Gombos P, Opelz G, Scherer S, et al. Influence of Test Technique on Sensitization Status of Patients on the Kidney Transplant Waiting List. Am J Transplant. 2013; 13 : 2075-82

273. Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, et al. Complement-Binding Anti-HLA Antibodies and Kidney-Allograft Survival. N Engl J Med. 2013; 369: 1215–26.

274. Scornik JC, Meier-Kriesche H-U. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. Am J Transplant. 2011; 11: 1785–91.

275. Yabu JM, Anderson MW, Kim D, et al. Sensitization from transfusion in patients awaiting primary kidney transplant. Nephrol Dial Transplant. 2013; in press, doi: 10.1093/ndt/gft362

276. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. Nephrol Dial Transplant. 2010; 25: 205–12.

277. Bouts AHM, Davin JC, Krediet RT, et al. Children with chronic renal failure have reduced numbers of memory B cells. Clin Exp Immunol. 2004; 137: 589–94.

278. Cavdar C, Sayan M, Sifil A, et al. The comparison of antibody response to influenza vaccination in continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis and renal transplantation patients. Scand J Urol Nephrol. 2003; 37: 71–6.

279. Elagib KE, Børretzen M, Thompson KM, Natvig JB. Light chain variable (VL) sequences of rheumatoid factors (RF) in patients with primary Sjögren's syndrome (pSS): moderate contribution of somatic hypermutation. Scand J Immunol. 1999; 50: 492–8.

280. Kopchaliiska D, Zachary AA, Montgomery RA, Leffell MS. Reconstitution of peripheral allospecific CD19+ B-cell subsets after B-lymphocyte depletion therapy in renal transplant patients. Transplantation. 2009; 87: 1394–401.

281. Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. Am J Transplant. 2012; 12: 1784–92.

282. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. Immunity. 2010; 32: 129–40.

283. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. Annu Rev Immunol. 2012; 30: 221–41.

284. Liu C, Noorchashm H, Sutter JA, et al. B lymphocyte-directed immunotherapy promotes long-term islet allograft survival in nonhuman primates. Nat Med. 2007; 13: 1295–8.

285. Zarkhin V, Li L, Sarwal MM. BAFF May Modulate the Rate of B-Cell Repopulation After Rituximab Therapy for Acute Renal Transplant Rejection. Transplantation. 2009; 88: 1229–30.

286. Kandala N-B, Connock M, Grove A, et al. Belimumab: a technological advance for systemic lupus erythematosus patients? Report of a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 2013; 3.

287. Del Bello A, Congy-Jolivet N, Sallusto F, et al. Donor-specific antibodies after ceasing immunosuppressive therapy, with or without an allograft nephrectomy. Clin J Am Soc Nephrol. 2012; 7: 1310–9.

288. McSherry C, Jackson A, Hertz MI, Bolman RM 3rd, Savik K, Reinsmoen NL. Sequential measurement of peripheral blood allogeneic microchimerism levels and association with pulmonary function. Transplantation. 1996; 62: 1811–8.

289. Elwood ET, Larsen CP, Maurer DH, et al. Microchimerism and rejection in clinical transplantation. Lancet. 1997; 349: 1358–60.

290. Sahota A, Gao S, Hayes J, Jindal RM. Microchimerism and rejection: a meta-analysis. Clin Transplant. 2000; 14: 345–50.

291. Joo SY, Song EY, Shin Y, Ha J, Kim SJ, Park MH. Beneficial Effects of Pretransplantation Microchimerism on Rejection-Free Survival in HLA-Haploidentical Family Donor Renal Transplantation: Transplant J. 2013; 95: 1375–82.

292. Bende RJ, Maldegem F van, Triesscheijn M, Wormhoudt TAM, Guijt R, Noesel CJM van. Germinal centers in human lymph nodes contain reactivated memory B cells. J Exp Med. 2007; 204: 2655–65.

293. Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. Nature. 2011; 470: 543–7.

294. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. Nat Rev Immunol. 2006; 6: 205–17.

295. Thaunat O, Field A-C, Dai J, et al. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 14723–8.

296. Porcheray F, DeVito J, Helou Y, et al. Expansion of Polyreactive B Cells Cross-Reactive to HLA and Self in the Blood of a Patient with Kidney Graft Rejection. Am J Transplant. 2012; 12: 2088-97.

297. Porcheray F, DeVito J, Yeap BY, et al. Chronic humoral rejection of human kidney allografts associates with broad autoantibody responses. Transplantation. 2010; 89: 1239–46.

298. Zhou Z-H, Tzioufas AG, Notkins AL. Properties and function of polyreactive antibodies and polyreactive antigen-binding B cells. J Autoimmun. 2007; 29: 219–28.

299. Tiller T, Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Nussenzweig MC, Wardemann H. Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. Immunity. 2007; 26: 205–13.

300. Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. Curr Opin Immunol. 1995; 7: 812–8.

301. Marfo K, Lu A, Ling M, Akalin E. Desensitization Protocols and Their Outcome. Clin J Am Soc Nephrol. 2011; 6: 922–36.

302. Clatworthy MR, Watson CJ, Plotnek G, et al. B-cell–depleting induction therapy and acute cellular rejection. N Engl J Med. 2009; 360: 2683–5.

303. Wahrmann M, Haidinger M, Körmöczi GF, et al. Effect of the proteasome inhibitor bortezomib on humoral immunity in two presensitized renal transplant candidates. Transplantation. 2010; 89: 1385–90.

304. Guthoff M, Schmid-Horch B, Weisel KC, Häring H-U, Königsrainer A, Heyne N. Proteasome inhibition by bortezomib: effect on HLA-antibody levels and specificity in sensitized patients awaiting renal allograft transplantation. Transpl Immunol. 2012; 26: 171–5.

305. Diwan TS, Raghavaiah S, Burns JM, Kremers WK, Gloor JM, Stegall MD. The impact of proteasome inhibition on alloantibody-producing plasma cells in vivo. Transplantation. 2011; 91: 536–41.

306. Malaspina A, Moir S, Ho J, et al. Appearance of immature/transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: correlation with increased IL-7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103: 2262–7.

307. Malaspina A, Moir S, Chaitt DG, et al. Idiopathic CD4+ T lymphocytopenia is associated with increases in immature/transitional B cells and serum levels of IL-7. Blood. 2007; 109: 2086–8.

308. Zand MS. B-cell activity of polyclonal antithymocyte globulins. Transplantation. 2006; 82: 1387–95.

Annexe 1

"Le traitement d'induction par globulines anti-thymocytaires en transplantation rénale est associé à un an à une augmentation de la proportion des lymphocytes B transitionnels et du niveau sérique de BAFF"

Pour faire suite à la première partie de notre travail ayant mis en évidence l'association entre la répartition des sous-populations lymphocytaires périphériques B à J0 et l'immunisation anti-HLA, nous avons souhaité étudier l'évolution du phénotype B durant la première année pour un sous-groupe de patients issus de cette cohorte. L'objectif initial était de regarder si l'association entre immunisation anti-HLA, avant et après transplantation, et phénotype des lymphocytes B circulants persistait après la transplantation. Nous avons également cherché à étudier si le traitement immunosuppresseur influençait ce phénotype après transplantation.

Patients et méthodes

Nous avons suivi pendant un an un sous-groupe de 29 patients, issus de la cohorte de 101 patients sur lesquels a porté l'analyse du phénotype B périphérique à J0. Ces 29 patients ont été prospectivement suivis à 3 mois et 12 mois post-transplantation pour l'analyse en cytométrie de flux des lymphocytes T et B circulants. Cette analyse a été la même qu'à J0, et a comporté un marquage CD19, IgD, CD27, et CD38. Nous avons également réalisé chez ces patients une analyse phénotypique des lymphocytes T périphériques à l'aide des marqueurs CD3, CD4 et CD8. Nous avons étudié à M12 la concentration sérique de 3 cytokines : BAFF (R&D Systems Europe, Lille, France), l'IL-7 (R&D Systems) et l'IL-21 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

Ces patients avaient reçu pour leur transplantation deux protocoles immunosuppresseurs différant par leur traitement d'induction :

- **groupe rATG (n=14)** : si un DSA avait été identifié avant ou le jour de la transplantation, les patients recevaient une induction par anti-thymoglobulines humaines de lapin (Thymoglobuline **®,** Genzyme, Lyon, France) pendant 5 jours.
- **groupe anti-CD25 (n=15)**: les patients à faible risque immunologique, non porteurs de DSA préformés, recevaient une induction par basiliximab, 20 mg à J0 et J4 (Simulect®, Novartis Pharma AG, Bâle, Suisse).

Le traitement immunosuppresseur de maintenance comportait des stéroïdes, du mycophénolate mofétil, et du tacrolimus dans le groupe rATG ou de la ciclosporine dans le groupe anti-CD25.

L'étude des anticorps anti-HLA et l'analyse statistique ont suivi la même méthodologie que celle décrite dan le premier article.

Résultats

Caractéristiques des deus groupes de patients

Les caractéristiques des deux groupes de patients sont détaillées dans le tableau 1. Parmi les différences observées entre les deux groupes, l'âge des receveurs était plus élevé dans le groupe anti-CD25, et la fréquence de l'existence de DSA à J0 était par définition plus élevée dans le groupe rATG (71.4 *versus* 7.7%). Deux patients ont eu un épisode de rejet aigu humoral durant la première année dans le groupe rATG, traité par Rituximab. La fréquence de l'immunisation définie par la présence d'anticorps anti-HLA ayant une MFI>1000 était similaire entre les deux groupes.

