

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

***Etude de la pluralité des mécanismes régulateurs induits
par le blocage de la costimulation
en allo et xénotransplantation cardiaque chez le rat***

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Céline SEVENO

Le 16 mai 2006 devant le jury ci-dessous :

Président du Jury Gilles BLANCHO, Professeur, Nantes

Rapporteurs Pierre GIANELLO, Professeur, Bruxelles

Vincenzo MIRENDA, Docteur, Londres

Directeur de thèse Bernard VANHOVE, Docteur, Nantes

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	2
Liste des Abréviations.....	5
Liste des Figures.....	6
Liste des Tableaux.....	7
Introduction Allotransplantation.....	8
I- Les différents types de rejet de greffe.....	8
I-1 Le rejet hyperaigu	8
I-2- Le rejet aigu.....	8
I-3- Le rejet chronique.....	9
II- Présentation antigénique et mise en place du rejet de greffe.....	10
II-1 Les voies de présentation antigénique.....	10
II-1.1 La voie directe de présentation.....	10
II-1.2 La voie indirecte de présentation	10
II-1.3 La voie semi-directe de présentation.....	11
II-2 Les effecteurs du rejet aigu	12
II-2.1 Les lymphocytes cytotoxiques	12
II-2.2 La réaction d'hypersensibilité retardée.....	13
II-2.3 Les anticorps et le complément.....	13
II-3- L'activation lymphocytaire T	14
II-3.1 Le signal antigénique	14
III-3.2- La costimulation	14
III-3.3- Le signal des cytokines.....	15
II-4 La différenciation des lymphocytes T	16
II-4.1 La différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺	16
II-4.2 La différenciation des lymphocytes T CD8 ⁺	17
II-5 La costimulation	18
II-5.1 La famille CD28.....	18
II-5.1.1 La voie CD28/CTLA-4/B7.....	18
II-5.1.1a Structure et expression.....	18
II-5.1.1b Les effets immunomodulateurs de la voie CD28/CTLA-4/B7 dans la réponse lymphocytaire T ...	19
II-5.1.1c Blocage de la voie CD28/CTLA-4/B7 en transplantation	24
II-5.2 La voie CD40/CD40L.....	26
II-5.2.1 Structure et expression	26
II-5.2.2 Les effets de l'engagement de CD40 et CD40L.....	27
II-5.2.3 La voie CD40/CD40L en transplantation.....	29
III La tolérance en transplantation	31
III-1 La tolérance centrale ou thymique	31
III-2 La tolérance périphérique	33
III-2.1 L'ignorance	33
III-2.2 La délétion clonale.....	34
III-2.3 L'anergie.....	35
III-2.4 Les cellules veto.....	35
III-2.5 Les cellules régulatrices ou suppressives.....	36
III-2.5.1 Les cellules régulatrices T CD4 ⁺ CD25 ⁺	36
III-2.5.1a Phénotype des cellules régulatrices T CD4 ⁺ CD25 ⁺	37

III-2.5.1b Mécanismes suppresseurs des cellules régulatrices T CD4 ⁺ CD25 ⁺	37
III-2.5.1c Les cellules régulatrices T CD4 ⁺ CD25 ⁺ en transplantation	38
III-2.5.2 Les cellules régulatrices T CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	39
III-2.5.3 Les cellules régulatrices induites Th3 et Tr1	39
III-2.5.4 Les cellules suppressives T CD8 ⁺	40
III-2.5.5 Les cellules T CD25 ⁻	41
III-2.5.6 Les cellules T CD4 ⁻ CD8 ⁻	41
III-2.5.7 Les cellules NKT	42
III-2.6 Reconnaissance indirecte, suppression liée et tolérance infectieuse	42
Modèle Expérimental	45
I : Modèle animal	45
II : Inhibition de la costimulation	45
II-1 Anticorps anti-CD28	45
II-2 Adénovirus CD40Ig	46
Résultats	48
Article 1, en préparation	48
Résultats complémentaires et discussion	67
Article 2, en préparation	72
Résultats complémentaires et discussion	108
Conclusion-Perspectives	113
Introduction Xénotransplantation	117
I-La xénotransplantation, historique et choix du donneur	117
II-Les barrières immunologiques	118
II-1 Le rejet hyperaigu	118
I-1.1 L'épitope Gal et les anticorps naturels xénogéniques	118
I-1.2 Initiation du rejet hyperaigu : le complément et les anticorps naturels xénogéniques	119
I-1.3 L'endothélium, acteur principal du rejet hyperaigu	120
II-2-Le rejet vasculaire aigu	122
II-2.1-Les anticorps xénogéniques induits et le complément	122
II-2.2-Rôle des cellules NK	123
II-2.3-L'endothélium	124
II-3-Stratégies visant à prévenir le rejet humoral	126
II-3-1 : les anticorps xénoréactifs	127
II-3 -2: le complément	129
II-3-3 : la coagulation	131
II-3-4 : l'immunosuppression classique pour inhiber la réponse cellulaire et humorale	132
II-3.5 : De nouveaux immunosuppresseurs pour inhiber la réponse cellulaire et humorale en xénotransplantation	133
II-3.6 : L'épitope Gal	135
II-3.6.1 : les compétiteurs de l' α 1-3 galactosyltransférase	135
II-3.6.2 : Les animaux KO pour l' α 1-3 galactosyltransférase	136
II-3.6.3 : L'accommodation	137
II-4 : Le rejet cellulaire	140
II-4.1: Compatibilité moléculaire	141
II-4.2 Voie de présentation directe ou indirecte ?	141
II-4.3: Rôle de la costimulation	142
III : La survie à long terme : induction de tolérance	143
III-1 : Le chimérisme moléculaire	143
III-2 : Le chimérisme hématopoïétique	143

III-3 : La greffe thymique.....	144
IV : Le risque infectieux	145
Résultats	147
Article 3, soumis à Xenotransplantation.	147
Résultats complémentaires et discussion.....	169
Conclusion générale	174
Bibliographie.....	175
Annexes	196
Annexe 1.....	196
Annexe 2.....	206
Annexe 3.....	210

Liste des Abréviations

Ad : Adénovirus

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrice d'Antigène

CS : Corticostéroïdes

CSA : Cyclosporine A

GT: Galactosyl Transférase

IDO : Indoléamine 2'3 dioxygénase

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : interleukine

KO : Knock Out

MLR: Mixed Lymphocyte Reaction

TCR : T Cell Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

Liste des Figures

Figure 1 : Schéma récapitulatif des signaux issus de CD28 et aboutissant à la synthèse d'IL-2.	21
Figure 2 : Rôle pivot de l'interaction CD40/CD40L dans la réponse cellulaire T.	28
Figure 3 : Balance entre tolérance centrale et tolérance périphérique en fonction du degré de chimérisme.	33
Figure 4 : Mécanismes d'induction de la tolérance périphérique.	34
Figure 5 : Suppression liée et tolérance infectieuse induites par les Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺	43
Figure 6 : Représentation schématique de la construction (A) et de la molécule (B) CD40Ig.	46
Figure 7 : Test de prolifération après ajout de cellules B7 ⁺ CD6 ⁻ sur une MLR lymphocytes T/CPA Lew.1W.	68
Figure 8 : Test d'inhibition de MLR en transwell.	69
Figure 9 : Schéma récapitulatif des expériences à réaliser afin de vérifier le rôle d'IDO et des lymphocytes T dans l'inhibition de la prolifération.	70
Figure 10 : Schéma récapitulatif présentant les différents mécanismes pouvant être impliqués dans l'inhibition des lymphocytes T alloréactifs.	71
Figure 11 : Réponse proliférative des splénocytes des animaux LS après ajout d'IL-2.	109
Figure 12 : Analyse des cytokines dans le surnageant de MLR.	110
Figure 13 : Activité cytotoxique anti-donneur des splénocytes 120 jours après la greffe.	111
Figure 14: Voies de synthèse enzymatique de l'épitope Gal porcin et des groupes sanguins humains.	119
Figure 15 : La voie classique et la voie alterne du complément.	120
Figure 16 : Physiopathologie du rejet hyperaigu.	121
Figure 17: Schéma récapitulatif simplifié de l'AVR.	126
Figure 18 : Récapitulatif des expériences permettant de vérifier l'accommodation d'un greffon.	139
Figure 19 : Schéma récapitulatif de la cinétique des gènes impliqués dans l'accommodation.	140
Figure 20 : Dosage sérique des xénoanticorps après l'arrêt de la CSA, en l'absence de tout traitement de substitution.	170
Figure 21 : Comparaison du nombre de splénocytes chez des animaux naïfs et chez des receveurs de xéno greffe traités par Ad-CTLA4Ig et CVF.	172

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Tableau non exhaustif des signaux de costimulation impliqués dans l'activation lymphocytaire T.	15
Tableau 2 : Résumé non exhaustif des effets de l'interaction CD40/CD40L sur différents types cellulaires.	29
Tableau 3 : Récapitulatif des différents traitements utilisés ainsi que des survies obtenues	67
Tableau 4 : Tableau comparatif des différents résultats obtenus suite au blocage des voies CD40/CD40L et/ou CD28/B7.	114
Tableau 5 : Histologie de l'AVR dans différents modèles où seul le complément a été ciblé pour prévenir l'HAR... ..	125
Tableau 6: Récapitulatif des différentes stratégies utilisées pour prévenir le rejet humoral.	127
Tableau 7 : résumé non exhaustif de la survie d'organes porcins chez des primates soumis à une immunosuppression classique.	133
Tableau 8: résumé non exhaustif de la survie d'organes porcins chez des primates soumis à une immunosuppression classique combinée à une immunosuppression novatrice.	135
Tableau 9 : résumé des traitements testés pour prévenir le rejet de xéno greffe chez les receveurs traités par l'Ad- CTLA4Ig.	169

Introduction Allotransplantation

I-Les différents types de rejet de greffe

I-1 Le rejet hyperaigu

En allotransplantation, le terme d'hyperimmunisé se réfère à des individus ayant des niveaux détectables d'anticorps dirigés contre les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II et contre les protéines du système sanguin ABO. Ces anticorps ont généralement été induits par une précédente greffe, une transfusion sanguine ou une immunisation foeto-maternelle à la suite d'une grossesse. Lors de la revascularisation du greffon, ces anticorps se fixent sur l'endothélium vasculaire induisant son activation. Celle-ci se traduit par l'acquisition rapide d'un phénotype pro-coagulant conduisant à une thrombose des gros vaisseaux. Les anticorps préformés activent également la voie directe du complément qui va endommager l'endothélium via la formation de pores par le complexe d'attaque membranaire et la désorganisation du cytosquelette. Ces deux mécanismes aboutissent à la perte rapide de la greffe (quelques minutes à quelques heures après la revascularisation). En transplantation humaine, l'analyse systématique de la présence de ces anticorps avant la greffe (test de cross-match) grâce aux travaux de Dausset et Terasaki a permis de réduire considérablement l'incidence de ce rejet qui est devenu extrêmement rare.

I-2- Le rejet aigu

Hormis le rejet hyperaigu, devenu exceptionnel, le rejet cellulaire est, chronologiquement, le premier type de rejet auquel est soumise une allogreffe. Chez le rat, dans le cas d'organes vascularisés et en l'absence de tout traitement, il survient en moyenne dans la semaine qui suit la greffe.

Le rejet aigu se caractérise par une infiltration interstitielle plus ou moins dense de lymphocytes et de macrophages auxquels peuvent s'associer, dans certains rejets de grade élevé des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Les lymphocytes alloréactifs sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires drainant le site de la greffe, soit par présentation directe via les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur, soit par la voie indirecte de présentation.

I-3- Le rejet chronique

Le rejet chronique (RC) se caractérise par une détérioration lente, progressive et irréversible des fonctions du greffon. C'est aujourd'hui la principale cause d'échec en transplantation (50% des greffés cardiaques développent un rejet chronique dans les 7 ans qui suivent la greffe, 50% des greffés pulmonaires durant la 1ère année post-greffe). L'étude histologique du greffon montre une fibrose périvasculaire et interstitielle associée à des lésions vasculaires touchant principalement les artères. Ces lésions se caractérisent notamment par une prolifération de l'intima et de la média, aboutissant à l'obstruction progressive des vaisseaux. Le rejet chronique est actuellement irréversible et aboutit à la perte du greffon à long terme.

Les mécanismes impliqués dans le rejet chronique sont difficiles à cerner ; ils comprennent des facteurs immunologiques (réaction alloimmune à bas bruit) et des facteurs non immunologiques (ischémie, toxicité médicamenteuse, hypertension artérielle, infection (CMV)...). Cependant, des études menées chez les rongeurs semblent indiquer que la réponse immunologique joue un rôle important dans le développement de ce rejet. Le rejet chronique semble en effet être lié à l'activation indirecte de lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-4 et de l'IL-10, alors que l'activation par la voie directe semble plutôt liée au rejet aigu (Qin, Chavin et al. 1996; Raisanen-Sokolowski, Mottram et al. 1997; Ciubotariu, Liu et al. 1998; Lee, Yamada et al. 2001). Cependant d'autres études ont également montré une diminution des lésions de rejet chronique dans un modèle de souris déficientes en T CD8⁺ produisant de l'IFN γ , suggérant également un rôle de ces cellules dans le développement du RC (Tellides, Tereb et al. 2000; Fischbein, Yun et al. 2002). Le rôle des lymphocytes T a été également étudié chez le rat chez lequel plusieurs études ont montré que le blocage de plusieurs voies de costimulation permet de prévenir le rejet chronique dans des modèles de greffe cardiaque ou rénale. Ainsi, l'inhibition spécifique du CD28 permet de prévenir le rejet chronique dans un modèle de greffe rénale (Haspot, Seveno et al. 2005). D'autre part, les mêmes effets peuvent être obtenus dans un modèle de greffe cardiaque par l'inhibition simultanée des voies CD40/CD40L et ICOS/ICOSL (Guillonnet, Aubry et al. 2005) ou CD40/CD40L et CD28/B7 (**article 2**).

Le rôle des anticorps est quant à lui encore controversé. Des données cliniques et expérimentales chez le rongeur ont montré une corrélation entre l'apparition d'alloanticorps et le développement de RC (Rifle, Mousson et al. 2005) (Pirenne, Kitade et al. 2005). Cependant, d'autres études ont montré que le rejet chronique peut survenir en l'absence d'alloanticorps (Guillot, Menoret et al. 2003).

II- Présentation antigénique et mise en place du rejet de greffe

II-1 Les voies de présentation antigénique

II-1.1 La voie directe de présentation

A l'origine de la présentation directe se trouvent les CPA présentes dans les tissus greffés et qui ont été activées par l'inflammation consécutive à la greffe, due notamment à l'ischémie-reperfusion. Elles migrent alors vers les organes lymphoïdes et présentent leurs antigènes associés aux molécules du CMH de classe I et II du donneur. Cette activation des lymphocytes par la voie directe a été mise en évidence dès 1976. Lafferty et collègues ont montré que la déplétion des leucocytes passagers du greffon par une culture *in vitro* préalable à la greffe (Bowen, Andrus et al. 1980) (Talmage, Dart et al. 1976) permet de prévenir le rejet. *In vivo*, le placement du greffon dans un hôte intermédiaire permet de prolonger la survie (Batchelor, Welsh et al. 1979; Welsh, Batchelor et al. 1979). L'ajout de cellules dendritiques du donneur permet de restaurer l'immunogénicité du greffon (Lechler and Batchelor 1982). L'activation par la voie directe de présentation est rendue possible par la réactivité croisée entre les cellules T du receveur, restreintes au soi, et les molécules du CMH du donneur (Bluestone, Kaliyaperumal et al. 1993; Reiser, Darnault et al. 2000). La réponse directe diminue au cours du temps, au fur et à mesure que les CPA du donneur disparaissent. Ainsi, chez des patients ayant reçu une greffe cardiaque ou rénale, la fréquence des lymphocytes T présentant une allospécificité directe décroît au cours du temps (Hornick, Mason et al. 1998) (Baker, Hernandez-Fuentes et al. 2001).

Cependant, la réponse directe peut être maintenue au cours du temps via l'endothélium du greffon. En effet, il a été montré que les cellules endothéliales murines et humaines peuvent activer les lymphocytes T CD8⁺ par la voie directe de présentation (Lodge and Haisch 1993; Epperson and Pober 1994; Kreisel, Krupnick et al. 2002b). Ces cellules expriment notamment les molécules de costimulation B7 (souris) (Kreisel, Krupnick et al. 2002a) et ICOSL (homme) (Klingenberg, Autschbach et al. 2005) permettant ainsi une activation efficace sur le site de la greffe.