Tableau 1 : caractéristiques à J0 de la transplantation des 2 groupes de patients

Characteristics of patients	Whole group	rATG	Anti-CD25
Number of patients	29	14	15
Age of recipient (mean ± SD)	53.2 ± 12.0	48.0 ± 11.0	57.9 ± 11.3*
Sex, n (% male)	14 (48.3)	5 (35.7)	9 (60%)
Rank of transplantation, 1st (%)	100	100	100
No immunizing event, n(%)	10 (34.5)	5 (35.7)	5 (33.3)
Transfusion, n(%)	16 (55.2)	6 (42.9)	10 (66.7)
Pregnancy, %	80.0	88.9	66.7
Anti-HLA antibodies MFI> 1000, n(%)	24 (85.7)	12 (85.7)	12 (86.7)
DSA at D0, % of patients	59.3	71.4	7.7**
Episode of AMR[a]	2	2	0

* p= 0.03, **p=0.003, a: Antibody Mediated Rejection

Evolution du phénotype des lymphocytes B circulants durant la première année

Le nombre de lymphocytes B circulants a diminué dans l'ensemble de la population de J0 à M12 de 130 ± 87 à 72 ± 54 / mm^3, p=0.002 (Figure 1A). Nous avons observé à 3 mois une augmentation de la proportion de lymphocytes Bm1 et une diminution de la proportion des lymphocytes Bm2, toutes deux significatives par rapport à J0, mais avec un retour aux valeurs de bases à M12. Les cellules transitionnelles étaient significativement plus basses à M3 et à M12 qu'à J0 : 0.9 ± 1.6 % (p=0,001) et 2.1 ± 4.2% (p=0.01) *versus* 4.7 ± 3.9 % des lymphocytes B $CD19^+$ totaux. La proportion des lymphocytes B mémoire est restée constante durant la première année.

Contrairement à ce qui a été observé à J0, il n'y avait pas de relation entre l'immunisation anti-HLA à J0, c'est-à-dire le pourcentage de patients ayant des anticorps anti-HLA avec une MFI>1000, et le phénotype des lymphocytes B à M12. Il n'y avait pas non plus de relation entre le pourcentage de patients immunisés à M12 et le phénotype des lymphocytes B circulant à M12. Notons que seulement 48,3% des patients avaient des anticorps à M12 contre 85,7% des mêmes patients à J0.

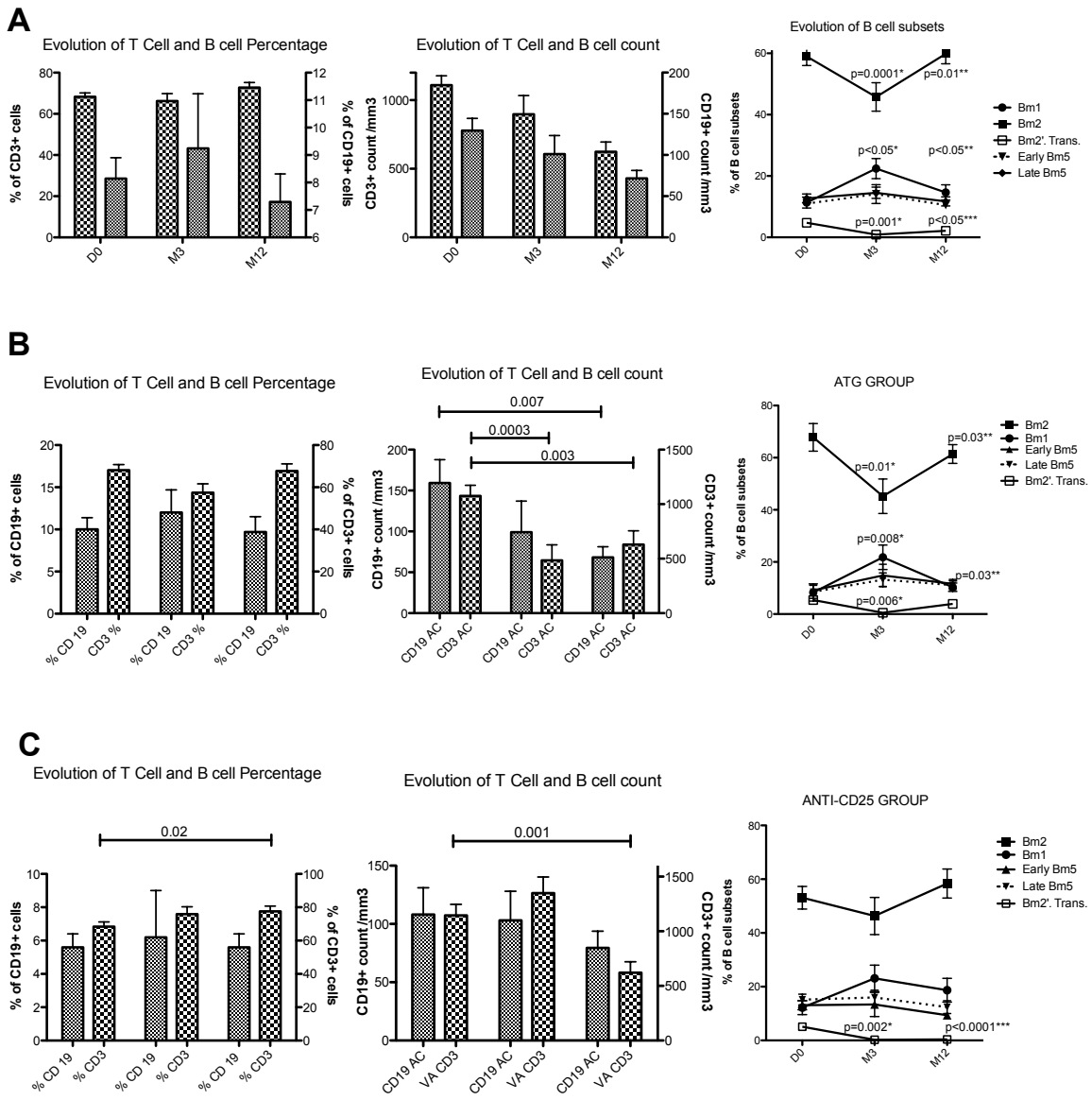
Le seul facteur que nous ayons identifié comme étant associé aux variations de phénotype des lymphocytes B durant la première année est le traitement d'induction. En effet, le nombre de

lymphocytes B totaux a diminué entre J0 et M12 dans le groupe ATG contrairement au groupe anti-CD25 (Figure 1B/C).

Concernant les sous-populations lymphocytaires B dans le groupe rATG, la proportion de lymphocytes Bm2 a significativement diminué entre J0 et M3 pour revenir au niveau de base à M12. L'image en miroir a été observée pour les lymphocytes Bm1. Il n'y a pas eu de variation observée pour les deux populations de lymphocytes B mémoire Bm5. Les lymphocytes B transitionnels ont diminué significativement dans le groupe rATG à M3 mais sont retournés au niveau de base à M12.

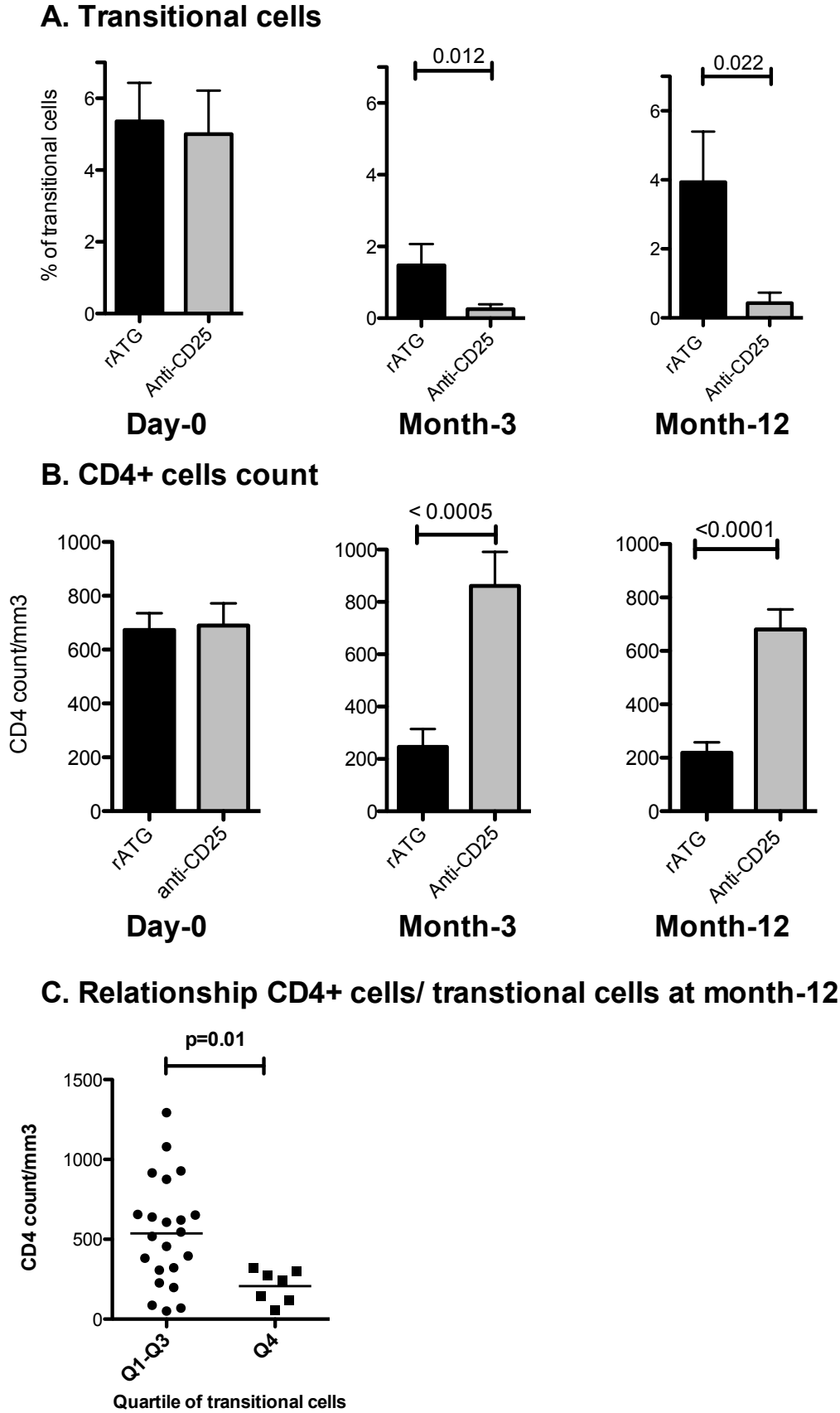
Dans le groupe anti-CD25, la seule variation notable a été la diminution significative et durable de la proportion de cellules transitionnelles Bm2' entre J0 et M3, sans remontée significative entre M3 et M12. A M3 et M12 la proportion des lymphocytes B transitionnels était ainsi significativement plus élevée dans le groupe rATG : à M3: 1.5±2.0 versus 0.3 ± 0.4%, p=0.012; et à M12: 3.9 ± 5.5 versus 0.4 ± 1.2%, p=0.022 (Figures 1 et Figure 2A).

Figure 1 – Evolution du phénotype lymphocytaire B la première année de transplantation chez l'ensemble des patients (A), les patients du groupe rATG (B) et les patients du groupe anti-CD25 (C).



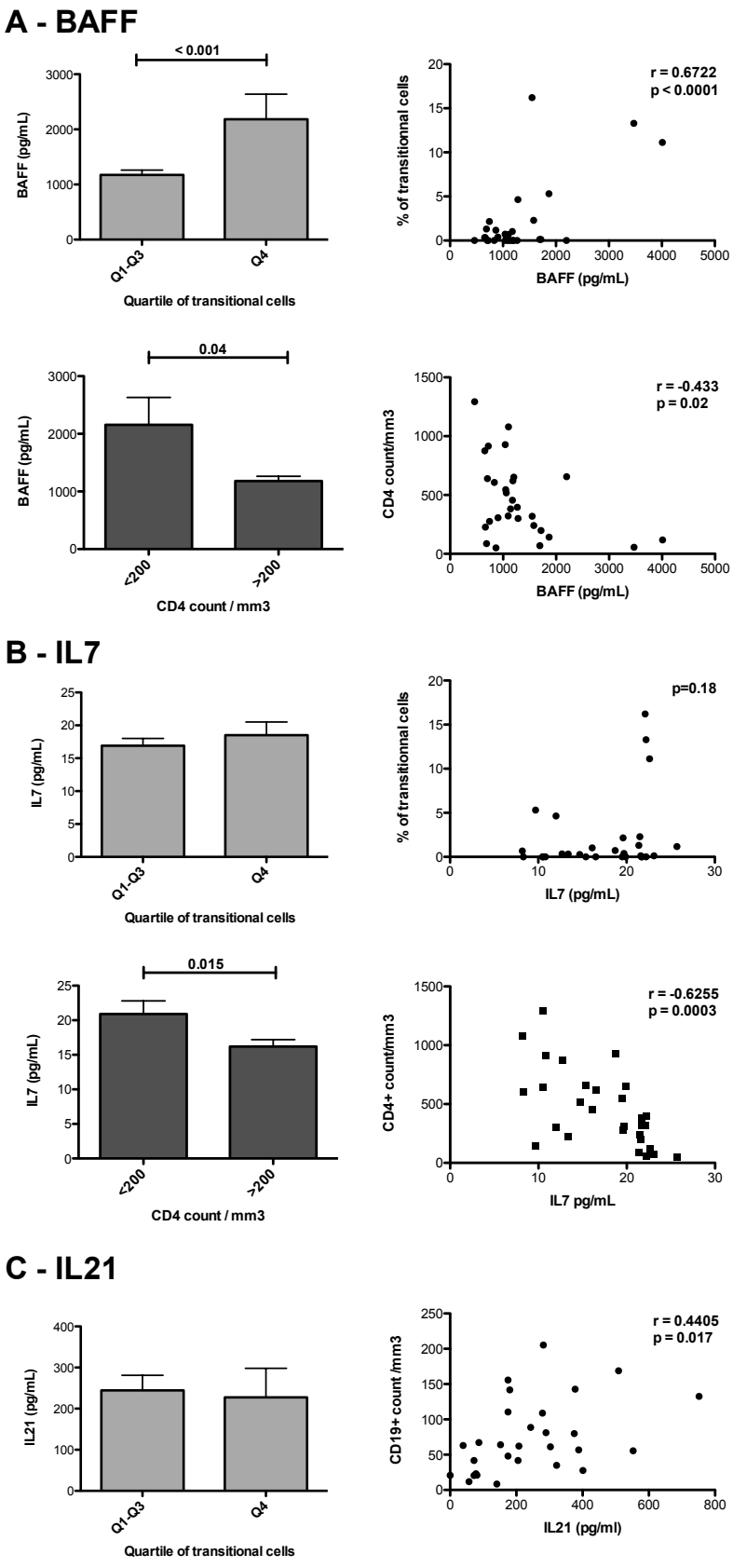
De façon analogue à d'autres situations de lymphopénie CD4 (306,307), sur l'ensemble des patients des deux groupes à M12, nous avons observé une relation opposée entre le nombre de lymphocytes $CD4^+$ et la proportion de lymphocytes B transitionnels (Figure 2). Les patients ayant une proportion de lymphocytes B transitionnels dans le quartile supérieur (plus de 1.7% des lymphocytes B $CD19^+$ totaux, n=7) avaient un nombre de lymphocytes T $CD4^+$ significativement inférieur à celui des autres patients : 207±102 *versus* 537±334/mm^3, p=0.013, (Figure 2C). Tous les patients de ce quartile sauf un avaient reçu une induction par rATG, ce qui explique le niveau de lymphopénie CD4.

Figure 2 : Evolution des lymphocytes T CD4+ et des lymphocytes B transitionnels durant la première année



Pour approfondir la relation éventuelle existant entre le pourcentage de lymphocytes B transitionnels et le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ circulants à M12, nous avons testé les concentrations sériques de trois cytokines impliquées dans l'homéostasie des lymphocytes T et/ou B: l'IL-7, l'IL-21 et BAFF (Figure 3). BAFF était corrélé de façon positive avec le pourcentage de lymphocytes B transitionnels et négativement, mais faiblement, avec le pourcentage de lymphocytes B $CD4^+$ (Figure 3A). Il y avait une corrélation faible entre le niveau d'IL7 et le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ mais pas avec le pourcentage de lymphocytes B transitionnels (Figure 3B). Enfin, l'IL21 n'était corrélée ni avec les lymphocytes B transitionnels ni avec le nombre de lymphocytes T $CD4^+$ mais avec le nombre de lymphocytes B $CD19^+$(Figure 3C).

Figure 3 : Corrélation à M12 entre les lymphocytes CD4+, lymphocytes B transitionels et les concentrations sériques de BAFF, IL-7 et IL21



Discussion

Cette étude réalisée sur une sous-population issue de notre cohorte de 101 patients ayant eu une analyse de leur phénotype lymphocytaire B à J0 montre que l'évolution de ce phénotype durant la première année de transplantation est essentiellement liée au traitement d'induction reçu à J0. Un premier résultat important concerne l'effet de l'ATG sur le nombre de lymphocytes B $CD19^+$ qui diminue significativement à M3 et M12. Cet effet est lié à la présence bien documentée dans la préparation d'ATG d'anticorps ciblant des molécules de surface des lymphocytes B et des plasmocytes humains (308). A M12 la répartition des différentes sous-populations lymphocytaires B est similaire à celle constatée à J0, ce qui signifie que toutes les sous-populations sont ciblées de façon équivalente par l'ATG, malgré une baisse transitoire des lymphocytes B naïfs. Cette observation est corroborée le fait que l'ATG induit *in vitro* l'apoptose des lymphocytes B, naïfs, mémoire, et des plasmocytes, et que les préparations d'ATG contiennent des anticorps contre plusieurs marqueurs de surface, exprimées par différentes sous-populations notamment CD20, CD38, CD27, CD138 (308).

L'expansion des lymphocytes B transitionnels et le niveau sérique de BAFF augmenté à M12 sous ATG correspondent probablement à la reconstitution immune faisant suite à la déplétion B induite par l'ATG. Le mécanisme peut être une diminution du nombre de récepteurs exprimés sur les lymphocytes B et donc une augmentation de la fraction de BAFF non liée à son récepteur (220), mais aussi une augmentation de la synthèse de BAFF (237). De telles observations ont été faites en transplantation à la suite d'une lymphodéplétion B induite par le rituximab (280) ou par l'alemtuzumab (Campath-1H). Ce dernier traitement est utilisé en induction en transplantation rénale, car il induit une lymphodéplétion prolongée T et B. Bloom et coll. ont observé que le niveau sérique de BAFF restait très élevé par rapport à des sujets contrôles pendant une période d'au moins deux ans suivant l'induction (242). Ceci est à mettre en regard de certaines études ayant montré une augmentation du risque de rejet humoral et de développement de DSA chez les patients traités par alemtuzumab, suivi d'une monothérapie par un inhibiteur de mTOR, le sirolimus (240,241). Or, des observations similaires ont été faites chez des patients traités par rituximab (anticorps anti-CD20) pour une maladie auto-immune, l'augmentation de la concentration de BAFF étant associée à la survenue de rechutes (238). Le lien entre un haut niveau de BAFF et la survenue d'épisodes de rejets pourrait être expliquée par une sélection positive des clones alloréactifs favorisée par un niveau élevé de BAFF lors de la reconstitution immune, à l'instar de ce qui observé pour la sélection des clones autoréactifs. L'utilisation de l'ATG, qui est l'induction préférentielle chez les patients à haut risque immunologique, pourrait alors avoir un effet négatif en favorisant lors de la reconstitution immune l'émergence de clones alloréactifs au sein des cellules

transitionnelles, dont le pourcentage est augmenté sous ATG, et leur sélection positive grâce à une disponibilité élevée de BAFF pour ces clones.

Cependant, une étude va à l'encontre d'un effet négatif des traitements lymphodéplétants. Cherukuri et coll. ont observé en effet que deux ans après une induction par alemtuzumab ou basiliximab (un anticorps anti-CD25 non déplétant), les patients ayant la proportion la plus faible de lymphocytes B naïfs, de lymphocytes B régulateurs et de lymphocytes transitionnels avaient la moins bonne fonction rénale et l'incidence la plus élevée de survenue de DSA. Les concentrations sériques de BAFF n'avaient pas été mesurées dans cette étude (243).