II-1.2 La voie indirecte de présentation

Lors de la présentation indirecte, les lymphocytes T sont activés par les CPA du receveur qui ont capté et apprêté des antigènes issus des cellules du donneur. Ce mécanisme est la voie

normale de présentation des antigènes lors de toute réponse immunitaire. La voie indirecte de présentation peut suffire à elle seule à induire un rejet de greffe. Ainsi, il a été montré que des receveurs déficients pour les molécules de classe I du CMH sont capables de rejeter une greffe de peau d'un donneur déficient pour le CMH II. La voie directe de présentation n'étant pas possible dans cette combinaison, c'est donc la voie indirecte qui est seule responsable du rejet (Auchincloss, Lee et al. 1993). Une autre étude a également montré que le transfert de lymphocytes T CD4⁺ spécifiques d'un peptide issu de la molécule de classe I K^d dans une souris RAG^{-/-} ayant reçu une greffe cardiaque de phénotype K^d provoque le rejet rapide de la greffe par la voie indirecte (Honjo, Xu et al. 2004; Honjo, Yan Xu et al. 2004). L'activation indirecte des lymphocytes T CD4⁺ a été la plus étudiée mais il semble que les lymphocytes T CD8⁺ puissent également être activés et participer au rejet. Tout d'abord, il a été montré que le phénomène de présentation croisée des antigènes permet aux molécules du CMH de classe I de présenter des peptides non endogènes (Albert, Pearce et al. 1998; Albert, Sauter et al. 1998).

De plus, des études récentes ont montré que l'endothélium du receveur pouvait également activer de façon efficace les T CD8⁺, mais pas les T CD4⁺, par la voie indirecte de présentation lors d'une greffe de peau (Valujskikh, Lantz et al. 2002).

II-1.3 La voie semi-directe de présentation

L'activation indirecte des T CD8⁺ nécessite la présence d'un T CD4⁺ helper activé par la même CPA. Mais certaines études ont montré qu'un lymphocyte T CD4⁺ présentant une allospécificité indirecte pouvait activer un lymphocyte T CD8⁺ d'allospécificité directe (Lee, Grusby et al. 1994; Wise, Bemelman et al. 1998). Ceci peut s'expliquer par le captage et la présentation de molécules intactes du CMH par les CPA, phénomène appelé présentation semi-directe. Plusieurs équipes ont ainsi observé que les cellules dendritiques sont capables de capter ces molécules de CMH à partir d'autres cellules dendritiques ou de cellules endothéliales (Herrera, Golshayan et al. 2004). Ces cellules sont alors capables d'activer des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs (Herrera, Golshayan et al. 2004) (Bedford, Garner et al. 1999). L'observation précédemment citée selon laquelle les cellules endothéliales peuvent activer les T CD8⁺ pourrait également s'expliquer par ce mécanisme semi-direct, d'autant plus qu'il a été montré que l'activation T par la voie directe pouvait s'effectuer en dehors des organes lymphoïdes secondaires, probablement au niveau de la greffe elle-même (Baratin, Bonin et al. 2004). Ainsi il se pourrait que cette activation semi-directe puisse elle aussi se dérouler au niveau du greffon.

II-2 Les effecteurs du rejet aigu

II-2.1 Les lymphocytes cytotoxiques

Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans le rejet d'une allogreffe vascularisée. Ces réponses effectrices peuvent provoquer la destruction du greffon de deux façons, soit d'une manière antigène spécifique, soit d'une manière non spécifique via des mécanismes pro-inflammatoires.

Parmi les mécanismes dirigés spécifiquement contre les antigènes du greffon, la génération et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) est l'une des voies principales du rejet. Ces lymphocytes T CD8⁺ sont activés par la voie directe de présentation par les CPA du donneur mais ils peuvent également être activés par les cellules endothéliales du donneur qui, lorsqu'elles sont activées, acquièrent des capacités de présentation suffisantes pour induire le rejet (Kreisel, Krupnick et al. 2002a; Kreisel, Krupnick et al. 2002b). L'activation des CTL qui peut être indépendante ou non des lymphocytes T CD4⁺ (Zhai, Meng et al. 2003) et de la costimulation (Jones, Van Maurik et al. 2000; Zhai, Meng et al. 2003), se traduit par la formation de granules cytotoxiques contenant des molécules solubles comme la perforine, les granzymes, ou la granulysine et des protéines membranaires telles que Fas ligand (FasL). L'interaction du TCR avec le CMH de classe I de la cible provoque la fusion des granules cytotoxiques avec la membrane du CTL et la libération de leur contenu au niveau de la synapse immunologique. En présence de calcium, les perforines s'assemblent pour former des pores dans la membrane de la cellule cible permettant ainsi l'entrée des granzymes B. Ces granzymes vont alors induire l'apoptose de la cellule cible par plusieurs mécanismes, notamment l'activation directe de la procaspase 3 et l'activation indirecte de la procaspase 9 (Sutton, Davis et al. 2000; Trapani, Davis et al. 2000; Wang, Wieckowski et al. 2001).

Une deuxième voie effectrice des CTL passe par l'interaction Fas/FasL entre le CTL et sa cible. FasL peut, soit être inclus dans les granules cytotoxiques, soit être exporté directement à la membrane. Les mécanismes effecteurs résultant de l'activation de Fas sur la cellule cible passent également par les caspases et produisent les mêmes effets que le granzyme B. FasL peut être détecté lors de rejet d'allogreffe chez l'homme (Oh, Kim et al. 2001) mais il ne semble pas être la voie privilégiée d'action des CTL dans le rejet d'allogreffe. Des études *in vitro* ont en effet montré que l'inhibition des granzymes B réduit l'apoptose de cellules rénales exposées à des CTL issus de patients en rejet aigu, ce que ne fait pas l'inhibition de FasL (Wever, Boonstra et al. 1998).

II-2.2 La réaction d'hypersensibilité retardée.

La réaction d'hypersensibilité retardée (DTH : Delayed-type Hypersensitivity) est médiée principalement par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de type Th1 qui sécrètent des cytokines telles que l'IFN γ ou le TNF (Tumor Necrosis Factor). Ces cytokines possèdent une action pro-inflammatoire, elles induisent notamment l'activation des monocytes et des macrophages. Cette activation se traduit entre autre par la production de nouvelles cytokines et de chémokines, ainsi que par la sécrétion d'enzymes protéolytiques et de monoxyde d'azote qui accentuent l'inflammation. Les molécules pro-inflammatoires produites lors de la DTH jouent également sur la physiologie de la greffe, en perturbant l'intégrité vasculaire du greffon. Des études menées chez la souris et chez l'homme ont montré que la DTH est contrôlée par le TGF β (Transforming Growth Factor β) et l'IL-10 chez des receveurs tolérant leur greffon cardiaque, rénal ou hépatique (Bickerstaff, VanBuskirk et al. 2000; VanBuskirk, Burlingham et al. 2000).

II-2.3 Les anticorps et le complément.

Les alloanticorps dirigés, soit contre le système ABO, soit contre les molécules de CMH, peuvent induire plusieurs types de réponses. Tout d'abord, ils peuvent déclencher l'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) en recrutant les cellules NK (Natural Killer) et les macrophages via leurs récepteurs aux fragments Fc. L'activation des cellules NK déclenche l'activation du système perforine/granzyme, alors que l'activation des macrophages se traduit par le relargage de monoxyde d'azote, de TNF α et des espèces réactives de l'oxygène. La fixation des alloanticorps peut également provoquer le recrutement et l'activation du système du complément.

Toutefois, contrairement au rejet hyperaigu qui est clairement dépendant des anticorps, leur rôle dans le rejet aigu reste controversé. En effet, les lymphocytes B ne constituent pas la population majoritaire observée lors de biopsies de patients présentant un rejet aigu. De la même façon, des dépôts d'immunoglobulines et de complément ne sont pas systématiquement retrouvés. A l'inverse, des études chez la souris ont montré une contribution des alloanticorps dans le rejet aigu. Ainsi, dans un modèle de souris déficientes en immunoglobulines, le transfert de sérums immuns accélère le rejet (Brandle, Joergensen et al. 1998; Wasowska, Qian et al. 2001). Des études ultérieures ont également montré qu'aussi bien les fractions fixant le complément (IgG2b), que celles qui ne fixent pas le complément, participent aux mécanismes du rejet (Rahimi, Qian et al. 2004).

II-3- L'activation lymphocytaire T

L'activation des cellules alloréactives nécessite trois signaux. Le premier signal est constitué par l'interaction spécifique du complexe CMH-peptide avec le TCR (T Cell Receptor) du lymphocyte T. Le second signal est fourni par l'interaction des molécules de costimulation présentes sur les CPA avec leurs récepteurs exprimés par les lymphocytes T. La combinaison de ces signaux permet la synthèse et la sécrétion de cytokines, notamment l'IL-2, ce qui constitue le troisième signal.

II-3.1 Le signal antigénique

Le TCR étant dépourvu de domaine intracytoplasmique, le signal résultant de son interaction avec les molécules de CMH de classe I ou II de la CPA est transmis au lymphocyte par l'intermédiaire du complexe CD3. Ce complexe, lié de façon non covalente au TCR, se compose de 6 sous unités : γ , δ et 2 sous unités ϵ et ζ . En plus du CD3, le TCR est également associé à des co-récepteurs, CD4 ou CD8, qui déterminent le type de CMH reconnu par le TCR. Le CD4 et le CD8 reconnaissent des régions non polymorphes des molécules de classe II et de classe I, respectivement. Ces co-récepteurs sont associés avec la tyrosine kinase p56Lck.

La reconnaissance d'un complexe CMH-peptide par le TCR entraîne son oligomérisation et la phosphorylation du CD3 par la p56Lck au niveau de ses motifs ITAM (Iwashima, Irving et al. 1994). Ceci va ensuite déclencher une cascade de signalisation à l'origine du signal antigénique.

III-3.2- La costimulation

Un deuxième signal est nécessaire à la pleine activation lymphocytaire. En son absence, le lymphocyte devient anergique et réfractaire à toute stimulation pour un temps donné (Jenkins and Schwartz 1987). Cette anergie peut être levée en court-circuitant le second signal par un apport exogène d'IL-2 qui constitue le troisième signal.

Le deuxième signal est fourni par un ensemble de molécules qui augmentent l'avidité de l'interaction TCR/CMH-peptide et qui amplifient le signal transduit par le complexe TCR-CD3. Enfin, les molécules de costimulation elles-mêmes transduisent un signal au lymphocyte T, indépendamment du CD3 (Bjorndahl, Sung et al. 1989). De nouvelles molécules de costimulation sont découvertes régulièrement et parmi elles on distingue plusieurs familles, notamment la

superfamille des immunoglobulines (dont CD28 et CTLA4), la superfamille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) (dont CD40L) et la superfamille des intégrines. Notre étude s'étant plus particulièrement intéressée au rôle des molécules CD28, CTLA-4 et CD40L, seules ces molécules seront présentées en détail. Un résumé non exhaustif présente les autres signaux de costimulation dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Tableau non exhaustif des signaux de costimulation impliqués dans l'activation lymphocytaire T.

	Récepteur	Ligand	Effet
Super famille des Ig	ICOS	ICOSL	Activateur
	CD28	B7-1 et 2	
	PD-1	PDL-1 et-2	Inhibiteur
	BTLA	HVEM ?	
	CTLA-4	B7-1 et 2	
Super famille du TNFR	4-1 BB	4-1 BBL	Activateur
	HVEM	LIGHT	
	OX40	OX40L	
	TRANCE	RANK	
	GITR	GITRL	
	CD27	CD70	
Intégrines	LFA-1	ICAM-1	Activateur
	VLA-4	VCAM-1	

III-3.3- Le signal des cytokines

Suite aux signaux 1 et 2, le lymphocyte progresse dans le cycle cellulaire jusqu'à la mitose. Lors de ce processus, les signaux émanants des cytokines sont décisifs et déterminent le devenir des cellules. L'IL-2 joue notamment un rôle pivot dans ce processus en induisant des signaux de prolifération et de différenciation, c'est pourquoi son expression est finement régulée par les signaux émanants du TCR et de ses co-récepteurs. Certaines molécules immunosuppressives telles

que la cyclosporine A ou le FK506 agissent en inhibant la synthèse d'IL-2, bloquant ainsi la prolifération des cellules alloréactives (Clipstone and Crabtree 1992).

II-4 La différenciation des lymphocytes T

II-4.1 La différenciation des lymphocytes T CD4⁺

Les travaux de Mosmann et collègues ont permis de distinguer deux sous-populations lymphocytaires T CD4⁺, les Th1 et les Th2, d'après leur profil d'expression cytokinique (Mosmann, Cherwinski et al. 1986). Les cellules T helper 1 produisent de l'IFN γ , de l'IL-2 et le TNF β . Cette sous-population induit également la commutation de classe des Ig vers l'isotype IgG2b chez le rat (Gracie and Bradley 1996). Elle contrôle certaines réponses humorales et les réponses cellulaires telles que l'activation des cellules T CD8⁺ cytotoxiques et la réponse d'hypersensibilité retardée. La sous-population Th2 produit de l'IL-4, de l'IL-13, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-9 et de l'IL-10. D'autre part, elle dirige la commutation de classe vers les isotypes IgG1 et IgG2a (Saoudi, Bernard et al. 1999) et favorise la réponse humorale et l'hypersensibilité allergique.

Ces deux populations dérivent d'une population unique appelée Th0, elle-même dérivant de cellules naïves CD4⁺ sécrétant de l'IL-2 et de l'IL-4. L'avidité du TCR pour le complexe CMH-peptide, la nature des molécules de costimulation et de la CPA (macrophage, cellule dendritique), ainsi que l'environnement cytokinique, influencent la différenciation vers l'un ou l'autre phénotype (Murphy and Reiner 2002). Ainsi, la réponse à l'ovalbumine sera plutôt de type Th2 si la présentation du peptide est effectuée par des lymphocytes B alors que les cellules adhérentes génèrent plutôt une réponse Th1 (Gajewski, Pinnas et al. 1991). Chez la souris, les cellules dendritiques CD8 α^+ produisent de l'IL-12 et stimulent la différenciation Th1. A l'inverse, les CD8 α^- induisent plutôt une différenciation Th2 (Maldonado-Lopez, De Smedt et al. 1999). De la même façon, l'engagement de B7-2 avec la molécule de costimulation CD28 est nécessaire au développement d'un phénotype Th2 alors qu'un phénotype Th1 est généré indifféremment avec B7-1 ou B7-2 (Ranger, Das et al. 1996). Enfin, il existe une inhibition réciproque entre les deux sous-populations. Ainsi, *in vitro* la présence d'IL-4 favorise le développement de cellules Th2 et inhibe le développement des cellules Th1. A l'inverse, l'IFN γ favorise l'obtention d'un phénotype Th1 (Swain, Weinberg et al. 1990). L'environnement cytokinique influence également le devenir des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Cet environnement est généré non seulement par la CPA mais également par d'autres populations telles que les mastocytes ou les basophiles qui sécrètent de l'IL-6 et de l'IL-4, favorisant ainsi un phénotype Th2 (Diehl and Rincon 2002) (Dorado, Jerez et

al. 2002). Enfin, il faut noter que la population T CD4⁺ ne se limite pas à une dichotomie Th1/Th2 mais qu'il existe également d'autres sous-populations comme les cellules régulatrices Tr1 ou Th3 qui seront détaillées dans le chapitre consacré aux cellules régulatrices.

II-4.2 La différenciation des lymphocytes T CD8⁺

Différentes sous populations sont également présentes au sein de la population T CD8⁺, les Tc1 et les Tc2. Leurs profils cytokiniques sont similaires aux profils Th1 ou Th2, respectivement. Les Tc1 sont définies comme sécrétant de l'IFN γ mais pas d'IL-4 ni d'IL-5. Les Tc2 sont quant à elles des cellules qui sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-5 mais pas d'IFN γ (Paliard, de Waal Malefijt et al. 1988; Croft, Carter et al. 1994; Sad, Marcotte et al. 1995). Les deux sous populations expriment également de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-3 en quantité toutefois plus importante pour les Tc2 que pour les Tc1. Leurs niveaux de perforine et de FasL sont similaires et leur activité cytotoxique est comparable. A la différence des T CD4⁺ qui peuvent se différencier indifféremment en Th1 ou Th2, les T CD8⁺ naïfs montrent une nette préférence pour le profil Tc1. De la même façon que pour les cellules Th1, l'IFN γ et l'IL-12 favorisent un profil Tc1. L'obtention de cellules Tc2 quant à elle nécessite de fortes quantités d'IL-4 et l'inhibition de l'IFN γ .