Un résultat inattendu est la corrélation observée entre le degré de lymphopénie T CD4 à M12 et le pourcentage des lymphocytes B transitionnels. Cette observation fait écho à deux publications portant sur des situations pathologiques accompagnées de lymphopénie CD4 : l'infection par le VIH et la lymphopénie CD4 idiopathique (306,307), au cours desquelles la même corrélation négative entre lymphocytes B transitionnels et nombre de lymphocytes T $CD4^+$ était observée. Au cours de ces deux études, ces deux paramètres étaient liés à la concentration sérique d'IL-7. Dans notre étude, l'IL7 était corrélée au degré de lymphopénie CD4, mais pas au pourcentage de lymphocytes transitionnels. Ce résultat portant sur l'IL-7 pourrait être expliqué par le fait que cette cytokine est essentielle pour la maturation et le maintien des lymphocytes T périphériques, mais également pour le développement médullaire des précurseurs des lymphocytes B, particulièrement au stade pro-B (203).

Nous avons cependant constaté une corrélation entre le pourcentage de lymphocytes B transitionnels, le nombre de lymphocytes $CD4^+$ et le niveau de BAFF. L'augmentation de BAFF peut être expliquée évidemment par la lymphopénie B induite par l'ATG, BAFF étant le principal "capteur" de la place disponible dans le compartiment B périphérique. L'absence de corrélation entre BAFF et le nombre de lymphocytes B à M12 suggère que la lymphopénie B relative liée à la diminution de la fixation de BAFF à son récepteur n'est pas le seul mécanisme, mais qu'il existe aussi une augmentation de la synthèse de BAFF. Nous n'avons pas non plus retrouvé de corrélation entre le nombre de lymphocytes T $CD4^+$, de lymphocytes B transitionnels et la concentration d'IL21, un des principaux facteurs impliqués dans la collaboration entre lymphocytes T et B.

Dans l'article présenté dans la première partie des résultats, nous n'avions pas pu mettre en évidence le caractère prédictif de BAFF sur la survenue du rejet aigu humoral ou la synthèse de DSA *de novo* durant la première année après transplantation. Concernant les valeurs de BAFF mesurées après transplantation, la fréquence de tels évènements immunologiques était trop faible dans notre petite analyse de sous-groupes pour tester BAFF comme un marqueur prédictif. Mais l'étude citée plus haut de Bloom et coll. mettant en évidence une augmentation

très prolongée de BAFF après induction par alemtuzumab, possiblement associée à la survenue de rejets humoraux (242), et l'étude de Thibault-Espitia et coll. ayant récemment établi un lien entre le niveau de BAFF chez des patients transplantés rénaux stables et la survenue ultérieure de DSA *de novo* (233), font de la mesure de BAFF un possible marqueur prédictif de la survenue d'évènements immunologiques humoraux en transplantation rénale.
Ces données pourraient être confirmées par une étude cinétique des concentrations sériques de BAFF dans une population de patients à haut risque de rejet humoral afin d'étudier longitudinalement les variations de BAFF et de regarder si une augmentation de BAFF précède la survenue des rejets humoraux ou l'apparition de DSA *de novo*.

Références :

les références bibliographiques de cette section suivent la numérotation de la thèse et se situent dans la bibliographie générale page 170.

Annexe 2

CARACTERISTIQUES IMMUNOLOGIQUES ET PATHOGENICITE DES ANTICORPS ANTI-HLA DETECTES CHEZ DES PATIENTS VIERGES DE TOUT EVENEMENT IMMUNISANT

Article publié dans la revue ***American Journal of Transplantation***

"Outcome of kidney transplantations performed with preformed donor-specific antibodies of unknown etiology"

Antoine Sicard, Lucile Amrouche, Caroline Suberbielle, Maryvonnick Carmagnat, Sophie Candon, Eric Thervet, Michel Delahousse, Christophe Legendre, Lucienne Chatenoud and Renaud Snanoudj

Objectifs et présentation de l'étude.

L'utilisation de techniques de détection sensibles comme le Luminex® Single Antigen a permis de mettre en évidence des anticorps anti-HLA - parfois à un titre élevé - chez des individus n'ayant jamais eu aucun évènement immunisant classique vis-à-vis du HLA, typiquement des hommes jamais transplantés ni transfusés. Cette observation soulève deux questions :

1) l'origine de ces anticorps qualifiés de "naturels" car survenant en l'absence d'événement immunisant bien identifié,

2) leur signification pathogénique dans le contexte de la transplantation, c'est-à-dire leur capacité à induire, au même titre que les anticorps anti-HLA conventionnels, des lésions de rejet humoral.

Nous avons donc analysé dans cette étude les caractéristiques et l'évolution de 41 premières transplantations rénales réalisées chez des patients masculins, jamais transfusés et porteurs de DSA d'étiologie indéterminée le jour de la greffe. Notre objectif était de déterminer si l'existence de tels DSA préformés était associée à la survenue de lésions de rejet humoral et à un mauvais pronostic de la transplantation.

Erratum : le tableau 2 (partie B) de l'article comporte une erreur dans les pourcentages des spécificités antigéniques A et B – Voici la version corrigée avec les corrections surlignées

Table 2. Immunological characteristics

A. Characteristics of patients transplanted with DSA of unknown etiology

Variable	Patients with DSA-cause unk (n=41)
HLA mismatches (A, B, DR)	4.17 ± 1.3
CDCXM, n (%)	
Negative	41 (100)
Positive	0 (0)
FCXM, n (%)	
Number of tested patients	21
Negative	11 (52)
Positive	10 (48)
IgG, T-cell positive	1
IgG, B-cell positive	9
Diversity of Anti-HLA antibodies [a]	
Class I, mean ± SD [range]	8.2 ± 8.0 [0-37]
Class II, mean ± SD [range]	6.9 ± 8.4 [0-38]
DSA at Day 0	
Number of DSA	1.4 ± 0.8
1, n (%)	28 (68)
2, n (%)	10 (24)
3, n (%)	2 (5)
5, n (%)	1 (3)
Class , n (%)	
Class I	12 (29)
Class II	24 (59)
Class I + II	5 (12)
Highest MFI	
Mean ± SD	1424 ± 1689
Range	[414-8883]
400-1000, n (%)	24 (59)
1000-3000, n (%)	13 (32)
>3000, n (%)	4 (9)

B. Percentage of patients displaying the different specificities of alloantibodies cause unk.[b]

Anti-HLA Antibodies Class I	%	Anti-HLA Antibodies Class II	%
A specificities		**DR specificities**	
A80	22,0	DR4	29,3
A11/A32/A68	17,1	DR16	24,4
A29/A24	12,2	DR1/DR7	22,0
A2/A25/A31/A36	9,8	DR18	17,1
A3/A26/A30/A43/A66	7,3	DR8/DR9	12,2
A23/A33	4,9	DR10/DR11/DR12/DR13/DR51/DR53	9,8
A1/A34/A69/A74	2,4	DR14/DR52/DR103	7,3
B specificities		DR15	4,9
B37/B45	26,8	DR2/DR17	2,4
B82/B76	22,0		
B67	19,5	**DQ specificities**	
B63/B46/B44	17,1	DQ7	39,0
B48/B57/B61/B73/B75	12,2	DQ9	29,3
B8	9,8	DQ2/DQ8	24,4
B7/B18/B27/B49/B58/B60/B64/B77/B81	7,3	DQ4	14,6
B13/B42/B50/B51/B52/B55/B72	4,9	DQ6	7,3
B38/B39/B41/B53/B54/B56/B59/B62/B65/B71	2,4	DQ5	2,4
C specificities			
Cw02	24,4	**DP specificities**	
Cw15	22,0	DP01	41,5
Cw17	19,5	DP19	26,8
Cw01/Cw05/Cw06/Cw12	14,6	DP11	17,1
Cw04/Cw07	12,2	DP04/DP14/DP28	14,6
Cw09	9,8	DP02/DP13/DP18/DP23	12,2
Cw08/Cw10	7,3	DP10/DP20	9,8
Cw16	4,9	DP03	7,3
Cw18	2,4	DP12/DP15	2,4

Abbreviations: DSA-cause unk: DSA of unknown etiology; CDCXM: Complement-Dependent Cytotoxicity Crossmatch; FCXM: Flow Cytometry Crossmatch (performed when the transplantation involved a Living Donor); Unless noted otherwise results are expressed as mean ± SD; **a**: number of total positive single-antigen flow beads; **b**: the frequencies refer to all the alloantibodies of unknown etiology found in our population, including the DSA. Single specificities separated with a " / " are encountered with the same frequency.

doi: 10.1111/ajt.12512

Author Proof

Brief Communication

Outcome of Kidney Transplantations Performed With Preformed Donor-Specific Antibodies of Unknown Etiology

A. Sicard[1,2], L. Amrouche[1,2], C. Suberbielle[3], M. Carmagnat[3], S. Candon[2,4], E. Thervet[2,5], M. Delahousse[6], C. Legendre[1,2], L. Chatenoud[2,4] and R. Snanoudj[1,2,4,*]

[1]*Service de Transplantation Rénale Adulte, Hôpital Necker, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France*
[2]*Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France*
[3]*Laboratoire d'histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France*
[4]*INSERM U1013, Hôpital Necker, Paris, France*
[5]*Service de Néphrologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France*
[6]*Service de Néphrologie, Hôpital Foch, Suresnes, France*
[*]*Corresponding author: Renaud Snanoudj, renaud.snanoudj@nck.aphp.fr*

The detection of preformed donor-specific alloantibodies (DSA) with multiplex-bead arrays has led to the common observation that individuals without a history of pregnancy, transfusion or transplantation can have circulating anti-HLA antibodies of unknown etiology. We retrospectively analyzed the risk of antibody-mediated rejection (AMR) and graft outcome in 41 kidney transplant recipients with DSA of unknown etiology at the time of transplantation. Twenty-one patients received a posttransplantation desensitization protocol, and 20 received standard immunosuppressive therapy. The mean number of DSA was 1.4 ± 0.8, ranging from 1 to 5. Complement-dependent cytotoxicity crossmatches were negative for all the patients. Flow cytometry crossmatches were positive in 47.6% of cases. The incidence of acute antibody-mediated rejection was 14.6% at 1 year, regardless of the immunosuppressive regimen. No patients experienced graft loss following AMR. At month 12, across the entire population of patients with DSA of unknown etiology, the outcomes were favorable: the measured glomerular filtration rate was 60.9 ± 16.1 mL/min/1.73 m^2, the screening biopsies showed low frequencies of microvascular inflammation and no transplant glomerulopathy, and graft and patient survival were 100%. In conclusion, patients with DSA of unknown etiology are able to mount AMR but have favorable 1-year outcomes.