Cette diversité dans la population T CD8⁺ permet de moduler les réponses effectrices durant une réponse immunitaire. Ainsi, les cellules Tc2 peuvent permettre la coexistence d'une réponse cytotoxique forte et d'une réponse anticorps grâce à leur profil cytokinique similaire à celui des Th2. Cette différence de fonction s'applique également lors d'une greffe. Ainsi, le transfert de cellules Tc1 dans une souris RAG^{-/-} provoque le recrutement de cellules mononucléées et une vasculopathie du greffon cardiaque, alors que le transfert de cellules Tc2 induit le recrutement de polynucléaires basophiles responsables du rejet de la greffe (Delfs, Furukawa et al. 2001). De même, lors d'une greffe de moelle osseuse, les cellules Tc2 semblent favoriser la prise de greffe et prévenir le développement de la GVHD (Graft versus Host Disease)(Fowler and Gress 2000; Erdmann, Jung et al. 2004).

II-5 La costimulation

II-5.1 La famille CD28

La famille CD28 se compose de 5 membres (CD28, CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4), ICOS (Inducible Costimulator), PD-1 (Program Death 1) et BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator)) qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Ig). Ce sont toutes des glycoprotéines transmembranaires de type I composées de domaines Ig extracellulaires et d'une courte queue intracytoplasmique servant à la transduction du signal. Par la suite seule la voie CD28/CTLA-4/B7 sera détaillée.

II-5.1.1 La voie CD28/CTLA-4/B7

II-5.1.1a Structure et expression

Le CD28 est constitutivement exprimé à la surface de la majorité des lymphocytes T CD4⁺ humains et murins et sur tous les T CD8⁺ murins, ainsi que sur 50% des T CD8⁺ humains. D'autres types cellulaires peuvent exprimer le CD28 comme les cellules NK, les neutrophiles (Venuprasad, Parab et al. 2001) et les éosinophiles (Woerly, Roger et al. 1999). Le CTLA-4, quant à lui, n'est que faiblement détectable à la surface des lymphocytes T naïfs ou au repos. Il s'agit en effet d'une molécule inductible localisée dans des granules intracytoplasmiques (Iida, Ohno et al. 2000). Son expression en surface dépend de l'activation du lymphocyte suite à l'engagement de son TCR. Le CTLA-4 est plus fortement exprimé sur les cellules régulatrices CD4⁺CD25⁺ (Takahashi, Tagami et al. 2000) et il peut également être détecté sur les lymphocytes B, les cellules souches CD34⁺ et les granulocytes (Pistillo, Tazzari et al. 2003).

Aussi bien le CD28 que le CTLA-4 lient leurs ligands, les molécules B7, grâce à un motif extracellulaire MYPPPY et ils peuvent s'homodimériser à la surface de la cellule grâce à une cystéine unique présente sur le domaine extracellulaire. Cependant, alors que le CD28 lie un dimère de molécules B7 de façon monovalente, le CTLA-4 peut quant à lui interagir avec les molécules B7 de façon divalente, ce qui aboutit à la formation d'une structure en forme de fermeture éclair. Ceci permet au CTLA-4 de lier les molécules B7 avec une plus forte avidité et une plus faible constante de dissociation que le CD28 (Stamper, Zhang et al. 2001). Le domaine intracytoplasmique du CD28 contient un motif YMNM qui lui permet de recruter la PI3 kinase alors que la partie intracytoplasmique du CTLA-4 lui permet de recruter des phosphatases telles que SHP-2 (Lee, Chuang et al. 1998) et PP2A (Chuang, Fisher et al. 2000). Cette différence dans

les molécules de transduction du signal fait partie des mécanismes qui permettent à ces deux protéines d'avoir des effets différents tout en liant les mêmes ligands.

Les molécules B7 sont les ligands du CD28 et du CTLA-4. Elles sont présentes sur de nombreux types cellulaires capables de présentation antigénique, notamment les cellules dendritiques (Vandenberghe, Delabie et al. 1993), les macrophages (Vandenberghe, Delabie et al. 1993), les lymphocytes B (Freedman, Freeman et al. 1987) ou les cellules interdigitées spléniques et ganglionnaires (Vandenberghe, Delabie et al. 1993).

B7-1 (CD80) est exprimée sur les cellules présentatrices d'antigènes en réponse à des stimuli de maturation, alors que B7-2 (CD86) est présente constitutivement à de faibles niveaux. Son expression augmente rapidement lors de l'activation de la cellule dendritique (Inaba, Witmer-Pack et al. 1994). Malgré un domaine intracellulaire court, il a été récemment montré que les molécules B7 sont capables de transduire un signal à la CPA (Grohmann, Orabona et al. 2002), ce qui implique qu'elles aussi peuvent jouer un rôle dans la modulation de la réponse immune.

II-5.1.1b Les effets immunomodulateurs de la voie CD28/CTLA-4/B7 dans la réponse lymphocytaire T

➤ Le CD28

La voie CD28/CTLA-4/B7 a été la première voie de costimulation décrite et elle est actuellement la mieux caractérisée. CD28 transmet un signal qui agit en synergie avec le signal du TCR pour promouvoir l'activation T. Hormis le cas où l'on utilise un anticorps superagoniste, l'engagement du CD28 seul, en l'absence du TCR, n'a pas d'effet physiologique. Les effets dus au CD28 sont très nombreux et les souris déficientes pour le CD28 ou traitées avec un antagoniste de la voie CD28/B7 présentent une réponse réduite dans de nombreuses conditions, notamment lors d'une réponse anti-infectieuse ou allogénique, lors de la GVHD (Graft Versus Host Disease) ou de l'asthme (pour revue (Acuto and Michel 2003)). Cette inhibition affecte aussi bien la prolifération, la commutation de classe des Ig, la différenciation Th2 ou la réponse cytotoxique des T CD8⁺ dépendante des T CD4⁺ (pour revue (Acuto and Michel 2003)). Des études chez la souris NOD (Non Obese Diabetic) ont montré que la voie CD28/B7 est également nécessaire au développement et à l'homéostasie des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (Tang, Henriksen et al. 2003).

Le recrutement du CD28 au niveau de la synapse immunologique se fait indépendamment du TCR (Acuto, Mise-Omata et al. 2003) et permet notamment de diminuer le seuil d'activation du lymphocyte, ainsi que le nombre d'interactions TCR/CMH-peptide nécessaires à cette activation (Viola and Lanzavecchia 1996). Il est intéressant de noter que des études comparant

l'activation de cellules T naïves et mémoires ont montré que ces dernières sont moins dépendantes du CD28 que les cellules naïves en ce qui concerne la prolifération et la production de cytokines. Ceci pourrait être dû à une expression constitutivement activée de la p56lck ce qui diminuerait ainsi le seuil d'activation du lymphocyte.

Les conséquences moléculaires des signaux transduits par le CD28 sont nombreux. On observe notamment une élévation du calcium intracellulaire, ce qui permet la translocation calcium-dépendante des facteurs de transcription NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cell) et AP-1 (Activator Protein 1). L'engagement du CD28 permet également l'activation de NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Ces facteurs de transcription contrôlent notamment la transcription de nombreux gènes de cytokines comme l'IFN γ , l'IL-4 et surtout l'IL-2 (Thompson, Lindsten et al. 1989; McAdam, Schweitzer et al. 1998) qui agit de façon autocrine et fournit un signal de prolifération. L'interaction CD28/B7 provoque également une surexpression des cyclines D (Boonen, van Dijk et al. 1999) qui, associées aux signaux fournis par l'IL-2, favorisent la progression de la cellule dans le cycle cellulaire et donc sa prolifération. D'autres gènes sont également activés comme ceux régulant le métabolisme du glucose (Diehn, Alizadeh et al. 2002) ou le gène codant pour le facteur anti apoptotique Bcl-xL (Boise, Minn et al. 1995) qui permet la survie des lymphocytes activés.

L'interaction CD28/B7 provoque le recrutement, au niveau de la synapse immunologique, d'autres molécules de costimulation, dont CTLA-4 et ICOS, mais également de molécules de liaison telles que LAT (Linker for Activation of T cell) (Martin, Schneider et al. 2001) ou de protéines kinases nécessaires à la transduction du signal via le TCR. Ces mouvements passent par une réorganisation du cytosquelette qui est initiée par le CD28 (Wulfiging and Davis 1998; Viola, Schroeder et al. 1999). Ainsi, l'enrichissement cytoplasmique en protéine kinase θ qui intervient dans la voie de signalisation du TCR n'est pas possible chez des souris CD28 KO (Huang, Lo et al. 2002). L'effet agoniste de l'engagement du CD28 sur la synthèse d'IL-2 est résumé dans la figure 1.

Enfin, notons que l'effet du CD28 est variable en fonction de la sous population observée : les CD4⁺ naïfs sont plus sensibles que les CD4⁺ mémoires qui sont eux mêmes plus sensibles que les CD8⁺ (Rochford, Riggs et al. 2004).

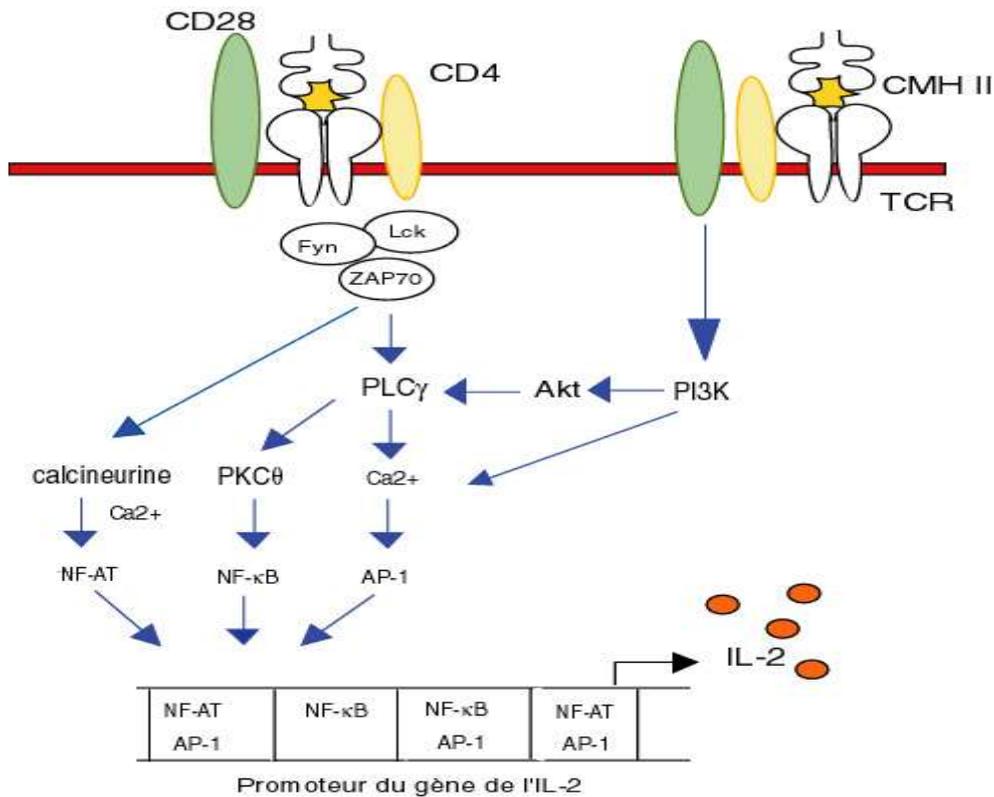


Figure 1 : Schéma récapitulatif des signaux issus de CD28 et aboutissant à la synthèse d'IL-2.

➤ Le CTLA-4

CTLA-4 est un inhibiteur du signal transduit par le TCR et le CD28. Suite à l'engagement de ce dernier, CTLA-4 est exporté à la membrane au niveau du site d'engagement du TCR (Linsley, Bradshaw et al. 1996). Cette proximité du CTLA-4 et du TCR permet la phosphorylation de la tyrosine Y165 du domaine intracytoplasmique du CTLA-4 par une protéine associée au CD3, ZAP-70 (ζ chain Associated Protein). Cette phosphorylation active CTLA-4 et permet son maintien en surface et empêchant son internalisation. La translocation à la membrane du CTLA-4 dépend de la force du signal généré par le TCR (Egen and Allison 2002) : un signal généré par un peptide fortement agoniste induira ainsi une plus grande expression de CTLA-4 en surface qu'un signal généré par un peptide faiblement agoniste. Ceci permet de réguler finement le signal négatif transmis à la cellule.

L'inhibition de l'activation lymphocytaire T peut résulter de deux mécanismes différents. D'une part, le CTLA-4 possédant une affinité plus élevée pour les molécules B7 que le CD28, il peut entrer en compétition avec lui, interrompant ainsi le signal transmis par ce dernier (Alegre, Noel et al. 1996). D'autre part, il a été montré que l'activation du CTLA-4 se traduit par une phosphorylation de la tyrosine Y201 au niveau du domaine intracytoplasmique (Zhang and

Allison 1997). Cette phosphorylation permet d'une part le recrutement de la phosphatase SHP-2 (Marengere, Waterhouse et al. 1996) et d'autre part de la PI3-K (Schneider, Prasad et al. 1995). Le recrutement de SHP-2 permettrait notamment la déphosphorylation de la chaîne ζ du CD3 (Lee, Chuang et al. 1998). L'interaction CTLA-4/CD3 ζ favorise également l'exclusion de la synapse immunologique de cette sous unité du CD3 (Chikuma, Imboden et al. 2003). Cependant, le rôle exact des tyrosines dans la transmission du signal inhibiteur du CTLA-4 reste controversé, des études ayant montré que la délétion de ces acides aminés ne modifiait pas la transduction du signal (Cinek, Sadra et al. 2000).

L'inactivation du CTLA-4, et donc la déphosphorylation de Y201 et de Y165, permet la fixation d'AP-2, une protéine associée au manteau de clathrine. Cette fixation d'AP-2 déclenche l'internalisation de la molécule dans des puits de clathrine (Shiratori, Miyatake et al. 1997; Zhang and Allison 1997).

La coordination entre les signaux générés par le CD28 et le CTLA-4, ainsi que l'importance relative des deux mécanismes inhibiteurs du CTLA-4, ne sont pas encore clairement définis. Cependant, les effets de l'engagement du CTLA-4 sont eux connus : le CTLA-4 inhibe la synthèse d'IL-2, la progression dans le cycle cellulaire et met un terme aux réponses T (Walunas, Lenschow et al. 1994; Krummel and Allison 1995). L'inhibition de la synthèse d'IL-2 s'effectue notamment par l'inhibition de la dégradation de I κ B α , ce qui empêche la translocation de NF- κ B dans le noyau (Pioli, Gatta et al. 1999). Le CTLA-4 agit également en bloquant la synthèse d'éléments nécessaires à la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, notamment la cycline D3 ou cdk4 et 6 (Cyclin Dependant Kinase), ce qui bloque la prolifération lymphocytaire T en phase G0 (Blair, Riley et al. 1998). Chez les lymphocytes T CD4⁺ activés, l'interaction CTLA-4/B7 se traduit en plus par une induction de l'apoptose (Scheipers and Reiser 1998). Cette dernière propriété peut d'ailleurs être utilisée dans la lutte anti-tumorale via l'activation des caspases 8 et 3, certaines tumeurs exprimant CTLA-4 (Contardi, Palmisano et al. 2005).

A cause de ses multiples effets, le CTLA-4 joue un rôle important dans le contrôle des réponses immunes et de l'homéostasie lymphocytaire. En effet, les souris déficientes pour cette molécule de costimulation présentent des désordres lymphoprolifératifs qui aboutissent à la mort des animaux en 3 à 4 semaines (Tivol, Borriello et al. 1995). La double déficience CD28 et CTLA-4 permet de restaurer une homéostasie normale (Mandelbrot, Oosterwegel et al. 2001). De la même façon, les souris déficientes pour les molécules CTLA-4 et B7-1 et 2 ne présentent plus de désordres lymphoprolifératifs et ont une espérance de vie normale (Mandelbrot, McAdam et al. 1999).

➤ Les molécules B7

Des études récentes ont montré que le rôle des molécules B7 ne se limite pas uniquement à être des ligands de CD28 et CTLA-4 mais qu'elles peuvent également transduire un message à la CPA qui les exprime. En effet, l'interaction B7/CTLA-4, que ce soit via l'interaction avec le lymphocyte T ou via des formes solubles comme le CTLA4-Ig, induit l'expression d'IDO (indoléamine 2,3 dioxygénase) par les CPA. Une autre étude a également montré que l'incubation de PBMC (Peripheral Blood Mononucleated Cell) avec du CTLA4-Ig induisait l'expression d'IDO non seulement par les CPA mais également par les lymphocytes T CD4⁺ (Boasso, Herbeuval et al. 2005).