Keywords: Anti-HLA antibodies, antibody-mediated rejection, desensitization protocol, donor-specific antibodies

Abbreviations: AMR, antibody-mediated rejection; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity crossmatch; cg, transplant glomerulopathy; cv, arteriosclerosis; DSA, donor-specific alloantibodies; DSA cause-unk, DSA of unknown etiology; eGFR, estimated glomerular filtration rate; FCXM, flow cytometry crossmatch; g, glomerular capillaritis; HIR, high immunological risk; IVIg, polyclonal intravenous immunoglobulins; MFI, mean fluorescence intensity; mGFR, measured glomerular filtration rate; ptc, peritubular capillaritis; SAFB, single-antigen flow beads

Received 08 May 2013, revised and accepted for publication 18 September 2013

Introduction

Recent progress in the diagnosis of antibody-mediated rejection (AMR) has significantly advanced the field of kidney transplantation. AMR has been identified as a major cause of graft failure (1–4). In addition to improved histological characterization of graft lesions (5), the detection of donor-specific alloantibodies (DSA) using sensitive ''solid-phase'' assays has become a powerful tool for identifying AMR (6,7).

Among these solid-phase assays, multiplex-bead arrays using single-antigen flow beads (SAFB) are the most sensitive and allow for precise identification of low-titer anti-HLA antibodies. A recent meta-analysis by Mohan et al (8) that included seven retrospective cohort studies (9–15) showed that the presence of DSA increases the risk of AMR and graft failure despite negative flow cytometry crossmatches (FCXM). Lefaucheur et al (16) showed that even in the absence of acute AMR, patients with preexisting DSA have poorer graft survival.

Another consequence of SAFB assays is the common observation that individuals without histories of pregnancy, transfusion or transplantation have circulating anti-HLA antibodies. These previously termed ''natural'' alloantibodies of unknown etiology (cause-unk) have rarely been

	Journal	MSP No.	Dispatch: October 7, 2013	CE: Dinesh
	AJT	13-00604.R2(12512)	No. of Pages: 9	PE: Matt Scanlon

described using complement-dependent cytotoxicity (CDC) assays (17,18). Using the SAFB assay, Morales-Buenrostro et al (19) found anti-HLA antibodies in 63% of 424 nonalloimmunized male blood donors. Different explanations for the occurrence of these antibodies have been provided and include crossreactivity to epitopes of several bacterial, fungal or viral antigens and autoreactivity against HLA class I antigens (20–27).

There are currently no data regarding the clinical relevance of DSA of unknown etiology (DSA cause-unk) after transplantation or their association with increased risks of AMR and poor graft survival. Therefore, we examined the 1-year outcomes of kidney transplant recipients carrying DSA cause-unk. Because these DSA may be indistinguishable from DSA with known probable etiologies, we only studied male patients who had never been transfused and were receiving their first kidney transplant.

Patients and Methods

Patients

The patients included in our study had received an ABO-compatible kidney transplant in two French kidney transplantation centers (Hôpital Necker, Paris; Hôpital Foch, Suresnes). We retrospectively screened 54 men without a history of transfusion who had received their first transplant between 2005 and 2008 and for whom serum from day 0 was available for detection of the presence of DSAs with the multiplex-bead arrays. Twenty patients were positive for DSA at day 0. During this 2005–2008 period, patients received standard immunosuppressive treatment (ST) because DSA had not been detected in any patients by the currently used techniques (CDC or ELISA).

Between 2008 and 2011, 21 men with no history of immunizing events in whom DSA had been detected by SAFB at day 0 were transplanted using a high-immunological risk (HIR) posttransplant desensitization protocol.

Immunosuppressive protocols

The patients treated with the standard protocol received an induction therapy of 20 mg of basiliximab on day 0 and day 4. The HIR protocol consisted of the administration of rabbit anti-thymocyte globulins for 5 days and four monthly courses of polyclonal intravenous globulins (IVIg) (28,29). Several patients with a DSA MFI >1000 at day 0 received additional prophylactic anti-CD20 therapy with rituximab (375 mg/m^2) and five plasmapheresis sessions. For maintenance therapy, both protocols included calcineurin inhibitors (cyclosporine or tacrolimus) with mycophenolate mofetil and prednisone. AMR episodes were treated with three pulses of steroids followed by a progressive tapering over 1 month, five plasmapheresis courses and one or two infusions of rituximab.

Crossmatch techniques and detection of HLA antibodies

All immunological analyses were performed in the same histocompatibility laboratory (Saint-Louis Hospital, Paris, France) as previously described (30). Briefly, crossmatches were performed for all the patients via direct CDC on T- and B-donor lymphocytes from peak and current sera. FCXM was additionally performed only when the transplantation involved a living donor.

FCXM was performed using mononuclear cells from the frozen donor's peripheral blood and the recipient's serum. Gated lymphocytes were analyzed using a Becton Dickinson Biosciences FACSCanto II analyzer with DIVA software. T and B cells were analyzed with PerCP-conjugated anti-human CD3 and PE-conjugated anti-human CD19, respectively. FITC-conjugated F(ab)'2 goat antihuman IgG was used to assess alloantibody binding. The results are expressed as the ratio of the FITC fluorescence intensities of the sera of the patient and a negative control. The cut-off values for T and B cell crossmatches were 1.63 and 1.69, respectively.

Sera from the day of transplantation were tested for class I and II DSA with multiplex-bead arrays using Luminex® Single Antigen Flow Beads (LABScreen® Single Antigen, One-Lambda, Inc., CA[Q1]). MFIs were analyzed on a LABscan reader, and all the beads showing an MFI >300 were considered positive.

Antibody-mediated rejection

Patients with acute AMR had characteristic histologic lesions that were delineated by the revised Banff 97 classification (glomerular [g] and/or peritubular [ptc] capillaritis) (31), the presence of circulating DSA with or without concurrent positive C4d staining and allograft dysfunction, unless the diagnosis was made by screening biopsy (subclinical AMR). Immunohistochemical C4d staining was performed on paraffin sections using human polyclonal antiserum to C4d (Biomedica Gruppe, Austria[Q2]).

Follow-up

The patients underwent screening biopsies and a routine GFR measurement based on iohexol clearance at 3 months and 1 year posttransplant.

Statistical analyses

The clinical and histological parameters of the three groups are described using the means $\pm$ standard deviations or frequencies and were compared using Student's t-test or the chi-squared test as appropriate. A two-sided p-value of 0.05 was considered statistically significant. All the statistical analyses were performed using JMP software version 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

Results

Characteristics of patients and HLA immunization

The patients' characteristics are given in Table 1. Patients who received transplants between 2005 and 2008 and were treated with a standard therapy were more likely to receive a kidney from a deceased donor compared with patients who received transplants between 2008 and 2011 (60.0% vs. 19.0%, $p = 0.01$). Accordingly, the cold ischemic time was longer for these patients (733 ± 604 vs. 344 ± 460 min, $p = 0.018$). The other clinical characteristics of patients who received transplants during these two periods were similar.

The mean number of cause-unk DSA was 1.4 ± 0.8 (1–5) (Table 2A). A significantly higher mean number of DSA at day 0 was observed in the 2008–2011 group compared to the 2005–2008 group (1.7 ± 1.0 vs. 1.2 ± 0.4, respectively; $p = 0.023$). In 81.0% of patients, DSA were detected at day 0 and in 2 (58.8%) or 3 (41.2%) pretransplant sera. The highest DSA MFI of each individual ranged from 414 to 8883. CDC crossmatches were negative for all patients. For 21 recipients of a kidney from a living donor, FCXM was also

Table 1: Baseline characteristics

Variable	Patients with DSA cause-unk (n = 41)
Recipient	
Gender, male, n (%)	41 (100)
Age, years	42.5 ± 13.4
Primary disease, n (%)	
Glomerulonephritis/vasculitis	12 (29)
Interstitial nephritis	5 (12)
Polycystic kidney disease	4 (10)
Nephroangiosclerosis	5 (12)
Diabetic nephropathy	4 (10)
Others	11 (27)
Dialysis time, months	27.3 ± 28.9
Donor age, years	47.0 ± 4.3
Donor type, DD/LRD, n (%)	16 (39)/25 (61)
Cold ischemic time, min	534.0 ± 563.7
Time to graft function, days	2.04 ± 3.6
Immunosuppression, n (%)	
Induction	
Basiliximab/thymogobulin	20/21 (49/51)
IVIg	21 (51)
Plasmapheresis	3 (7)
Rituximab	3 (7)
Maintenance therapy	
MMF, tacrolimus, steroids	32 (78)
MMF, cyclosporine, steroids	9 (22)

Unless noted otherwise results are expressed as mean ± standard deviation.
DSA cause-unk, DSA of unknown etiology; DD, deceased donor; LRD, living-related donor; IVIg, intravenous immunoglobulins.

performed and yielded positive results in 10 of 21 patients (47.6%).

The diversity of the anti-HLA antibody repertoire was assessed as the total number of antigenic specificities (donor and nondonor specificities) and was 8.2 ± 8.0% for class I antibodies and 6.9 ± 8.4% for class II antibodies (Table 2A). Some antigenic specificities of the DSA cause-unk were found in several patients (Table 2B). For example, approximately 40% of patients had anti-DQ7 or anti-DP1 antibodies.

One-year incidence of acute rejections

Seven episodes of acute cellular rejections were observed (4 clinical and 3 subclinical). Six patients (14.6%) experienced an episode of AMR (4 patients experienced clinical episodes, and 2 experienced subclinical episodes; Tables 3 and 4). Five of these six patients displayed a class II DSA, and one displayed a class I DSA at day 0, with MFIs that ranged from 311 to 916. No patients developed *de novo* DSA between the transplantation and the AMR episode. All of the episodes were scored *grade II* according to the Banff classification, and five of six AMR cases were C4d-negative. The patients who experienced AMR displayed DSA MFIs at day 0 (713 ± 102 vs. 1545 ± 1802, p = 0.27) and frequencies of positive FCXM (50.0 vs. 47.1%, p = 1.0) at day 0 that were similar to those of the patients who did not experience AMR.