Initialement caractérisé chez le lapin, IDO a été décrit comme pouvant inhiber la croissance de pathogènes et de cellules tumorales *in vitro* via la dégradation d'un acide aminé essentiel, le tryptophane (Taylor and Feng 1991). En 1999, un nouveau rôle d'IDO a été suggéré par Mellor et Munn suggérant qu'IDO pouvait inhiber les réponses lymphocytaires T. Depuis, IDO a été impliqué dans la régulation de nombreux phénomènes, notamment l'inhibition des réponses T maternelles dirigées contre le fœtus (Munn, Zhou et al. 1998), la tolérance à certaines tumeurs (Friberg, Jennings et al. 2002) ou comme un facteur protecteur vis à vis de désordres immunitaires (Sakurai, Zou et al. 2002).

L'expression d'IDO est régulée au niveau génique par la présence de différents éléments de réponse au niveau de son promoteur, notamment des éléments de réponse aux interférons de type I (IFN α/β) et II (IFN γ) (Taylor and Feng 1991; Hassanain, Chon et al. 1993). Il existe une forte corrélation entre inflammation, production d'IFN γ et expression d'IDO. Cependant, *in vivo*, suite à une exposition aux lipopolysaccharides bactériens, l'expression d'IDO dépend de la présence de TNF mais pas de l'IFN γ , ce qui indique qu'il existe une voie de signalisation indépendante permettant l'expression de l'enzyme (Fujigaki, Saito et al. 2001). Ainsi, la molécule de fusion CTLA4-Ig a été montrée comme induisant IDO suite à son interaction avec CD80/86 (Grohmann, Orabona et al. 2002) et cette induction dépend ou non de la présence d'IFN γ en fonction des modèles (Mellor, Chandler et al. 2004).

L'expression d'IDO n'est pas nécessairement corrélée à une activité enzymatique. Ainsi, bien que les deux sous populations de cellules dendritiques murines CD8 α^+ et CD8 α^- expriment des quantités similaires d'IDO, seules les CD8 α^+ catabolissent le tryptophane (Fallarino, Vacca et al. 2002). L'activité d'IDO aboutit ainsi à la déplétion du tryptophane dans le microenvironnement de la cellule. Cette déprivation d'un acide aminé essentiel induit un arrêt de la prolifération

cellulaire, ce qui, de plus, pourrait rendre les cellules plus sensibles à l'apoptose (Munn, Shafizadeh et al. 1999; Lee, Park et al. 2002). D'autres études ont également montré que les produits du catabolisme du tryptophane jouent également un rôle dans l'activité immunosuppressive d'IDO. C'est le cas notamment des lymphocytes T CD4⁺ murins ou des cellules T humaines qui sont sensibles à l'acide picolinique ou la kynurénine (Fallarino, Grohmann et al. 2002; Frumento, Rotondo et al. 2002; Terness, Bauer et al. 2002) issus de la dégradation du tryptophane. Outre ces effets directs sur les cellules T, IDO peut également agir de façon indirecte, notamment en agissant sur la cellule dendritique. Bien que cela n'ait pas encore été démontré pour ce type cellulaire, IDO a été montré comme stabilisant les ARN de cytokines produites par des cellules épithéliales ou régulant négativement l'expression des molécules de CMH de classe I sur les kératinocytes (van Wissen, Snoek et al. 2002; Li, Tredget et al. 2004). Ceci suggère que des mécanismes similaires pourraient avoir lieu dans les cellules dendritiques, leur conférant ainsi un phénotype tolérogène.

Plusieurs études ont montré qu'un petit nombre de cellules exprimant IDO pouvait inhiber les réponses T *in vivo* (Mellor, Chandler et al. 2004). L'une des explications possibles à ce phénomène est que ces cellules sont capables de générer de nouvelles cellules régulatrices et ainsi d'amplifier la régulation, permettant d'induire une tolérance systémique. Dans le domaine de la transplantation, l'obtention de cellules IDO⁺ pourrait ainsi être d'une grande importance dans la mise en place d'une tolérance à une allogreffe.

II-5.1.1c Blocage de la voie CD28/CTLA-4/B7 en transplantation

Afin de déterminer le rôle de la voie CD28/CTLA-4/B7 en transplantation, de nombreux modèles ont été générés. Chez la souris, une greffe de peau effectuée chez des receveurs CD28 KO est rejetée avec la même cinétique que chez des receveurs sauvages. La déplétion des lymphocytes T CD8⁺ mais pas des T CD4⁺ permet de prolonger significativement la survie, indiquant que les T CD8⁺ ne sont pas altérés par l'absence de CD28 dans ce modèle (Ha, Bingaman et al. 2001). Dans un modèle de greffe cardiaque, les animaux CD28 KO rejettent leur greffon alors que les animaux traités par CTLA4-Ig ne le font pas (Szot, Zhou et al. 2000). Cependant, chez ces animaux, les populations impliquées dans le rejet sont différentes. Comme dans les modèles de greffe de peau, les T CD4⁺ sont altérés et le rejet requiert la participation des T CD8⁺ (Szot, Zhou et al. 2001). Ce rejet peut être prévenu par le blocage de la voie CD40/CD40L, indiquant qu'un blocage de plusieurs voies de costimulation est nécessaire pour prévenir efficacement le rejet dans ce modèle.

L'utilisation de la molécule CTLA4-Ig dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat permet d'obtenir une longue survie des greffons (Guillot, Mathieu et al. 2000). Cependant, cette longue survie s'accompagne de lésions de rejet chronique et les receveurs ne répondent pas à une stimulation par des antigènes exogènes, indiquant que les animaux ne sont pas immunocompétents. Chez la souris, dans un modèle de tolérance spontanée à une allogreffe hépatique, l'inhibition de l'interaction CTLA-4/B7 empêche l'établissement de cette tolérance (Li, Zheng et al. 2005), ce qui suggère que cette interaction est nécessaire au développement de cellules régulatrices, peut être via l'action d'IDO. Des souris déficientes pour l'IFN γ sont résistantes à l'immunosuppression médiée par le CTLA4-Ig, suggérant que cette molécule transduit un signal aux CPA et ne se contente pas d'inhiber l'interaction CD28/B7 (Konieczny, Dai et al. 1998).

Les souris double KO pour les molécules B7 ne rejettent pas leur greffon cardiaque, indiquant que la voie CD28/B7 est essentielle lors de l'activation des lymphocytes T allogéniques (Szot, Zhou et al. 2000). De plus, l'inhibition sélective de B7-2 par des anticorps bloquants ne permet de prolonger la survie du greffon que si l'interaction CTLA-4/B7-1 est préservée (Judge, Wu et al. 1999). A la lumière de ces résultats, il apparaît que l'inhibition sélective du CD28 pourrait être plus efficace pour prévenir le rejet de greffe car elle laisse libre l'interaction CTLA-4/B7, permettant ainsi de générer un signal régulateur à la fois en direction de la CPA et du lymphocyte T, alors que le CTLA4-Ig ne délivre de signal qu'à la CPA.

Chez la souris, l'utilisation d'un anticorps inhibiteur (clone PV1) (Abe, Vandenberghe et al. 1995) permet de prolonger la survie d'allogreffe cardiaque (Szot, Zhou et al. 2001). Le blocage de la voie CD28/B7 peut également s'effectuer grâce à des anticorps déplétants (clone 37.51), ce qui permet alors de réduire la GVHD en association avec la rapamycine dans un modèle murin (Albert, Yu et al. 2005). Notons également qu'il existe des anticorps agonistes n'induisant pas de déplétion mais au contraire promouvant l'activation des lymphocytes. Ces anticorps (clone JJ316) peuvent être utilisés avec succès dans les maladies auto-immunes telles que l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) et l'EAN (Experimental Auto immune Neuritis) car ils induisent l'activation de cellules régulatrices chez le rat (Schmidt, Elflein et al. 2003; Beyersdorf, Gaupp et al. 2005).

Développé par l'équipe de Thomas Hunig et utilisé chez le rat, le clone anti CD28 JJ319 induit une modulation du CD28 à la surface des cellules sans induire de déplétion des lymphocytes T *in vivo*. *In vitro*, cet anticorps active les lymphocytes T (Tacke, Clark et al. 1995), il doit donc être utilisé sous forme de Fab pour obtenir un effet modulateur. En transplantation, l'anticorps JJ319 permet de prolonger la survie d'allogreffe de cornée (Thiel, Steiger et al. 2005) ou

d'allogreffe cardiaque (Dengler, Szabo et al. 1999; Dong, Yuan et al. 2002). De plus, dans un modèle de rejet chronique de rein utilisant des souches de rats incompatibles uniquement pour les antigènes mineurs d'histocompatibilité, l'anti CD28 permet de prévenir l'apparition des lésions de façon aussi efficace que le CTLA4-Ig (Azuma, Chandraker et al. 1996). La greffe rénale semble un modèle plus permissif à l'établissement d'une tolérance car un traitement d'induction utilisant le JJ319 seul permet d'obtenir une tolérance (Haspot, Seveno et al. 2005) alors que ce même traitement n'induit qu'une prolongation de survie de la greffe cardiaque (Dengler, Szabo et al. 1999). Une longue survie du greffon cardiaque suite à un traitement d'induction ne peut être obtenue qu'en association avec un immunosuppresseur comme la CsA (Dong, Yuan et al. 2002) ou le CD40Ig (**article 2**).

L'intérêt du CD28 réside dans le fait qu'il permet de maintenir l'immunocompétence du receveur lui permettant de répondre à des antigènes exogènes (Haspot, Villemain et al. 2002). De plus, en association avec le blocage de la voie CD40/CD40L, l'inhibition de la voie CD28/B7 par un anticorps anti-CD28 permet d'obtenir une véritable tolérance, sans lésions de rejet chronique (**article 2**).

II-5.2 La voie CD40/CD40L.

II-5.2.1 Structure et expression

CD40 est une protéine d'environ 50 kDa membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Initialement décrite comme étant exprimée par des cellules de carcinome (Koho, Paulie et al. 1984), cette protéine a été ensuite trouvée sur les cellules B lors des phases précoces de différenciation. D'abord considérée comme un marqueur spécifique des cellules B, elle a ensuite été décrite sur d'autres types cellulaires, aussi bien des cellules de l'immunité (monocytes (Alderson, Armitage et al. 1993), cellules dendritiques, lymphocytes T (Armitage, Tough et al. 1993)) que sur des cellules non immunes telles que les cellules épithéliales, les fibroblastes (Yellin, Winikoff et al. 1995) ou les cellules endothéliales (van Kooten and Banchereau 1997).

CD40L (ou gp39 ou CD154) est une protéine de type II exprimée sur les cellules T activées, aussi bien Th0, Th1 que Th2. Bien que principalement restreint aux T CD4⁺, une petite population de T CD8⁺ exprime également CD40L. CD40L est également détectée sur de nombreux autres types cellulaires tels que les mastocytes, les éosinophiles et les basophiles (Gauchat, Henchoz et al. 1995), les cellules B et NK ainsi que sur les cellules dendritiques, les cellules endothéliales et les plaquettes. CD40L est présent au niveau de la membrane de la cellule

sous forme de multimères (Hsu, Lucci et al. 1997). Deux formes tronquées solubles peuvent également être détectées. Ces deux molécules conservent leurs capacités à trimériser, à se lier à CD40 et à transduire un signal (Graf, Muller et al. 1995; Mazzei, Edgerton et al. 1995; Ludewig, Henn et al. 1996).

II-5.2.2 Les effets de l'engagement de CD40 et CD40L

➤ Sur les CPA et les cellules T

Le recrutement de CD40 sur les cellules dendritiques et les macrophages accroît l'efficacité de la stimulation antigénique, notamment en augmentant l'expression de B7 et des molécules d'adhésion à la surface des CPA (Cella, Scheidegger et al. 1996). L'interaction CD40/CD40L induit également la production de cytokines inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-6) qui favorisent la maturation des cellules dendritiques de façon autocrine, ce qui se traduit notamment par une augmentation du CMH II à la surface de la cellule (Cella, Engering et al. 1997) (**figure 2**). Ces cytokines pro-inflammatoires jouent également un rôle sur le devenir des cellules T car elles favorisent la présentation antigénique dans un contexte immunogène plutôt que tolérogène (Finkelman, Lees et al. 1996; Vella, Mitchell et al. 1997). L'interaction CD40/CD40L peut être impliquée dans la polarisation Th1/Th2 de la réponse immune, bien que ces résultats ne soient pas observés dans tous les modèles. Ainsi, dans un modèle de GVHD, l'utilisation d'un anticorps anti CD40L retarde l'apparition de la maladie et favorise un phénotype Th2 (Blazar, Taylor et al. 1997). Cependant, d'autres modèles décrivent une diminution de la production de cytokines sans polarisation vers l'un ou l'autre phénotype (Grewal, Xu et al. 1995; Yang and Wilson 1996). Enfin, il semble que l'interaction CD40/CD40L entre les CPA et les T CD4⁺ soit essentielle pour permettre ensuite l'activation des T CD8⁺ par ces mêmes CPA (Ridge, Di Rosa et al. 1998).

Des études portant sur les voies de signalisation intracellulaire ont montré que les effets de CD40 sont spécifiques de la population cellulaire. La différence réside dans le recrutement différentiel des molécules TRAF (TNF Receptor Associated Factors) au niveau du domaine intracytoplasmique de CD40 (Pullen, Miller et al. 1998).

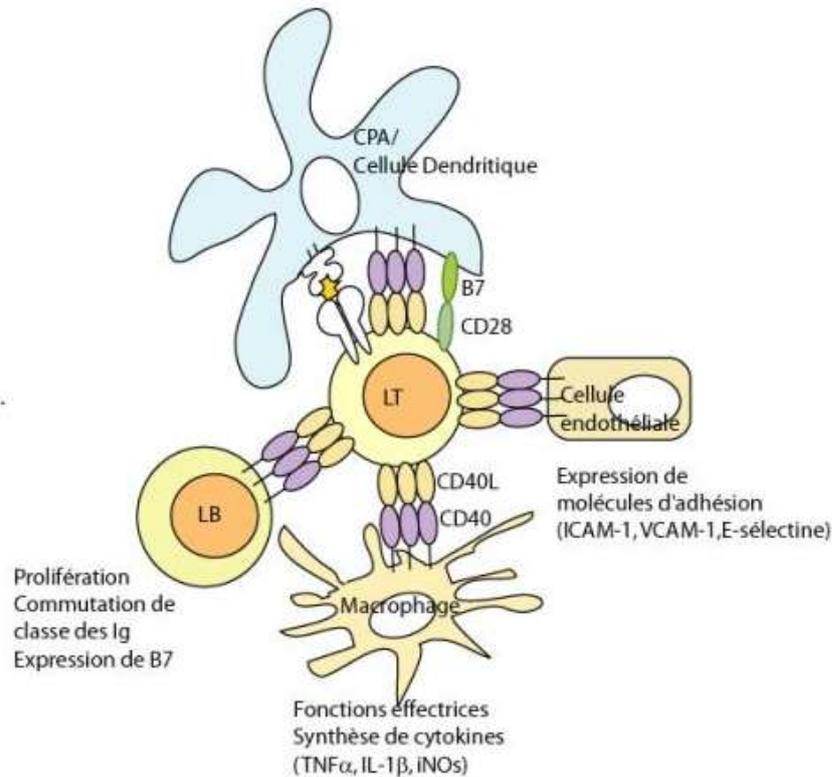


Figure 2 : Rôle pivot de l'interaction CD40/CD40L dans la réponse cellulaire T.

➤ Sur les lymphocytes B

Des études *in vitro* ont montré que l'interaction CD40/CD40L entre les lymphocytes T et B induisait la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, ainsi que la commutation de classe des Ig (figure 2). De plus, CD40 permet l'induction d'une activité télomérase dans les lymphocytes B mémoires (Hu, Lee et al. 1997), ainsi que l'expression de gènes anti apoptotiques tels que Bcl-xL et A20 (Ishida, Kobayashi et al. 1995), permettant ainsi d'augmenter la survie des lymphocytes B. L'activation de CD40 permet également l'expression de molécules de costimulation (B7) et d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1), les molécules de CMH I et II (van Kooten and Banchereau 2000) et d'accroître l'expression des récepteurs de l'IL-2, l'IL-4 et l'IL-5 (Grewal and Flavell 1998).

Ces effets sont illustrés *in vivo* chez les patients présentant un syndrome d'hyper IgM dû à une voie CD40/CD40L défectueuse. Ce syndrome se caractérise par un développement réduit des follicules B (Facchetti, Appiani et al. 1995), une absence de cellules B mémoires et de commutation de classe des Ig (DiSanto, Bonnefoy et al. 1993; Ferrari, Giliani et al. 2001). Les mêmes effets sont observés chez les souris CD40 KO (Castigli, Alt et al. 1994; Kawabe, Naka et al. 1994) ou CD40L KO (Renshaw, Fanslow et al. 1994).