Interestingly, and in contrast to acute cellular rejection, AMR episodes occurred regardless of the immunosuppressive protocol received by the patients with cause-unk DSA (i.e. four in the HIR group and two in the ST group; Table 3).

All AMR episodes were treated. No patients experienced graft loss following AMR. At the 12-month biopsy, two of the six patients with AMR had persistent capillaritis (g + ptc > 2), but none underwent transplant glomerulopathy (see below). At the month 12 and final follow-ups, renal function was similar in patients with and without AMR (Figure 1).

Posttransplant evolution of DSA of unknown etiology

We were able to follow up the posttransplant evolution of 16 class I and 29 class II DSA cause-unk over 1 year (Figure 2). Between day 0 and month 3, 53.7% of the DSA decreased, 17.1% increased and 29.2% remained stable. Between months 3 and 12, 60.6% remained stable (of which one-third yielded MFIs of 0), 33.3% decreased and 6.1% increased. The evolutions of the MFIs were similar for class I and class II DSAs. Two of the five patients who experienced AMR and for whom we were able to monitor DSA posttransplantation had an increase in MFI. Patient 1 (Table 3B) exhibited a continuous increase in MFI over the first 3 months and a clinical AMR episode at day 8, and patient 3 experienced an increase in DSA MFI between months 3 and 12 and a clinical AMR episode at day 14.

Histological findings

Significant microvascular inflammation (g + ptc > 2) was detected in a small number of screening biopsies performed at month 3 (n = 1) and at month 12 (n = 2) posttransplantation (Figure 3). The mean scores for glomerulitis, peritubular capillaritis and interstitial fibrosis/tubular atrophy were similarly low. No patients had transplant glomerulopathy (cg), and the mean score for arteriosclerosis (cv) was 0.85 ± 0.95. Banff scores were similar across the patients treated with standard therapy or the HIR treatment, with the exception of the mean glomerulitis score, which was significantly higher at month 12 in the HIR group (0.28 ± 0.46 vs. 0.0 ± 0.0, p = 0.02).

One-year outcome

One year after transplantation, the patients with DSA cause-unk had a mean measured GFR of 60.9 ± 16.1 mL/min/1.73 m^2 (Table 5[Q4]). After a mean follow-up time of 39.6 ± 21.0 months, graft and patient survivals were both 100%, and the mean serum creatinine was 149 ± 82 μmol/L, corresponding to an eGFR of 54.6 ± 20.2 mL/min/1.73 m^2 (Figure 2). Although it should be noted that the follow-up for

Table 2: Immunological characteristics[Q3]

Variable	Patients with DSA cause-unk (n = 41)	Anti-HLA antibodies class I	%	Anti-HLA antibodies class II	%
A: Characteristics of patients transplanted with DSA of unknown etiology		B: Percentage of patients displaying the different specificities of alloantibodies cause unk[1]			
HLA mismatches (A, B, DR)	4.17 ± 1.3	A specificities		DR specificities	
CDCXM, n (%)		A80	22.0	DR4	29.3
Negative	41 (100)	A11/A32/A68	17.1	DR16	24.4
Positive	0 (0)	A29	12.2	DR1/DR7	22.0
FCXM, n (%)		A2/A24/A25/A30/A31	9.8	DR18	17.1
Number of tested patients	21	A3/A26/A36/A43/A66	7.3	DR8/DR9	12.2
Negative	11 (52)	A23/A33/A49/A57	4.9	DR10/DR11/DR12/DR13/DR51/DR53	9.8
Positive	10 (48)	A1/A17/A34/A37/A42/A45/A51/A52/A63/A67	2.4	DR14/DR52/DR103	7.3
IgG, T cell positive	1	B specificities		DR15	4.9
IgG, B cell positive	9	B37/B45	22.0	DR2/DR17	2.4
Diversity of Anti-HLA antibodies[2]		B82	19.5	DQ specificities	
Class I, mean ± SD [range]	8.2 ± 8.0 [0–37]	B76	17.1	DQ7	39.0
Class II, mean ± SD [range]	6.9 ± 8.4 [0–38]	B44	14.6	DQ9	29.3
DSA at day 0		B46/B63/B67	12.2	DQ2/DQ8	24.4
Number of DSA	1.4 ± 0.8	B48/B75	9.8	DQ4	14.6
1, n (%)	28 (68)	B7/B58/B60/B73/B81	7.3	DQ6	7.3
2, n (%)	10 (24)	B8/B27/B52/B57/B61/B77	4.9	DQ5	2.4
3, n (%)	2 (5)	B13/B18/B38/B39/B49/B51/B53/B59/B64	2.4	DP specificities	
5, n (%)	1 (3)	C specificities		DP01	41.5
Class, n (%)		Cw02	24.4	DP19	26.8
Class I	12 (29)	Cw15	22.0	DP11	17.1
Class II	24 (59)	Cw17	19.5	DP04/DP14/DP28	14.6
Class I + II	5 (12)	Cw01/Cw05/Cw06/Cw12	14.6	DP02/DP13/DP18/DP23	12.2
Highest MFI		Cw04/Cw07	12.2	DP10/DP20	9.8
Mean ± SD	1424 ± 1689	Cw09	9.8	DP03	7.3
Range	[414–8883]	Cw08/Cw10	7.3	DP12/DP15	2.4
400–1000, n (%)	24 (59)	Cw16	4.9	–	–
1000–3000, n (%)	13 (32)	Cw18	2.4	–	–
>3000, n (%)	4 (9)	–	–	–	–

Unless noted otherwise results are expressed as mean ± SD.
DSA cause-unk, DSA of unknown etiology; CDCXM, complement-dependent cytotoxicity crossmatch; FCXM, flow cytometry crossmatch (performed when the transplantation involved a living donor).
[1]The frequencies refer to all the alloantibodies of unknown etiology found in our population, including the DSA. Single specificities separated with a ''/'' are encountered with the same frequency.
[2]Number of total positive single-antigen flow beads.

Table 3: Acute rejections

Variable	Whole population (n = 41)	Initial treatment: ST (n = 20)	Initial treatment: HIR (n = 21)	p
A: One year incidence of biopsy-proven acute rejections in patients with DSA of unknown etiology				
ACR, n (%)				
Clinical	4 (9.7)	3 (15.0)	1 (4.8)	–
Subclinical	3 (7.3)	3 (15.0)	0 (0.0)	–
Total	7 (17.0)	6 (30.0)	1 (4.8)	0.045
AAMR, n (%)				
Clinical	4 (9.7)	2 (10.0)	2 (9.5)	0.95
Subclinical	2 (4.9)	0 (0.0)	2 (9.5)	0.5
Total	6 (14.6)	2 (10.0)	4 (19.1)	0.4

	Treatment	Time post-TX	Clinical/subclinical	Grade	Banff scores	C4d	DSA specificity—MFI Day 0	MFI M1	MFI M3	MFI M12	Srcreatinine last FU[1]
B. Characteristics of antibody-mediated rejection cases											
1	ST	8 days	Clinical	II	G1 PTC2 V0	NEG	DQ2 = 753	866	1920	–	126
2	ST	75 days	Clinical	II	G3 PTC2 V0	NEG	DQ7 = 916	–	–	–	164
3	HIR	14 days	Clinical	II	G0 PTC2 V0	NEG	Cw15 = 762	–	443	1433	161
4	HIR	30 days	Clinical	II	G2 PTC0 V0	NEG	DQ2 = 708	583	0	0	124
5	HIR	365 days	Subclinical	II	G1 PTC3 V0	POS	DQ6 = 650	0	620	601	140
							DR51 = 502	0	510	502	–
							DR15 = 452	439	430	419	–
6	HIR	90 days	Subclinical	II	G1 PTC2 V0	NEG	DR4 = 819	0	319	0	163

ST, standard treatment; HIR, high immunological risk treatment; ACR, acute cellular rejection; AAMR, acute antibody mediated rejection; TX, transplantation; NEG, negative; POS, positive, MFI, mean fluorescence intensity.
[1]Serumcreatinine at last follow-up in μmol/L.

patients treated with an HIR protocol was shorter, the renal function of patients with cause-unk DSAs were similar regardless of the immunosuppressive treatment received (Table 5).

Discussion

This study is the first to provide an in-depth description of the clinical, immunological and histological features of 41 kidney transplantations performed in patients with preformed DSA cause-unk (i.e. the DSA did not develop after a classical immunizing event). To ensure that we only studied cause-unk antibodies, we restricted our population to nontransfused men who were receiving their first transplant. The major result was that anti-HLA cause-unk might be involved in the occurrence of AMR episodes.