➤ Sur les autres types cellulaires

L'interaction CD40/CD40L permet également d'activer les monocytes et les macrophages de façon T-dépendante via les APC (Stout, Suttles et al. 1996). Elle promeut notamment la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, le TNF α ou MIP-1 α (Kiener, Moran-Davis et al. 1995). CD40 est également exprimé constitutivement sur les cellules endothéliales de certains organes, notamment la rate, le thymus ou les poumons et son expression peut être induite par des cytokines telles que l'IL-1 ou l'IFN γ (Karmann, Hughes et al. 1995; Karmann, Min et al. 1996). De plus, l'interaction CD40/CD40L promeut l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) par les cellules endothéliales, favorisant ainsi l'extravasation des leucocytes sur le site de l'inflammation (Karmann, Min et al. 1996).

Les plaquettes activées expriment également CD40L et elles peuvent induire une activation de l'endothélium (Henn, Slupsky et al. 1998) ainsi qu'une maturation des cellules dendritiques (Czapiga, Kirk et al. 2004). Les plaquettes expriment également le CD40 (Henn, Steinbach et al. 2001) ce qui leur permet d'être activées par les lymphocytes T. L'interaction CD40/CD40L aboutit à la sécrétion de RANTES par les plaquettes, augmentant ainsi le recrutement des lymphocytes au niveau du site de l'inflammation (Danese, de la Motte et al. 2004).

Tableau 2 : Résumé non exhaustif des effets de l'interaction CD40/CD40L sur différents types cellulaires.

Interactions cellulaires	Effets
Cellule T-Cellule B	Réponse humorale Commutation de Classe des Ig
Cellule T-Monocyte/macrophage	Maturation des monocytes en APC Activation des fonctions effectrices des macrophages Prévention de l'apoptose
Cellule T-Cellule dendritique	Activation des lymphocytes T Déviation immune
Cellule T-Cellule endothéliale	Extravasation des leucocytes
Cellule T-Fibroblaste	Inflammation
Cellule T-Cellule musculaire lisse	Athérogénèse

II-5.2.3 La voie CD40/CD40L en transplantation

L'inhibition de la voie CD40/CD40L, associée à une transfusion de cellules du donneur ou DST (Donor Specific Transfusion) a permis d'obtenir des prolongations de survie dans des

modèles d'allogreffes d'îlots chez la souris (Parker, Greiner et al. 1995). Par la suite, l'anticorps anti-CD40L a été utilisé pour retarder la survenue du rejet aigu dans un modèle murin de greffe cardiaque (Larsen, Alexander et al. 1996). Suite à ces résultats, des essais ont été entrepris chez les primates non humains. L'anticorps anti-CD40L humanisé (5c8) utilisé en monothérapie a permis de prévenir le rejet aigu dans des modèles de greffe rénale chez le macaque (Kirk, Burkly et al. 1999) ainsi que dans des modèles de greffes d'îlots chez le macaque (Kenyon, Chatzipetrou et al. 1999) et chez le babouin (Kenyon, Fernandez et al. 1999). Cet effet protecteur persiste pendant une longue période après l'arrêt du traitement. Cependant, des anticorps anti-donneur et des lésions de rejet chronique finissent par apparaître, indiquant qu'il n'y a pas de développement de tolérance. De plus, des cas fréquents de thrombose ont été observés chez les animaux ainsi traités, suggérant que cet anticorps active également les plaquettes et l'endothélium (Kawai, Andrews et al. 2000). Une longue survie associée à des signes de rejet chronique est également retrouvée chez les souris CD40L KO ayant reçu une allogreffe cardiaque (Shimizu, Schonbeck et al. 2000). L'inhibition de la voie CD40/CD40L permet également de diminuer les lésions d'ischémie-reperfusion dans un modèle d'allogreffe hépatique (Ke, Shen et al. 2005). Chez le rat, le blocage de la voie CD40/CD40L par utilisation de la molécule de fusion CD40-Ig ne permet pas non plus d'éviter l'apparition de rejet chronique (Guillot, Guillonnet et al. 2002). Il apparaît donc que le seul blocage de cette voie de costimulation n'est pas suffisant pour induire une tolérance complète vis à vis d'une allogreffe. Des études ont montré que l'association entre l'inhibition de la voie CD40/CD40L associée à une transfusion de cellules du donneur permet d'obtenir une tolérance chez la souris (Hancock, Buelow et al. 1998; Iwakoshi, Mordes et al. 2000) et une longue survie dans un modèle pré clinique chez le primate (Preston, Xu et al. 2005). Par contre, chez le rat, cette même combinaison n'est pas aussi efficace et des lésions de rejet chronique sont encore observées (Sebille, Brouard et al. 2003). L'inhibition d'une deuxième voie de costimulation comme CD28 ou LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1) a également été utilisée avec succès chez la souris (Larsen, Elwood et al. 1996; Corbascio, Mahanty et al. 2002). Chez le rat, l'association CTLA4-Ig/CD40-Ig ne permet pas de prévenir le rejet chronique (Yamashita, Masunaga et al. 2003). Il a également été montré dans notre laboratoire que le double blocage des voies ICOS/ICOSL et CD40/CD40L permet une induction de tolérance chez 57% des receveurs (Guillonnet, Aubry et al. 2005). Plusieurs études ayant montré que l'interaction CTLA-4/B7 était nécessaire à l'établissement d'une tolérance (Zheng, Markees et al. 1999; Iwakoshi, Mordes et al. 2000), il nous a semblé intéressant de bloquer spécifiquement la voie CD28/B7 en association avec l'inhibition de la voie CD40/CD40L (**article 2**).

III La tolérance en transplantation

La tolérance immunologique se caractérise par l'absence de réactivité vis à vis d'antigènes spécifiques. Chez les individus normaux, ces antigènes sont ceux du soi et la rupture de cette tolérance aboutit au développement de maladies auto-immunes. Dans le cas de l'allotransplantation, l'acquisition de la tolérance permet l'acceptation à long terme du greffon sans traitement immunosuppresseur. L'obtention d'un état de tolérance devrait permettre, chez l'homme, de supprimer les traitements immunosuppresseurs dont l'usage à long terme a de nombreux effets secondaires et de prévenir le rejet chronique. Un état de tolérance a été décrit chez de rares patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur, soit à cause d'une non-compliance au traitement, soit à cause de la survenue d'un cancer. L'induction de la tolérance a été initialement décrite dans les années 1960 (Medawar 1961; Brent and Medawar 1967; Gowans 1977). Aujourd'hui, on distingue deux types de tolérance, la tolérance centrale et la tolérance périphérique qui regroupe elle-même plusieurs mécanismes qui seront décrits ci-après.

III-1 La tolérance centrale ou thymique

Le thymus joue un rôle important dans la génération du répertoire lymphocytaire T et donc dans l'induction de tolérance. A leur arrivée dans le thymus, les lymphocytes T immatures subissent deux types de sélection, la sélection positive et la sélection négative. En effet, les lymphocytes T sont tout d'abord sélectionnés pour leur capacité à interagir avec les complexes CMH/peptides présentés par les cellules corticales du thymus. Les cellules ne reconnaissant aucun complexe ne recevront pas de signal de survie et mourront par apoptose. Seuls les lymphocytes T capables d'interagir avec un complexe CMH/peptide seront conservés par cette sélection positive, c'est à dire environ 5% des cellules (Anderson, Partington et al. 1998). Les cellules T autoréactives ayant un TCR de haute affinité pour les complexes CMH/peptides seront ensuite éliminés par sélection négative afin d'éviter le déclenchement de maladies auto-immunes par ces cellules. Plusieurs types cellulaires thymiques peuvent réaliser cette sélection négative dont les cellules dendritiques thymiques (Anderson, Partington et al. 1998). Une population rare, les cellules épithéliales médullaires, a également été montrée comme capable d'exprimer des antigènes de façon ectopique (Smith, Olson et al. 1997; Derbinski, Schulte et al. 2001; Gotter, Brors et al. 2004). Cette capacité est due notamment à l'expression du facteur de transcription AIRE (Auto Immune Regulator) (Liston, Lesage et al. 2003). En son absence, (souris AIRE KO)

la sélection négative ne s'effectue plus et les animaux développent des nombreuses maladies auto-immunes (Anderson, Venanzi et al. 2002).

Outre l'élimination des clones auto-réactifs, le thymus joue également un rôle dans le développement de lymphocytes T régulateurs responsables du maintien de la tolérance en périphérie. Cette population constitue environ 5% des thymocytes matures $CD4^+CD8^-$ et se caractérise par une expression élevée et constitutive du CD25, la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (Itoh, Takahashi et al. 1999). Il apparaît que ces cellules sont sélectionnées en fonction de leur forte avidité pour le complexe CMH II/peptide présenté par les cellules de l'épithélium cortical thymique (Bensinger, Bandeira et al. 2001).

La capacité du thymus à sélectionner les clones T et à générer des cellules régulatrices capables d'agir en périphérie s'observe également lors des cas de chimérisme en transplantation. Le chimérisme se définit comme la détection en périphérie de cellules du donneur. Lorsque cette fréquence est inférieure à 5%, on parle de microchimérisme, dans le cas contraire on parle de macrochimérisme. Le chimérisme hématopoïétique se caractérise par la colonisation du thymus par les cellules hématopoïétiques du donneur qui vont participer à la sélection du répertoire lymphocytaire. En transplantation, le chimérisme hématopoïétique est associé à une induction de tolérance, non seulement chez les rongeurs mais également chez les primates non humains et chez l'homme et cette tolérance persiste même après la perte du chimérisme (Kawai, Cosimi et al. 1995; Spitzer, Delmonico et al. 1999; Buhler, Spitzer et al. 2002). Cependant, les applications cliniques restent limitées, notamment en raison de la toxicité des traitements d'induction. Plus récemment, il a été montré que l'injection de cellules thymiques chez la souris et que la greffe de cellules similaires à des cellules souches hématopoïétiques chez le rat permettaient également d'induire un chimérisme de façon moins contraignante pour le receveur que la greffe de moelle osseuse (Duncan, Capetanakis et al. 2002; Fandrich, Lin et al. 2002).

Les rôles respectifs de la sélection négative et de la suppression de l'alloréactivité par la génération de cellules régulatrices semblent varier en fonction du taux de chimérisme du receveur (pour revue (Kurtz, Wekerle et al. 2004)). En effet, il apparaît que la délétion clonale est le principal mécanisme de maintien de la tolérance dans les cas de macrochimérisme et que le développement de cellules régulatrices joue principalement dans les cas de chimérisme transitoire chez les primates et l'homme (**figure 3**).

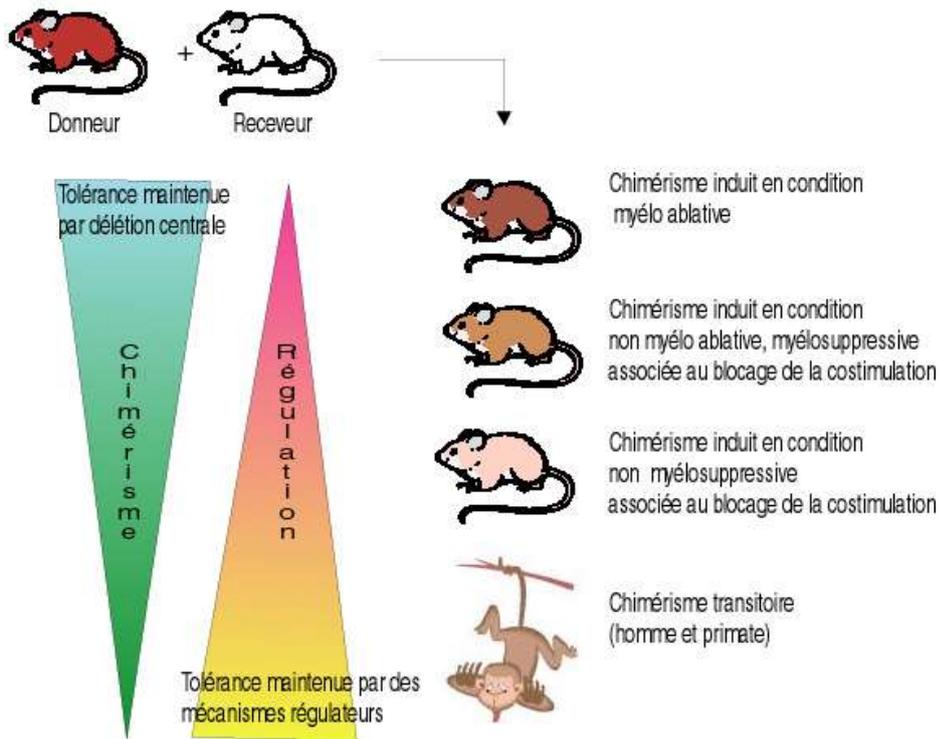


Figure 3 : Balance entre tolérance centrale et tolérance périphérique en fonction du degré de chimérisme.

III-2 La tolérance périphérique

III-2.1 L'ignorance

L'ignorance immunologique correspond à une absence de réponse des lymphocytes T vis à vis d'antigènes pour lesquels ils possèdent cependant un TCR fonctionnel. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine du phénomène d'ignorance. Un faible taux d'antigènes ou la séquestration de ces antigènes dans des sites immunologiquement privilégiés (cerveau, œil) peuvent ainsi causer l'ignorance. Dans un modèle d'allogreffe murine, l'ablation des organes lymphoïdes secondaires promeut l'ignorance des lymphocytes alloréactifs en empêchant l'interaction entre les cellules dendritiques et les cellules T (Lakkis, Arakelov et al. 2000). D'autre part, la greffe d'îlots pancréatiques dans un lieu immunologiquement privilégié tel que le testicule permet de prolonger la survie de ceux-ci mais sans induction de tolérance. Il apparaît que la simple séquestration des antigènes n'est pas suffisante et qu'il y a donc nécessité d'un contrôle actif de l'alloréactivité (Nasr, Wang et al. 2005).

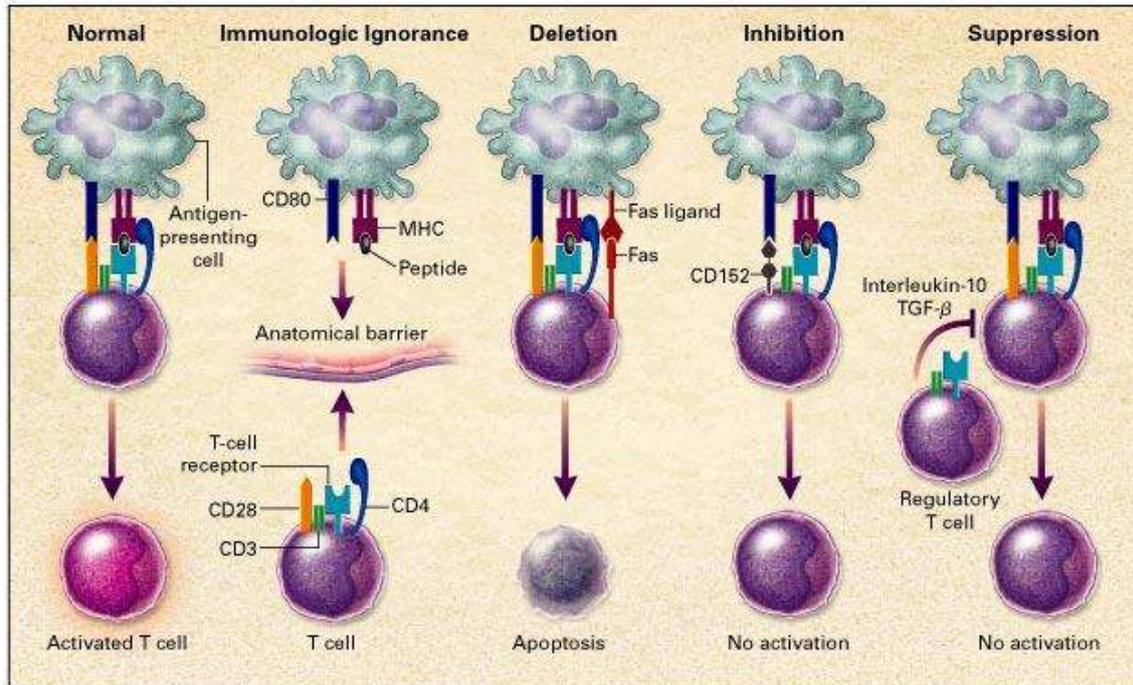


Figure 4 : Mécanismes d'induction de la tolérance périphérique. D'après Kamradt et Mitchison, NEJM 2001.

III-2.2 La délétion clonale

En plus du thymus, la délétion clonale peut également s'exercer en périphérie. L'interaction TCR-CMH/peptide en l'absence de signaux de costimulation peut induire soit l'anergie soit l'apoptose (Ferber, Schonrich et al. 1994). De plus, l'AICD (Activation-Induced Cell Death) peut être induite chez les lymphocytes T CD4⁺ suite à une stimulation répétée par le même antigène en présence de forte quantité d'IL-2. Les lymphocytes de souris déficientes en IL-2 sont résistants à l'AICD (Dai, Konieczny et al. 1998). L'AICD intervient également lors d'une stimulation par une forte concentration d'antigènes, aussi bien chez les lymphocytes T CD8⁺ (Alexander-Miller, Leggatt et al. 1996) que chez les T CD4⁺ (Liblau, Pearson et al. 1994). Cette délétion s'effectue essentiellement par la voie Fas/FasL (Dhein, Walczak et al. 1995) mais il existe également d'autres mécanismes d'apoptose car une tolérance à une allogreffe cardiaque peut être induite chez des souris portant une mutation pour la molécule Fas (Li, Li et al. 1999).

III-2.3 L'anergie

L'anergie se caractérise par l'incapacité des lymphocytes T naïfs activés par un antigène à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par cet antigène (Jenkins and Schwartz 1987). Cet état anergique peut résulter, soit d'une absence de costimulation lors de l'engagement du TCR, soit d'une altération du signal transmis par le TCR, notamment à cause d'un peptide antigénique modifié, de faible affinité pour son récepteur (Sloan-Lancaster, Steinberg et al. 1996). Sur le plan moléculaire, l'anergie nécessite la translocation du facteur de transcription NFAT dans le noyau (Sloan-Lancaster, Steinberg et al. 1996), ce qui induit la synthèse d'un nombre restreint de gènes différents de ceux induits par NFAT/AP-1 lors de l'activation lymphocytaire (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002). L'anergie nécessite également une interaction entre CTLA-4 et les molécules B7 (Chai, Vendetti et al. 2000) et peut être levée *in vitro* et *in vivo* par un apport exogène d'IL-2 (Dallman, Shiho et al. 1991). L'anergie n'est pas un phénomène passif. En effet, *in vitro*, des cellules anergiques peuvent inhiber la prolifération de cellules naïves de façon contact-dépendante (Chai, Bartok et al. 1999). De plus, ces mêmes cellules, lorsqu'elles sont injectées à des receveurs murins d'allogreffes de peau ou d'îlots sont capables de retarder le rejet de greffe (Chai, Bartok et al. 1999; Luo, Gotoh et al. 2000). Elles agissent notamment au niveau des cellules dendritiques en diminuant l'expression du CMH et des molécules B7, ce qui aboutit à la génération de nouvelles cellules anergiques (Vendetti, Chai et al. 2000; Frasca, Scotta et al. 2002).

III-2.4 Les cellules veto

Les cellules veto ont été décrites en 1980 par R. Miller comme des cellules capables d'inhiber les précurseurs des cellules T cytotoxiques dirigés contre les antigènes portés par les cellules veto. Par contre, il n'y a pas d'inhibition vis à vis d'antigènes tierce partie (Miller 1980; Muraoka and Miller 1980). Il a également été montré que les cellules veto les plus efficaces sont des lymphocytes T CD8⁺, notamment les lymphocytes T cytotoxiques (CTL : Cytotoxic T Lymphocyte) (Hiruma, Nakamura et al. 1992) et les T CD8⁺ de la moelle osseuse (George, Sweeney et al. 1998; Goldstein, Chang et al. 2000). Il existe également d'autres types cellulaires possédant une activité veto telles que les cellules NK (Tam, Martinson et al. 2003).

La spécificité de l'effet veto de ces cellules ne dépend pas de leur TCR mais de la reconnaissance de leur complexe CMH-peptide par les cellules effectrices (Claesson 1987; Sambhara and Miller 1994). Les études sur le mécanisme effecteur des cellules veto ont montré que les molécules CD8 et Fas étaient nécessaires à leur activité (George, Sweeney et al. 1998; Reich-Zeliger, Zhao et al. 2000). Ce mécanisme implique tout d'abord la reconnaissance de la

cellule veto par le TCR de la cellule effectrice, ce qui conduit à l'expression membranaire de Fas et au déclenchement de l'apoptose de la cellule effectrice. L'interaction prolongée entre la cellule veto et la cellule effectrice est nécessaire à l'expression de Fas et elle est due notamment à l'affinité du CD8 pour le domaine $\alpha 3$ du CMH I de la cellule effectrice (Sambhara and Miller 1991) mais implique également des molécules d'adhésion telles que LFA1/ICAM1.

En transplantation, les cellules veto ont montré leur efficacité dans des modèles de greffe de moelle osseuse chez l'homme (Gur, Krauthgamer et al. 2002) et dans des modèles de greffe rénale chez le primate (Thomas, Carver et al. 1991). Cependant, leur utilisation restait limitée à cause d'un risque important de GVHD (Graft Versus Host Disease) (Reisner, Gur et al. 2003). Une nouvelle méthode de préparation de cellules devrait permettre une utilisation plus large en permettant de dépléter les cellules alloréactives avant la greffe (Aviner, Yao et al. 2005).

III-2.5 Les cellules régulatrices ou suppressives

Le concept de la suppression des réponses immunes a été largement développé dans les années 1970 (Nishizuka and Sakakura 1969; Gershon and Kondo 1970; Gershon 1975) puis abandonné faute de caractérisation précise de ces cellules. Ce concept a ensuite été redécouvert par Sakaguchi qui a décrit le rôle d'une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant fortement le CD25 (chaîne α du récepteur de l'IL-2) dans le contrôle des réactions auto-immunes chez la souris (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). Depuis, plusieurs populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) ont été caractérisées, les lymphocytes T régulateurs naturels initialement décrits par Sakaguchi, mais également des lymphocytes régulateurs induits CD4⁺ ou CD8⁺.

III-2.5.1 Les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺

Les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ se développent dans le thymus et constituent environ 10% des lymphocytes T CD4⁺ périphériques chez le rat (Itoh, Takahashi et al. 1999) et 1 à 3% chez l'homme (Wing, Ekmark et al. 2002). *In vitro*, ces cellules ne prolifèrent pas et possèdent des capacités suppressives (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998). *In vivo*, la déplétion de ces cellules aboutit à des désordres auto-immuns (Suri-Payer, Amar et al. 1998).

III-2.5.1a Phénotype des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺

De nombreuses études ont cherché à caractériser phénotypiquement ces cellules afin de trouver un marqueur plus fiable que le CD25 dont l'expression augmente chez tous les lymphocytes T activés. Plusieurs marqueurs ont ainsi été décrits comme présents sur les T CD4⁺CD25⁺, notamment CD62L (Szanya, Ermann et al. 2002), CTLA-4 (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995), PD-1, GITR (Glucocorticoid-Induced TNF-Related protein), CD103 (α E β 7 integrin) (Curotto de Lafaille and Lafaille 2002), LAG-3 (Huang, Workman et al. 2004) ou la neuropiline (Bruder, Probst-Kepper et al. 2004). Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique des cellules régulatrices. Seul le facteur de transcription Foxp3 apparaît comme spécifique du développement et de la fonction des lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi 2004). L'importance de Foxp3 a été initialement découverte chez les souris scurfy qui sont atteintes d'un syndrome lymphoprolifératif fatal (Godfrey, Wilkinson et al. 1991). Cette dérégulation est due à une mutation du gène foxp3, ce qui aboutit à la synthèse d'une protéine tronquée ne possédant pas de signal de localisation nucléaire (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Des études ultérieures ont montré que l'expression de Foxp3 était restreinte à la sous-population CD4⁺CD25⁺ (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003). Les souris Foxp3 KO développent un syndrome lymphoprolifératif semblable à celui des souris CTLA-4 KO (Brunkow, Jeffery et al. 2001). De plus, la transduction de cellules CD25⁻ naïves humaines ou murines par un rétrovirus codant pour Foxp3 induit la conversion de ces cellules en cellules régulatrices avec notamment une surexpression de CD25, CTLA-4, GITR et CD103 (Hori, Nomura et al. 2003). Dans le thymus, l'interaction CD28/B7 induit l'expression de Foxp3 par les thymocytes double positifs et les engage dans la voie de différenciation des Treg (Tai, Cowan et al. 2005).

III-2.5.1b Mécanismes suppresseurs des cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺

In vitro, les cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺ ne prolifèrent pas et produisent peu ou pas de cytokines (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 2001; Shevach 2002). Leur activation est spécifique de l'antigène et dépendante de l'IL-2. Cependant, une fois activées, elles inhibent la production d'Il-2 par les cellules cibles de façon indépendante de l'antigène (Thornton and Shevach 1998; Thornton and Shevach 2000). Des études ont également montré que les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ agissent sur les CPA en induisant une diminution de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 ainsi qu'une diminution de leur capacité à stimuler des cellules naïves (Cederbom, Hall et al. 2000; Serra, Amrani et al. 2003).

In vivo, plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans la suppression médiée par les T CD4⁺CD25⁺. Tout d'abord, il apparaît qu'un contact cellulaire soit nécessaire à l'effet

suppresseur de ces cellules. En effet, le traitement de souris avec un anticorps anti-GITR abolit la suppression des cellules autoréactives aboutissant ainsi au développement de désordres auto-immuns (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). De la même façon, le blocage de CTLA-4 inhibe l'effet protecteur de ces cellules dans un modèle murin d'auto-immunité (Read, Malmstrom et al. 2000). Cependant, un mécanisme dépendant des cytokines semble également jouer un rôle dans la suppression. En effet, les cellules régulatrices T $CD4^+CD25^+$ des souris KO pour CTLA-4 surexpriment le TGF β (Tang, Boden et al. 2004). De plus, des anticorps anti-IL-10 et anti-TGF β inhibent l'effet protecteur des Treg dans des modèles murins de thyroïdite et de diabète (Seddon and Mason 1999; Lepault and Gagnerault 2000). Enfin, *in vitro*, plusieurs études ont montré que les Treg sont capables de convertir des cellules $CD4^+CD25^-$ en cellules $CD4^+CD25^+$ produisant de l'IL-10 et du TGF β (Dieckmann, Bruett et al. 2002; Jonuleit, Schmitt et al. 2002). Ce phénomène de tolérance infectieuse nécessite un contact cellulaire entre les T $CD4^+CD25^+$ et les T $CD4^+CD25^-$.

III-2.5.1c Les cellules régulatrices T $CD4^+CD25^+$ en transplantation

Le rôle des Treg $CD4^+CD25^+$ a d'abord été étudié dans des modèles de GVHD suite à une greffe de moelle osseuse. Il a ainsi été montré que la déplétion en Treg des cellules greffées accroît la sévérité de la GVHD (Taylor, Lees et al. 2002). Différents modèles d'induction de tolérance ont également montré que les Treg $CD4^+CD25^+$ étaient impliqués dans la survie d'allogreffe *in vivo* ainsi que dans l'inhibition des réponses prolifératives *in vitro* (Taylor, Noelle et al. 2001; Graca, Thompson et al. 2002; Kingsley, Karim et al. 2002). Le traitement des receveurs par des anticorps neutralisants dirigés contre le CTLA-4, l'IL-10 ou le TGF β permet de rompre la tolérance à une allogreffe de peau (Lee, Moore et al. 2004). D'autre part, ces cellules sont également détectées dans des greffons de peau chez des receveurs tolérants (Graca, Cobbold et al. 2002). Il a également été montré que l'endothélium du greffon pouvait induire des Treg chez la souris, ce qui pourrait jouer un rôle important dans l'induction et le maintien de la tolérance (Krupnick, Gelman et al. 2005).

Au laboratoire, une étude portant sur des patients tolérants ou présentant un rejet chronique de leur allogreffe rénale a montré que le nombre de T $CD4^+CD25^+$ diminue chez les patients en rejet chronique comparativement aux patients tolérants ou aux individus sains (Louis, Braudeau et al. 2006), indiquant que le rejet chronique serait dû à une rupture de la tolérance naturelle. L'utilisation des Treg comme outils thérapeutiques restait limitée du fait de la difficulté à les isoler et à les expandre à partir d'individus sains. Cependant, il est depuis peu possible de les isoler et de

les multiplier *ex vivo* chez l'homme (Koenen, Fasse et al. 2005) et de générer des Treg spécifiques d'alloantigènes chez la souris avant la transplantation chez la souris (Karim, Feng et al. 2005).

III-2.5.2 Les cellules régulatrices T CD8⁺CD45RC^{low}

Les cellules régulatrices T CD8⁺CD45RC^{low} ont été récemment décrites par l'équipe de Saoudi dans un modèle de GVHD chez le rat (Xystrakis, Dejean et al. 2004). Ils ont ainsi montré que ces cellules exprimant faiblement le marqueur CD45 à leur surface sont capables de supprimer la prolifération et la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes de type Th1 (Xystrakis, Dejean et al. 2004) de façon contact-dépendante. Ces cellules régulatrices sont également retrouvées en transplantation. L'inhibition de la voie CD40/CD40L dans un modèle de greffe cardiaque induit des cellules régulatrices T CD8⁺CD45RC^{low} capables de prévenir le rejet aigu mais pas le rejet chronique (Guillonnet, en préparation). Ces cellules expriment des marqueurs associés au phénotype régulateur comme CTLA-4, GITR et Foxp3 (Xystrakis, Dejean et al. 2004)(Guillonnet, en préparation). A la différence des cellules régulatrices naturelles, les cellules T CD8⁺CD45RC^{low} induites agissent par la sécrétion d'IFN γ qui, à son tour, promeut la synthèse d'IDO par les cellules endothéliales du greffon.

III-2.5.3 Les cellules régulatrices induites Th3 et Tr1

Les cellules T CD4⁺ Th3 ont tout d'abord été identifiées par leur capacité à induire une tolérance immune après administration d'antigènes par voie orale (tolérance orale) dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune. Ces cellules produisent de grandes quantités de TGF β (Chen, Kuchroo et al. 1994). Les cellules T CD4⁺ Tr1 sont similaires aux cellules Th3 mais elles produisent préférentiellement de l'IL-10. Elles ont été caractérisées dans un modèle de colite auto-immune chez la souris (Groux, O'Garra et al. 1997). Ces cellules peuvent être générées *in vitro* en présence d'IL-10. Suite à l'engagement de leur TCR, ces clones produisent de l'IL-10, du TGF β et de l'IFN γ . Elles surexpriment également des marqueurs d'activation mais prolifèrent peu (Bacchetta, Sartirana et al. 2002). Bien que les cellules Tr1 présentent certaines similitudes avec les cellules régulatrices naturelles CD4⁺CD25⁺, notamment la capacité de guérir la colite auto-immune (Foussat, Cottrez et al. 2003), elles présentent néanmoins un certain nombre de différences fonctionnelles. Tout d'abord, elles n'expriment pas Foxp3 (Vieira, Christensen et al. 2004). Ensuite, alors que les Treg sont plutôt retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, les Tr1 migrent vers les tissus périphériques pour contrôler localement l'inflammation. Ainsi, il a été montré que les cellules Tr1 pouvait prévenir le développement d'une encéphalomyélite auto-

immune uniquement dans le cas où l'antigène était administré dans le cerveau et non pas de façon systémique (Barrat, Cua et al. 2002). Dans le contexte de l'allotransplantation, des cellules Tr1 ont été retrouvées dans des greffons tolérants en plus grande quantité comparativement aux organes lymphoïdes secondaires (Sawitzki, Lehmann et al. 2001; Graca, Cobbold et al. 2002).

Les cellules Tr1 et Th3 peuvent être induites de plusieurs façons. Tout d'abord, il a été montré que des cellules dendritiques de morphologie plasmacytoïde et de phénotype immature pouvaient sécréter de grandes quantités d'IL-10 et induire le développement de cellules Tr1 *in vitro* et *in vivo* (Wakkach, Fournier et al. 2003). D'autre part, il a également été montré que deux sous populations de Treg sont capables d'induire le développement de cellules Tr1 ou Th3 (Stassen, Fondel et al. 2004) : les T CD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ induisent des cellules Tr1 alors que les T CD4⁺CD25⁺ exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ induisent des cellules de phénotype Th3 (Stassen, Fondel et al. 2004). Enfin, le TGF β produit par les cellules Th3 peut induire l'expression de Foxp3 dans des cellules CD4⁺CD25⁻ qui deviennent alors régulatrices (Chen, Jin et al. 2003).