The anti-HLA alloantibodies of unknown etiology were first described in the complement-dependent cytotoxicity

Table 4: Global outcome of patients with DSA of unknown etiology

Variable	Whole population (n = 41)	Initial treatment: ST (n = 20)	Initial treatment: HIR (n = 21)	p
One year				
mGFR, n = 34 (mL/min/1.73 m^2)	63.8 ± 16.4	65.8 ± 12.9	62.1 ± 18.6	0.5
Serum creatinine (μmol/L)	132.0 ± 28.1	132 ± 24	132 ± 32	1.0
eGFR (mL/min/1.73 m^2)	58.1 ± 14.6	57.5 ± 12.2	58.7 ± 17.0	0.8
Proteinuria (g/L)	0.15 ± 0.13	0.14 ± 0.14	0.15 ± 0.13	0.7
Last follow-up				
Follow-up period (months)	39.6 ± 21.0	56.5 ± 16.7	23.6 ± 8.1	<0.0001
Patient survival (%)	100	100	100	–
Graft survival (%)	100	100	100	–
Serum creatinine (μmol/L)	148.9 ± 82.3	162 ± 113	135 ± 31	0.3
eGFR (mL/min/1.73 m^2)	55.7 ± 18.1	55.4 ± 21.5	56.1 ± 14.8	0.9

Unless noted otherwise results are expressed as mean ± SD.
ST, standard treatment; HIR, high immunological risk treatment; mGFR, measured glomerular filtration rate; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

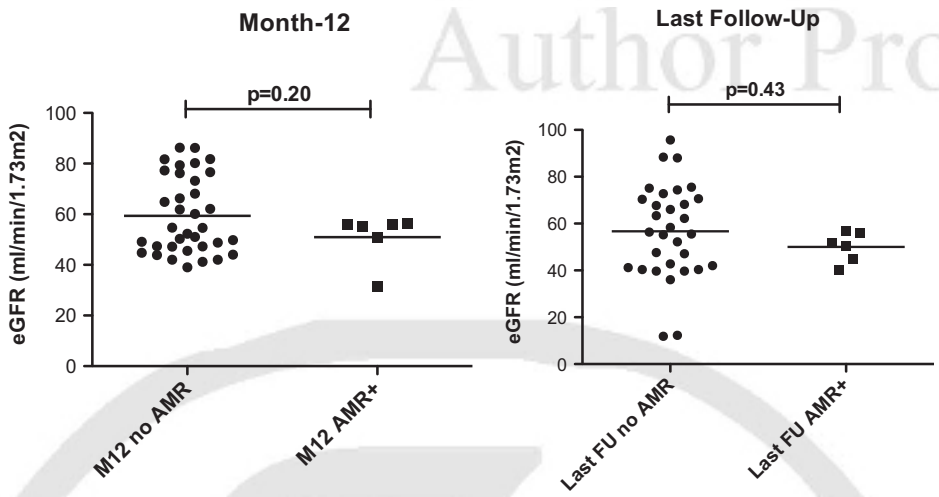


Figure 1: Renal function at month 12 and the last follow-up. Estimated glomerular filtration rate (MDRD formula) at month 12 and at the last follow-up (39.6 ± 21.0 months) in patients with DSA cause-unk who experienced or did not experience an AMR episode.

era (17,18). However, these findings were difficult to confirm using CDC assays. In the 2000s, the emergence of SAFB assays again strongly indicated the existence of such anti-HLA antibodies of the IgG isotype. Indeed, Morales-Buenrostro et al (19) showed that anti-HLA antibodies were found in 63% of 424 healthy male blood donors when an MFI threshold of 1000 was adopted, and this result has proven to be highly reproducible. These authors described an unusual pattern in the allelic specificities of these antibodies; 18.9% of them targeted A*3002. In our study, the most frequent cause-unk antibodies were class II antibodies that targeted DP01, DQ7 and DR4. Interestingly, these specificities were also the most frequent among the anti-class II antibodies reported in the study of Morales-Buenrostro et al. However, class I specificities differed significantly; these differences may be due to differences in the geographic origins of the blood donors (19).

Different explanations have been provided for the occurrence of anti-HLA cause-unk. First, abundant literature has illustrated the cross-reactivity of HLA with several microbial antigens, including streptococcal proteins (22), *Escherichia coli* and *Salmonella* (21) and several antigens from *Shigella* (23,24), *Klebsiella pneumoniae* (25,26) and

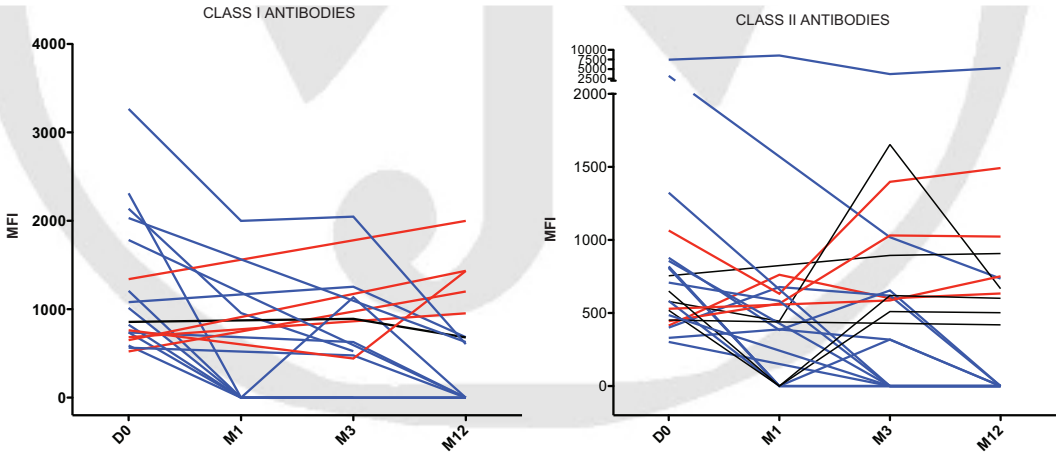


Figure 2: Posttransplant evolution of DSA of unknown etiology. Evolution of the MFIs of class I (left panel) and class II (right panel) DSA cause-unk at day 0, month 1, month 3 and month 12 posttransplantation. Each line represents one DSA. Red lines correspond to DSA whose MFIs increased between day 0 and month 12, blue lines correspond to DSA that decreased, and black lines correspond to DSA whose MFIs remained stable (MFI variation <200 between the two time points).

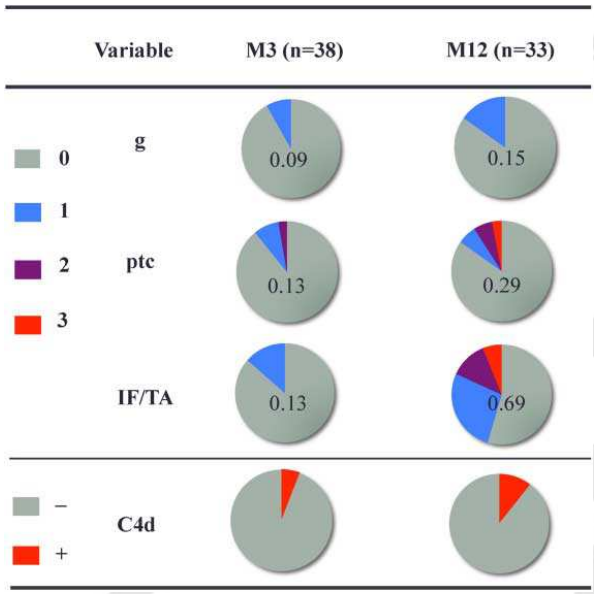


Figure 3: Percentages of 3- (A) and 12-month (B) protocol biopsies with Banff elementary lesions and C4d depositions. The numbers inside the pie charts correspond to the mean Banff scores for glomerulitis (g), peritubular capillaritis (ptc) and interstitial fibrosis/tubular atrophy (IF/TA).

Yersinia (27). Recently, Ravindranath et al (20) showed that autoantibodies directed against the heavy chain of soluble HLA-E could explain HLA class I reactivity because of the shared peptide sequences between HLA-E and HLA class I molecules. The alternate hypothesis that dietary meat proteins can antigenically mimic HLA-I antigens remains controversial (20). As epitope mimicry remains as a common explanation, it seems more appropriate to call the etiology of these antibodies unknown because the immunizing agent is unidentified rather than natural, and those IgG could likely develop following an authentic immunization.

In our study, the repertoire of anti-HLA cause-unk was not restricted. Moreover, 32% of patients had more than one DSA. The detection of these DSA was robust and sustained across time points before and after transplantation in the majority of the patients. Indeed, DSA MFI remained stable or increased in nearly half of the cases between day 0 and month 3 posttransplantation and in two-thirds of the cases between months 3 and 12. The MFI of the DSA with the highest level was usually mild (below 3500). However, 41% of these highest DSA produced MFIs greater than 1000, which is considered to be the clinically significant threshold (32). The CDCXM was constantly negative in our study. Conversely, the DSA cause-unk led to positive FCXM in nearly half of the tested cases. This is an important result that argues against the artificial reactivity of these antibodies toward denatured HLA antigens exposed on SAFB, because antibodies react with antigens expressed on cell surfaces in their native form during an FCXM. Similarly, El-Awar et al (33) found 96 epitopes targeted by anti-HLA antibodies in healthy males, including 60 in cryptic positions; that is the latter were only accessible on dissociated antigens. They have shown that the positive reactions of dissociated antigens on SA beads are not caused by alteration of the molecular structures of the antigens during their attachment to beads because the sera reacted positively both to the same antigens in a dissociated form on SAFB and in their native form on PRA beads.

The main goal of our work was to assess the pathogenicity of DSA cause-unk. First, these antibodies could have led to positive FCXM tests in our study, which are associated with increased risks of acute AMR and chronic allograft dysfunction (11). Second, 6 out of 41 patients (14.6%) carrying DSA cause-unk at day 0 developed clinical or subclinical AMR. Although the severities of those AMR episodes were mild, their outcomes were favorable, and no positive CDCXMs were observed, these data still indicate that DSA cause-unk are potentially pathogenic. Although some of the AMR cases were subclinical, such episodes are now acknowledged as a cause of late graft dysfunction or loss (30,34,35).

Given the small size of our population, we cannot make any conclusions regarding the appropriate treatment for patients with DSA cause-unk. However, our patients received two types of immunosuppression because they were transplanted at different periods: a standard therapy or a posttransplantation desensitization protocol. The patients experienced AMR and AMR outcomes were favorable independently of the type of immunosuppression: patient survival, graft survival and graft function were excellent; microvascular inflammation was limited; and no signs of chronic AMR were observed on the screening biopsies.

The relatively low titers of DSA cause-unk may provide an explanation of these good outcomes. As we were not able to closely monitor DSA in the first days posttransplantation, as Burns et al (36) did in their study, we were not able to show increases in DSA MFIs before AMR episodes. Nevertheless, we observed inconstant and modest increases in DSA titers over the first year. The results of several studies that aimed to clarify the clinical significance of low DSA levels as detected by SAFB assays have been contradictory. Some studies have reported that low DSA levels are not clinically relevant in the absence of a positive CDCXM (10,12). In contrast, other studies have reported that even with a low MFI and a negative CDCXM, the presence of DSAs is associated with an increased risk of AMR (9,16,37,38). Recently, Lefaucheur et al showed that the risk for AMR is increased even for patients with DSA MFIs between 400 and 3000; these results are similar to those observed in our study. However, the risk of graft loss is only significantly increased for patients with DSA MFIs >3000 (16). A recent meta-analysis by Mohan et al (8) showed that the presence of DSA, despite a

negative FCXM, nearly doubles the risk of AMR and increases the risk of graft failure by 76%.