III-2.5.4 Les cellules suppressives T CD8⁺

Des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ suppressifs (Ts) humains peuvent être induits *in vitro* après plusieurs cycles de stimulation (Jiang, Tugulea et al. 1998; Colovai, Liu et al. 2000). Ces cellules sont capables d'inhiber, de façon antigène spécifique restreinte au CMH I (Jiang, Tugulea et al. 1998), les cellules alloréactives T CD4⁺ helper en agissant sur les cellules dendritiques. Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ induisent l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (Immunoglobulin Like Transcript) à la surface des DC et des cellules endothéliales (Ciubotariu, Colovai et al. 1998; Chang, Ciubotariu et al. 2002; Manavalan, Kim-Schulze et al. 2004). Les CPA acquièrent alors un phénotype tolérogène et sont incapables de surexprimer des molécules de costimulation dépendantes de NF- κ B telles que CD40, CD80 et CD86 (Chang, Ciubotariu et al. 2002). Ce phénomène nécessite un contact cellulaire entre les T CD8⁺CD28⁻ et les CPA. A leur tour, les CPA ILT3⁺ILT4⁺ induisent l'anergie des cellules T CD4⁺ helper et stimulent la génération de cellules régulatrices T CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ et de nouvelles cellules T CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ (Manavalan, Rossi et al. 2003). Des études ont également montré que l'inhibition des T CD4⁺ par les T CD8⁺CD28⁻ serait restreinte à la population CD4⁺ exprimant la molécule du CMH de classe Ib Qa-1 (Sarantopoulos, Lu et al. 2004).

Chez la souris NOD-SCID, la greffe de tissu synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde suivie du transfert de cellules T CD8⁺CD28⁻ permet d'obtenir une forte diminution de

la réponse inflammatoire ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) (Davila, Kang et al. 2005). En transplantation, des cellules T $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ ont été retrouvées chez des patients sans immunosuppression alors que ces cellules sont absentes chez ceux présentant un épisode de rejet aigu (Sindhi, Manavalan et al. 2005). De plus, alors que les Ts sont retrouvés dès les premiers mois suivant la transplantation, les Treg n'apparaissent que plus tard, suggérant que la suppression est initiée par les Ts et maintenue à la fois par les Ts et les Treg via l'amplification du signal tolérogène par les cellules dendritiques (Suciu-Foca, Manavalan et al. 2003).

III-2.5.5 Les cellules T CD25^-

Les recherches d'un phénotype régulateur associé à la tolérance en transplantation ont montré que les cellules T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ sont également capables de prévenir le rejet, avec cependant, une efficacité moindre que les $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ (Graca, Thompson et al. 2002). Les propriétés suppressives de ces cellules ont été étudiées dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes et d'allergie (Stephens and Mason 2000; Curotto de Lafaille, Muriglan et al. 2001; Furtado, Olivares-Villagomez et al. 2001). Il a été montré que des cellules $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ issues de souris KO pour l'IL-2 peuvent prévenir l'induction de l'EAE lorsqu'elles sont transférées chez des souris IL-2^+ (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002). Il faut cependant noter qu'une fraction des cellules transférées devient alors CD25^+ , probablement en réponse à l'IL-2 présente dans leur micro-environnement (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002). A l'inverse, des cellules $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ issues de souris CD25 déficientes n'exercent aucune activité protectrice, ce qui montre l'importance de l'IL-2 dans le fonctionnement des T régulateurs (Furtado, Curotto de Lafaille et al. 2002). De plus, il a également été montré que les cellules T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ pouvaient être converties *in vivo* en cellules $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ possédant les mêmes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles que les Treg naturels (Curotto de Lafaille, Lino et al. 2004), suggérant que l'activité régulatrice de la fraction $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ est due à une conversion en cellules $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$.

III-2.5.6 Les cellules T $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$

Les cellules T régulatrices double négatives (DN) $\text{CD3}^+\text{NK1.1}^+\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ représentent 1 à 3% des lymphocytes T périphériques chez les rongeurs (Zhang, Yang et al. 2000) et 0.8 à 1% des cellules CD3^+ du sang périphérique chez l'homme (Fischer, Voelkl et al. 2005). Ces cellules sont capables de moduler la réponse immune des lymphocytes T CD8^+ autoréactifs (Priatel, Utting et al. 2001) ainsi que les réponses allo et xénogéniques anti-donneur *in vitro* et *in vivo* (Ford, Young et al. 2002; Chen, Ford et al. 2003; Fischer, Voelkl et al. 2005). Dans un modèle d'allogreffe de

peau chez la souris, ces cellules sont capables de retarder le rejet (Zhang, Yang et al. 2000; Ford, Young et al. 2002) et d'atténuer la sévérité des symptômes dans un modèle de GVHD (Young, DuTemple et al. 2003). Les cellules DN induisent l'apoptose des cellules CD4⁺ et CD8⁺ via l'interaction Fas/FasL (Ford, Young et al. 2002) et produisent de grandes quantités d'IFN γ (Lee, Mansfield et al. 2005).

III-2.5.7 Les cellules NKT

Les cellules NKT (Natural Killer T) se caractérisent par la coexpression de marqueurs associés aux cellules NK comme CD161 ou NKR-P1 et du TCR $\alpha\beta$ (Bendelac, Rivera et al. 1997). Une caractéristique de ces cellules est qu'elles reconnaissent des antigènes lipidiques présentés par la molécule du CMH I non classique CD1d (Vincent, Gumperz et al. 2003). Chez l'homme, la majorité des cellules NKT expriment un TCR invariant V α 24V β 11 ainsi que le marqueur CD161 (Wilson and Delovitch 2003). Ces cellules invariantes (iNKT) sont majoritairement CD4⁺ (Loza, Metelitsa et al. 2002). Les cellules NKT ont été montrées comme impliquées dans la tolérance au soi et dans la tolérance allogénique. Ainsi, chez l'homme, une diminution du nombre de cellules NKT V α 24⁺V β 11⁺ est retrouvée chez les patients présentant un diabète auto-immun (Kukreja, Cost et al. 2002). Des cellules NKT sont également retrouvées en grand nombre à l'interface materno-fœtale, ce qui indique qu'elles peuvent jouer un rôle dans la tolérance au fœtus (Boyson, Rybalov et al. 2002). Enfin, les souris déficientes en cellules NKT sont incapables d'accepter à long terme une allogreffe cardiaque dans des modèles de tolérance induits par l'inhibition des voies LFA-1/ICAM-1 ou CD28/B7 (Seino, Fukao et al. 2001). Les mécanismes par lesquels les iNKT régulent la tolérance sont complexes et semblent impliquer une coopération avec d'autres cellules régulatrices notamment les Treg CD4⁺CD25⁺ (Liu, La Cava et al. 2005).

III-2.6 Reconnaissance indirecte, suppression liée et tolérance infectieuse

Les études portant sur les cellules régulatrices se sont notamment focalisées sur leur mode de reconnaissance des alloantigènes. Il a ainsi été montré que la présence continue des antigènes est nécessaire au maintien de la tolérance, suggérant que la voie indirecte soit le mode prédominant de reconnaissance des antigènes (Onodera, Volk et al. 1998). Il a également été montré que les receveurs présentant un défaut de la voie indirecte de présentation développaient difficilement une tolérance suite au blocage de la costimulation (Yamada, Chandraker et al. 2001).

La suppression liée correspond à l'induction d'une tolérance vis à vis d'antigènes non reconnus par les cellules régulatrices. Ce phénomène est possible lorsque les CPA présentent plusieurs antigènes à leur surface. Dans ce cas, plusieurs types cellulaires (cellules régulatrices et cellules naïves) interagissent avec une même CPA. Le signal tolérogène peut alors réduire les cellules naïves en cellules régulatrices, notamment via la sécrétion de TGF β ou d'IL-10 dans le micro environnement. Il a ainsi été montré que l'administration d'un seul alloantigène par voie orale permettait d'induire une tolérance à une allogreffe cardiaque chez la souris (Niimi, Shirasugi et al. 2001). Les cellules ainsi réduquées, ou cellules régulatrices secondaires, peuvent ensuite induire d'autres cellules régulatrices. Ce phénomène s'appelle la tolérance infectieuse (**figure 5**). Le transfert de cellules régulatrices issues de souris tolérantes permet d'empêcher le rejet chez des souris naïves (Waldmann, Cobbold et al. 2001). Les mécanismes par lesquels la tolérance infectieuse se réalise ne sont pas encore élucidés, même si certains travaux indiquent un rôle possible de l'IL-10 et du TGF β (Cobbold and Waldmann 1998).

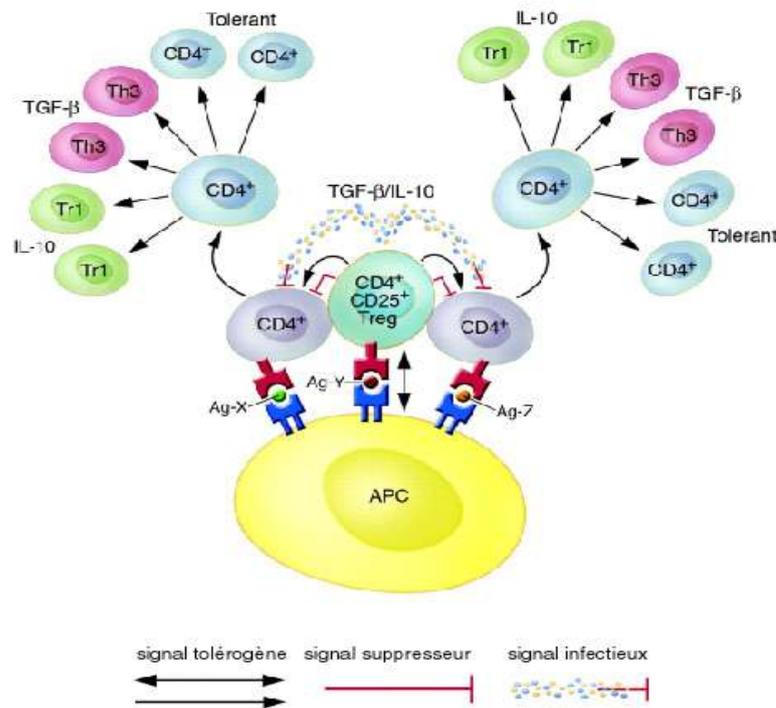


Figure 5 : Suppression liée et tolérance infectieuse induites par les Treg CD4⁺CD25⁺. D'après Walsh, Taylor et Turka, JCI, 2004.(Walsh, Taylor et al. 2004).

En conclusion, le rejet de greffe, qu'il soit aigu ou chronique, reste un problème majeur en transplantation. De nombreuses approches visant à obtenir un état de tolérance stable sont actuellement à l'étude. Parmi celles-ci, le blocage de la costimulation est l'une des stratégies possible. Dans cette première partie nous avons étudié les mécanismes régulateurs qui se mettent en place suite à une courte inhibition de la voie CD28/B7 par l'anticorps modulant JJ319. L'inhibition spécifique du CD28 par le JJ319 permet de laisser libre l'interaction CTLA-4/B7, favorisant ainsi les signaux inhibiteurs pro-toléro-gène. Nous avons étudié les effets d'une telle inhibition dans deux modèles d'allogreffe cardiaque chez le rat.

Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'association JJ319 et cyclosporine A. Il a été démontré que ce traitement permet d'induire une longue survie des greffons (Dong, Yuan et al. 2002) mais les mécanismes effecteurs restent à élucider. Nous avons également comparé ce modèle avec un modèle similaire d'allogreffe rénale développé au laboratoire afin de déterminer si les mécanismes impliqués sont spécifiques de l'organe greffé ou non.

Dans une deuxième partie, nous avons associé le JJ319 au blocage de la voie CD40/CD40L. L'inhibition de cette seule voie induit une longue survie mais également du rejet chronique. Notre hypothèse est qu'une courte inhibition de la voie CD27/B7 permettrait de diminuer les lésions de rejet chronique dans ce modèle en préservant la voie CTLA-4/B7 nécessaire à l'activité des Treg. Cette dernière étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Anegon.

Modèle Expérimental

I : Modèle animal

Les rats utilisés sont des mâles congéniques de fond génétique Lewis. Les donneurs sont âgés de 8 à 12 semaines et ils ne diffèrent que par leurs molécules de CMH (classe I, classe II et classe I like). Dans notre modèle, le donneur est un Lewis 1W d'haplotype RT1^u et le receveur un Lewis 1A d'haplotype RT1^a. Des greffes syngéniques (Lewis 1A sur Lewis 1A) ont été également effectuées pour servir de contrôle. Enfin, les animaux tierce partie utilisés comme contrôles sont des rats Brown Norway d'haplotype RT1ⁿ et de fond génétique différent de celui des Lewis.

La technique de greffe utilisée est celle décrite par Ono et Lindsey en 1969 (Ono and Lindsey 1969). Toutes les anesthésies sont effectuées par isoflurane/oxygène. Brièvement, le cœur du donneur est prélevé après ligature des veines caves inférieures et postérieures et des veines pulmonaires. Le greffon est ensuite lavé avec du sérum physiologique hépariné et conservé dans ce milieu jusqu'à la greffe. Il est ensuite placé en position hétérotopique intra-abdominale chez le receveur. La revascularisation est effectuée par anastomoses termino-latérales entre l'aorte du greffon et l'aorte abdominale du receveur d'une part et entre la veine pulmonaire du donneur et la veine cave inférieure du receveur d'autre part. La greffe dure entre 30 et 40 minutes et est réalisée par le personnel technique de l'animalerie.

La survie du greffon est surveillée régulièrement par palpation à travers la paroi abdominale. Le rejet, défini par la cessation des battements, est confirmé par observation *in situ* après laparotomie puis par analyse anatomopathologique.

II : Inhibition de la costimulation

II-1 Anticorps anti-CD28.

L'anticorps anti CD28 (clone JJ319) est un anticorps de souris dont la fixation sur sa cible induit l'internalisation du CD28. L'hybridome JJ319 fournit par le Dr. Thomas Hunig est cultivé au laboratoire et la purification de l'anticorps est réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine G. La fonctionnalité de l'anticorps est ensuite analysée par cytométrie en flux et comparée à un anticorps référence. La purification d'1.5 L de surnageant de culture permet d'obtenir entre 15 et 20 mg d'anticorps.

II-2 Adénovirus CD40Ig

L'inhibition à long terme de la voie CD40/CD40L a été réalisée en utilisant un adénovirus codant pour la molécule recombinante CD40Ig. Cette technique nous a permis d'obtenir une production et une sécrétion continue de la molécule CD40Ig tout au long de l'expérience.

L'Adénovirus CD40Ig (AdCD40Ig) a été construit à partir de l'adénovirus de sérotype 5 d'origine humaine. Les régions précoces du cycle de réplication virale ont été délétées et remplacées par une construction codant pour CD40Ig. La partie extracellulaire de la molécule CD40 est associée à la région charnière et aux régions CH2 et CH3 de la partie constante de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine (fragment Fc). Cette séquence est placée sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (CMV) (**figure 6A**). La région charnière permet l'homodimérisation de la molécule par des ponts disulfures (**figure 6B**). L'AdCD40Ig nous a été fourni par le Pr P. Löwenstein et sa production est réalisée par l'INSERM-ERM 01.05 du Pr P. Moullier (Nantes).

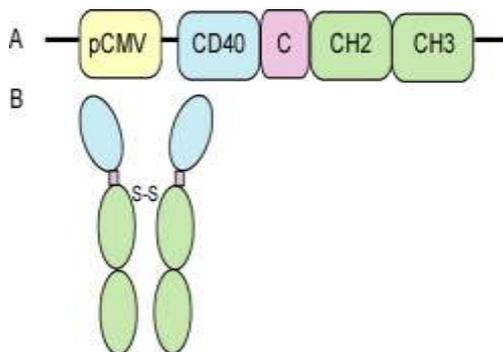


Figure 6 : Représentation schématique de la construction (A) et de la molécule (B) CD40Ig. La partie extracellulaire de CD40 (bleu) est associée à la région charnière (rose) et aux domaines constants CH2 et CH3 (vert) de la chaîne lourde de l'IgG1 humaine. L'ensemble est placé sous le contrôle du promoteur du CMV (jaune).

La présence du fragment Fc permet d'augmenter le poids moléculaire de la protéine et d'augmenter sa durée de vie. En effet, les IgG ne sont pas éliminées par le rein et elles sont recyclées dans la circulation via les récepteurs FcRm présents sur les cellules endothéliales (Salvetti, Oreve et al. 1998). Lors de l'injection, le virus (5.10^{10} PI) est dilué dans une solution de lactate de Ringer stérile puis injecté dans la veine porte. La greffe et l'injection sont réalisées le même jour. Les animaux sont ensuite placés en cage dans des modules à air filtré et en pièce dépressurisée à accès réglementé avec sas d'entrée (A2). La sécrétion *in vivo* de la protéine recombinante a été suivie par dosage ELISA sur le sérum des animaux traités.