In conclusion, our study provides important results suggesting that DSA cause-unk present at the day of transplantation should be considered pathogenic, even if the titers are low, as they may induce acute AMR. Such AMR episodes exhibit good responses to treatment and favorable short-term graft functions. Thus, these DSA, as low-MFI DSA with probable etiology, do not represent a contraindication to transplantation but warrant close monitoring for the occurrence of an AMR episode after transplantation.

Disclosure

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

References

1. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. Transplantation 2010; 90: 68–74.
2. 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. Am J Transplant 2012; 12: 388–399.
3. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. Nat Rev Nephrol 2012; 8: 348–357.
4. 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.
5. Mengel M, Sis B, Haas M, et al. Banff 2011 Meeting report: New concepts in antibody-mediated rejection. Am J Transplant 2012; 12: 563–570.
6. Caro-Oleas JL, González-Escribano MF, Gentil-Govantes Mê, et al. Clinical relevance of anti-HLA donor-specific antibodies detected by Luminex assay in the development of rejection after renal transplantation. Transplantation 2012; 94: 338–344.
7. Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. Am J Transplant 2008; 8: 324–331.
8. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 2061–2071.
9. Patel AM, Pancoska C, Mulgaonkar S, Weng FL. Renal transplantation in patients with pre-transplant donor-specific antibodies and negative flow cytometry crossmatches. Am J Transplant 2007; 7: 2371–2377.
10. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, et al. Relevance of different antibody detection methods for the prediction of antibody-mediated rejection and deceased-donor kidney allograft survival. Hum Immunol 2009; 70: 589–594.
11. Couzi L, Araujo C, Guidicelli G, et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. Transplantation 2011; 91: 527–535.
12. Gupta A, Iveson V, Varagunam M, Bodger S, Sinnott P, Thuraisingham RC. Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: Are they relevant? Transplantation 2008; 85: 1200–1204.
13. Higgins R, Lowe D, Hathaway M, et al. Human leukocyte antigen antibody-incompatible renal transplantation: Excellent medium-term outcomes with negative cytotoxic crossmatch. Transplantation 2011; 92: 900–906.
14. Verghese PS, Smith JM, McDonald RA, Schwartz SM, Nelson KA, Warner PR. Impaired graft survival in pediatric renal transplant recipients with donor-specific antibodies detected by solid-phase assays. Pediatr Transplant 2010; 14: 730–734.
15. Willicombe M, Brookes P, Santos-Nunez E, et al. Outcome of patients with preformed donor-specific antibodies following alemtuzumab induction and tacrolimus monotherapy. Am J Transplant 2011; 11: 470–477.
16. 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.
17. Collins ZV, Arnold PF, Peetoom F, Smith GS, Walford RL. A naturally occurring monospecific anti-HL-A8 isoantibody. Tissue Antigens 1972; 3: 358–363.
18. Tongio MM, Falkenrodt A, Mitsuishi Y, et al. Natural HLA antibodies. Tissue Antigens 1985; 26: 271–285.
19. Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, Lee J-H, El-Awar N, Alberú J. "Natural" human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. Transplantation 2008; 86: 1111–1115.
20. Ravindranath MH, Kaneku H, El-Awar N, Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI. Antibodies to HLA-E in nonalloimmunized males: Pattern of HLA-IA reactivity of anti-HLA-E-positive sera. J Immunol 2010; 185: 1935–1948.
21. Hirata AA, McIntire FC, Terasaki PI, Mittal KK. Cross reactions between human transplantation antigens and bacterial lipopolysaccharides. Transplantation 1973; 15: 441–445.
22. Hirata AA, Terasaki PI. Cross-reactions between streptococcal M proteins and human transplantation antigens. Science 1970; 168: 1095–1096.
23. Raybourne RB, Bunning VK, Williams KM. Reaction of anti-HLA-B monoclonal antibodies with envelope proteins of *Shigella* species. Evidence for molecular mimicry in the spondyloarthropathies. J Immunol 1988; 140: 3489–3495.
24. Tsuchiya N, Husby G, Williams RC, Stieglitz H, Lipsky PE, Inman RD. Autoantibodies to the HLA-B27 sequence cross-react with the hypothetical peptide from the arthritis-associated *Shigella* plasmid. J Clin Invest 1990; 86: 1193–1203.
25. Archer JR. Search for cross-reactivity between HLA B27 and *Klebsiella pneumoniae*. Ann Rheum Dis 1981; 40: 400–403.
26. Georgopoulos K, Dick WC, Goodacre JA, Pain RH. A reinvestigation of the cross-reactivity between *Klebsiella* and HLA-B27 in the etiology of ankylosing spondylitis. Clin Exp Immunol 1985; 62: 662–671.
27. Gross U, Chen JH, Kono DH, Yu DT. A ribosomal protein of *Yersinia pseudotuberculosis* having partial epitope identity with HLA-B27. Autoimmunity 1989; 7: 267–277.
28. Anglicheau D, Loupy A, Suberbielle C, et al. Posttransplant prophylactic intravenous immunoglobulin in kidney transplant patients at high immunological risk: A pilot study. Am J Transplant 2007; 7: 1185–1192.
29. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Zuber J, et al. Combined posttransplant prophylactic IVIg/anti-CD20/plasmapheresis in

kidney recipients with preformed donor-specific antibodies: A pilot study. Transplantation 2010; 89: 1403–1410.
30. Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. Am J Transplant 2009; 9: 2561–2570.
31. Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of banff working groups. Am J Transplant 2010; 10: 464–471.
32. Reed EF, Rao P, Zhang Z, et al. Comprehensive assessment and standardization of solid phase multiplex-bead arrays for the detection of antibodies to HLA. Am J Transplant 2013; 13: 1859–1870.
33. El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, et al. Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. Hum Immunol 2009; 70: 844–853.
34. Haas M, Montgomery RA, Segev DL, et al. Subclinical acute antibody-mediated rejection in positive crossmatch renal allografts. Am J Transplant 2007; 7: 576–585.
35. Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, et al. Transplant glomerulopathy: Subclinical incidence and association with alloantibody. Am J Transplant 2007; 7: 2124–2132.
36. Burns M, Cornell LD, Perry DK, et al. Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. Am J Transplant 2008; 8: 2684–2694.
37. Amico P, Hönger G, Mayr M, Steiger J, Hopfer H, Schaub S. Clinical relevance of pretransplant donor-specific HLA antibodies detected by single-antigen flow-beads. Transplantation 2009; 87: 1681–1688.
38. Hirai T, Kohei N, Omoto K, Ishida H, Tanabe K. Significance of low-level DSA detected by solid-phase assay in association with acute and chronic antibody-mediated rejection. Transpl Int 2012; 25: 925–934.

Discussion des résultats

Concernant les caractéristiques immunologiques des DSA d'étiologie indéterminée, il faut souligner que ces anticorps ne sont pas isolés (8% de billes positives ce qui correspond environ à 8 spécificités antigéniques en moyenne par patient) et sont en général d'intensité de fluorescence faible mais significative (1424 ±1689). Leur détection est robuste dans la mesure où après transplantation, le titre des anticorps reste stable ou augmente dans près de la moitié des cas. Dans tous les cas, le crossmatch en LCT était négatif mais le crossmatch en cytométrie de flux était positif dans 47% des cas. Il s'agit là d'un résultat important dans la mesure où il a été proposé que ces anticorps soient dirigés contre des antigènes cryptiques rendus accessibles lors de la procédure de fixation de l'antigène HLA sur les billes. Cette observation confirme qu'au contraire ils sont bien dirigés – en tout cas fréquemment – contre des antigènes HLA membranaires sous forme native et leur associe un risque de rejet humoral, bien documenté lors d'un crossmatch en cytométrie positif.

Ce risque théorique a bien été confirmé puisque 14,6% des patients ont présenté un épisode de rejet aigu humoral, clinique ou infra-clinique. Ces épisodes de rejet ont eu une évolution favorable sous traitement. En effet, à un an, l'évolution de ces transplantations est favorable, avec 100% de survie du greffon, une bonne fonction rénale et des séquelles histologiques des épisodes de rejet humoral très modérées. Aucun patient n'a évolué après traitement du rejet aigu humoral, vers un rejet chronique, du moins sur les biopsies de dépistage faites à un an.

La conclusion de notre étude est que si l'événement immunisant conduisant à la synthèse de ces anticorps est différent de celui des anticorps anti-HLA conventionnels, le risque associé à ces anticorps est identique à celui des DSA conventionnels présents à faibles titres. En effet, la principale explication pour la détection de ces anticorps est l'existence d'une réaction croisée de certaines molécules HLA avec des antigènes bactériens ou viraux, voire des autoantigènes (cf chapitre 4.4 de l'introduction). L'isotype IgG des anticorps suggère en effet qu'ils sont issus d'une réaction de centre germinatif faisant suite à une reconnaissance

antigénique classique. De plus, dans certains cas, le titre de l'anticorps augmente après transplantation, ce qui suggère une réponse humorale secondaire. Nous n'avons toutefois pas pu observer une telle augmentation précédant un épisode de rejet aigu humoral.

Cependant, ces anticorps pourraient également constituer de réels anticorps naturels, c'est-à-dire dont la synthèse n'est pas la conséquence d'une stimulation antigénique conventionnelle. Ceux-ci sont le plus souvent d'isotype IgM, codés par des gènes d'immunoglobuline en configuration germinale, et ont une polyréactivité et une faible affinité vis-à-vis notamment d'antigènes du soi. Mais ils peuvent être aussi d'isotype IgG par le fait d'une commutation isotypique induite dans un contexte inflammatoire, et le siège de mutations somatiques sans qu'il n'y ait eu de contact avec l'antigène (cf discussion). La présence d'autoanticorps et d'IgM alloréactives de même spécificité que les IgG serait en faveur d'une origine naturelle de ces anticorps. Cependant, l'observation que les mêmes spécificités antigéniques sont retrouvées chez plusieurs patients porteurs de tels anticorps suggère une exposition à un même antigène environnemental à l'origine de ces anticorps.