La première partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude du rôle de la voie de costimulation CD28/CTLA-4/B7 dans un modèle de rejet aigu chez le rat d'une part, et sur l'effet du blocage simultané des voies CD28/CTLA-4/B7 et CD40/CD40L dans un modèle de rejet chronique chez le rat d'autre part.

Nous avons choisi d'utiliser l'inhibition sélective du CD28 par un anticorps bloquant plutôt que le blocage des interactions CD28/B7 et CTLA-4/B7 par CTLA4-Ig car bien que le CTLA4-Ig soit aussi efficace que le CD28 dans l'inhibition du rejet de greffe (Dong, Yuan et al. 2002), leurs mécanismes d'actions sont sensiblement différents. En effet, le blocage spécifique du CD28 inhibe la prolifération lymphocytaire suite à une stimulation par la voie directe mais pas par la voie indirecte de présentation des antigènes (Haspot, Villemain et al. 2002). De plus, l'inhibition du CD28 permet la génération de signaux inhibiteurs et potentiellement régulateurs en direction des lymphocytes T via le CTLA-4 et en direction des CPA via B7 et IDO (Grohmann, Orabona et al. 2002).

Il a tout d'abord été montré que l'anticorps anti-CD28 seul est capable de retarder la survenue du rejet aigu chez le rat (Dengler, Szabo et al. 1999). De plus, notre équipe a récemment montré qu'un traitement d'induction de 8 jours avec cet anticorps permet d'induire une tolérance (survie à long terme sans rejet chronique) dans un modèle de greffe rénale (Haspot, Seveno et al. 2005) (**annexe 1**). Dans ce modèle, il a été montré la présence de mécanismes régulateurs portés par des cellules non T exprimant le marqueur B7. Nous avons donc voulu tester la possibilité d'induire une tolérance dans un modèle de greffe cardiaque et étudier la mise en place éventuelle de mécanismes régulateurs dans ce modèle afin de déterminer si les mécanismes mis en place sont similaires ou dépendent du type d'organe greffé.

Résultats

Article 1, en préparation

Short term CD28 inhibition associated with CSA induces chronic rejection and B7⁺CD6⁻ regulatory cells acting through IDO

Céline Séveno*, Fabienne Haspot*, Karine Renaudin#, Claire Usal*, Bernard Martinet*, and Bernard Vanhove*.

* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 643 and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France.

#Service d'anatomie pathologique du CHRU de Nantes, Nantes, France.

KEYWORDS : Transplantation, chronic rejection, costimulation blockade, tolerance

Word count :

Address correspondence to: Bernard Vanhove ITERT, INSERM U643, CHU Hotel Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33-240-087-410. Fax: +33-240-087-411. Email:

Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

Running title :

Abstract

Preserved CTLA4/B7 interactions are necessary for the maintenance of peripheral tolerance and for allograft tolerance induction. Targeting specifically CD28, which preserves CTLA4/B7 cross-talk is susceptible to favor tolerance induction. Administration of JJ319, a modulating anti-rat CD28 mAb, induces full tolerance of kidney allograft whereas it only delays cardiac allograft rejection. A suboptimal dose of CSA (10mg/kg from day 0 to day3) synergizes with the JJ319 treatment and leads to long term survival of cardiac allografts. The proliferation of splenocytes from these long term surviving cardiac allograft recipients against donor cells was specifically inhibited. The selective depletion of $B7^+CD6^-$ cells or IDO inhibition with 1-MT restored full proliferation, suggesting that mechanisms taking place in our model are dependant on regulatory cells expressing B7 and acting through IDO. However, this non-responsiveness could not be adoptively transferred to naive irradiated recipients of cardiac allografts, indicating that classical regulatory cells were not present here. In addition, long surviving recipients ultimately developed chronic rejection, indicating that $B7^+CD6^-$ regulatory cells can control acute but not chronic rejection process.

Introduction

Costimulation is required for effector or regulatory T cells to respond optimally following the engagement of their T Cell Receptor (TCR). The CD28/B7 pathway has been widely studied in auto immunity and transplantation. It has been shown that CD28 inhibition delays allograft rejection {Dong, 2002 #4; Dengler, 1999 #2} {Thiel, 2005 #23} and improves GVHD {Yu, 2000 #6}.

Targeting specifically CD28 rather than B7 with CTLA4-Ig preserves the CTLA4/B7 interaction. Indeed, it has been shown that CTLA4/B7 interactions lead to the IFN γ -dependant upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) {Grohmann, 2002 #7}. IDO exhibits immunosuppressive activity through tryptophan catabolism which leads to the deprivation of the micro environment and to the generation of immunosuppressive catabolites such as kynurenine {Fallarino, 2003 #17}. Furthermore, CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells constitutively express CTLA4 and the inhibition of the CTLA4/B7 pathway in a model of spontaneous tolerance leads to liver rejection in the mouse {Li, 2005 #8}. Thus, the specific inhibition of CD28 can inhibit T cell activation and allows the delivery of regulatory signals through B7 and CTLA4.

In a model of acute kidney allograft rejection, the modulating anti CD28 mAb JJ319 alone is sufficient to induce long term survival. {Haspot, 2005 #9}. It also prevents the development of chronic rejection lesions in a model of kidney graft vasculopathy {Laskowski, 2002 #24}. Cardiac allograft however is a less permissive transplantation model as JJ319 mAb used in monotherapy delays rejection but fails to induce tolerance {Dengler, 1999 #2}. However, an induction treatment with cyclosporin A (CSA) synergizes with JJ319 and leads to long term allograft survival {Dong, 2002 #4}. In tolerant recipients, different regulatory cells have been described, including natural and induced regulatory T cells (Treg) {Graca, 2002 #27} {Taylor, 2001 #28}, dendritic cells {Niimi, 2001 #25} {O'Connell, 2002 #26} {Guillot, 2003 #14} and non-T regulatory cells {Haspot, 2005 #9}. The B7⁺CD6⁻ regulatory cells has been recently described in a model of tolerance to kidney allografts following CD28 blockade {Haspot, 2005 #9} and acting through the activation of IDO.

In this study, we studied the regulatory cells that sustain long term cardiac allograft survival in antiCD28+CSA-treated recipients.

Materials and Methods

Animals and cardiac allograft models.

Eight- to 12-week-old male Lewis.1W (LEW.1W, haplotype RT1^u) and Lewis.1A (LEW.1A, haplotype RT1^a) congenic rats (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), differed in their entire MHC region. Heterotopic LEW.1W heart transplantation was performed as previously described {Ono, 1969 #10}. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall.

Anti-CD28 administration.

The modulating JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). In this study, JJ319 was given at a dose of 4 mg/kg/day i.p. from days 0 to 7 post transplantation or from day -1 to day 2 post transplantation and cyclosporine A (CsA) (Neoral) was given per os at a dose of 10 mg/kg from day 0 to day 3.

Histological and morphometric analysis of cardiac grafts.

The upper third of the graft was fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five μ m coronal sections were stained with hematoxylin-eosine-safron. Tissues were analyzed by a pathologist (K.R.) blinded to the groups and chronic rejection was evaluated as previously described {Guillonnet, 2004 #11}. The percentage of vessel occlusion by intimal thickening was determined using the following scoring system: 0 = no occlusion; 1 = <20%; 2 = 20-50%; 3 = 50-80% and 4 = >80%. Vasculitis was quantified using the following scoring system: 0 = no leukocyte adhesion to the endothelium; 1 = leukocyte adhesion to the endothelium; 2 = leukocyte infiltration of the intima; 3 = fibrosis of the intima and 4 = leukocyte infiltration of the media. The percentage of pathological vessels was scored taking into account the presence of vessel occlusion and/or vasculitis. Myocardial fibrosis was quantified using the following scoring system: 0 = no fibrosis; 1 = focal; 2 = diffuse-moderate and 3 = diffuse-severe. Three sections of at least 3 different biopsy levels were analyzed for each graft. Only vessels that displayed a clear internal elastica interna were scored.

Alloantibody detection.

Alloantibodies were analyzed by cytofluorimetry following incubation of ConA-activated allogeneic spleen cells with diluted (1/10) heat-inactivated serum, and then with biotin-conjugated F(ab)'2 goat anti-rat IgG antibodies (γ chain specific) (Jackson ImmunoResearch

Laboratories, West Grove, PA, USA), a mouse anti-rat IgG1 γ MAb (MARG1-2), IgG2a (MARG2a-7) or IgG2b (MARG2b-3) (Technopharm, Paris, France). Antibody binding was revealed using FITC-coupled streptavidin or FITC-coupled F(ab)'2 goat anti-mouse IgG (Jackson Laboratories). Cells were analyzed using a FACScalibur cytofluorimeter (Becton Dickinson, Aalst, Belgium) and the results were expressed as mean channel fluorescence for each serum.

Immunostaining

Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5 μ m sections and fixed in acetone. Alloantibody deposition was assessed by immuno-fluorescence following staining with a FITC-conjugated mouse anti-rat IgM or IgG (Jackson). Tissue sections were mounted using anti-fading mounting medium (Dako, Trappes, France).

Cell purification

Erythrocytes were removed from spleen cell suspensions by hypotonic lysis. T cells were purified from total splenocytes after nylon wool adherence and depletion of 3.2.3 (CD161), OX42 (CD11b/c) and OX12 (Ig κ chain) Mab-reactive cells using magnetic beads (Dynal, Compiègne, France). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 1% HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) and $5 \cdot 10^{-5}$ M 2- β -mercaptoethanol (all from Sigma, St Louis, MO). B7⁺CD6⁻ cells were depleted by FACS sorting (Aria cell sorter, Becton Dickinson) Depletion was always above 98%.

APCs were enriched from LEW.1W or third party BN spleen fragments digested with collagenase D (2 mg/ml) as previously described {Guillot, 2000 #5}. Low density cells were cultured overnight in complete medium. Non adherent cells were harvested and used as dendritic-enriched APCs.

Mixed lymphocyte reactions

Splenocytes or T cells were seeded in triplicate (10^5 cells / well) into round-bottom 96-well plates (Nunc) and evaluated for their proliferative response against irradiated APCs ($5 \cdot 10^4$ cells/well). Cells were cultured for 3 at 37°C, and 1 μ Ci of [³H]thymidine deoxyribose was

added to each well for the final 8 hours of culture. Thymidine incorporation was quantified using a scintillation counter.

For coculture experiments, graft recipient or control LEW.1A were added to responding splenocytes from naïve LEW.1A rats (10^5 cells) and irradiated LEW.1W or BN stimulator APCs ($5 \cdot 10^4$ cells/well) in round-bottomed 96-well plates.

Results were expressed as the percentage (Δ mean cpm \pm SD after subtraction of proliferation in the presence of culture medium) of proliferation of naive cells.

Reagents

Human recombinant IL-2 were added in the culture medium at 100 U/ml. The neutralizing rabbit Ab anti-rat IL-10, anti IL-4R and normal rabbit IgG (both provided by J. Khalife, Institut Pasteur, Lille, France) were used at 10 μ g/ml. N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; Sigma) was added to the medium at 5 mM. IDO inhibition was performed by adding 1-methyl tryptophane (1-MT, Sigma) in the culture medium at 10 μ g/ml. All the reagents were added at day 0 of the experiment.

Statistical analysis.

Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test (analysis of two groups) or Kruskal-Wallis tests followed by a Dunn's post-hoc test (analysis of more than two groups) and Kaplan-Meier analysis of graft survival (log-rank test); *p* values \leq 0.05 were considered significant.

Results

A short term treatment with CsA and JJ319 promotes long-term acceptance of heart allograft

The JJ319 modulating anti-rat CD28 mAb was administered to LEW 1A (RT1Aa) rat recipients of cardiac graft from fully MHC mismatched LEW 1W (RT1Au) donors the day before transplantation for 4 or 8 days. As previously described [1], anti CD28 mAb alone is not sufficient to induce long term survival. However, it synergized with suboptimal doses of CsA to promote long term acceptance of cardiac allograft in 60% of the recipients (**Figure 1**).

Long term surviving (LS) animals display chronic rejection lesions

A morphometric analysis of chronic rejection lesions indicated that the long surviving grafts (>100 days) of antiCD28+CSA-treated recipients displayed fibrosis, leukocyte infiltration and vascular lesions compared to syngeneic grafts that showed only minor histological injury (**Figure 2**). *No difference was observed between the short (4 days) and the long (8 days) anti CD28 treatment (à confirmer).*

Alloantibody responses

In order to examine the effect of the selective and initial CD28 blockade on alloantibody responses, we analyzed serum levels of alloantibodies (IgM, total IgG and individual IgG isotypes) in LS recipients 120 days post transplantation and compared them with those of naive or rejecting, untreated recipients. LS animals exhibit higher IgM and IgG responses compared to rejecting animals. The increase in anti-donor IgG response was mainly due to an increase of the IgG1 subclass (**figure 3**). No antibody deposition was found by immunofluorescence analysis within LS graft 120 days after transplantation (data not shown).

Non-T cell-dependant inhibition of alloreactivity in tolerant recipients

One hundred days after transplantation, the proliferative capacity of splenocytes from LS recipients was assessed against donor and third party APC. Splenocytes from LS recipients failed to proliferate against donor APC. This unresponsiveness was not donor-specific since proliferation of LS splenocytes was also significantly reduced when stimulated with 3rd party Brown Norway (RT1^b) rat APC (**figure 4**). Since it has been previously shown that anti CD28 mAb can induce non T-B7⁺-regulatory cells [8], we selectively depleted this population. This restored a proliferation similar to those observed with naive animals (**figure 4**). In addition,

purified T cells from LS rats proliferated to a similar level as compared with naive T cells (**Figure 4**), indicating that anergy is not involved in the MLR inhibition.

Inhibition of IDO, NO, HO-1 and cytokines in MLR.

In order to identify the effector mechanism of the regulation observed *in vitro*, and since IDO has been shown to be a major effector molecule in tolerance controlled by B7/CTLA-4 interactions [18], we first inhibited IDO by adding 1-MT in the culture medium. We also assessed the role of anergy with the adjunction of rIL-2 in the culture medium, the role of NO using the non specific inhibitor L-NMMA and the role of HO-1 using SnPP. Addition of 1-MT increased proliferation nine fold ($p=0,05$) to reach 100% of the naive spleen proliferation. Addition of rIL-2 also restored proliferation of LS spleen cells whereas iNOs inhibition did not (**figure 5A**). We also assessed the role of HO-1 in the LS splenocytes inhibition since it has been shown that this enzyme can also be involved in tolerogenic mechanisms [19, 20]. However, no significant increased of the LS proliferation was observed after HO-1 inhibition with SnPP (**figure 5A**). No significant difference between naive and LS animals was observed with any of the treatments when stimulated with third party APCs (**figure 5B**).

In order to analyze whether cytokines shown to participate in regulatory mechanisms in other systems [14] were involved, neutralizing antibodies to IL-4 receptor (IL-4R) and IL-10 receptor (IL-10R) were added to the MLR but had no effect on T cell proliferation (**figure 6**). Addition of rIL-2, L-NMMA, 1-MT, anti IL-4R, anti IL-10R did not significantly modify the proliferation of naive responder cells (data not shown) whereas SnPP increased naive cell proliferation.

Splenocytes from LS animals cannot regulate the proliferation of naive cells.

In order to evaluate whether the regulatory mechanisms blunting alloreactivity in recipient spleens could also inhibit the proliferation of naïve cells, co-culture experiments were undertaken where responding naïve recipient-type splenocytes were stimulated by donor or third party APCs in the presence of graft recipient spleen cells. We observed that LS splenocytes were unable to inhibit naive cell proliferation against donor (**figure 7**) or third party APCs (**figure 7**).

Discussion

It has been previously shown that CD28 inhibition associated with a short CsA treatment synergies to induce long term survival in a cardiac allograft acute rejection model {Dong, 2002 #4}. In this study, we analyzed the mechanisms that underly long term cardiac allograft survival. First, we observed that LS recipients have high anti donor IgM and IgG responses, compared to untreated rejecting animals 120 days after transplantation (figure3). This IgG response was mainly due to an increased of the IgG1 subclass. A sustained antibody response together with antibody deposition within the graft has been associated with the development of chronic vasculopathy. In fact, in our model, LS recipients exhibit signs of chronic rejection lesions (figure 2). However, no antibody nor complement deposition could be evidenced within the grafts .

In a second part, we analyzed the regulatory mechanisms that developed in LS recipients. We observed that splenocytes from treated recipients were hyporesponsive when stimulated by donor cells. Furthermore, T cells purified from LS splenocytes proliferated normally, suggesting that alloreactive T cells were neither deleted nor anergic and that regulatory mechanisms are contained in the non T cell compartment. It has been already shown that CD28/B7 blockade can induce the development of regulatory cells in the non T cell compartment either with CTLA4-Ig or with specific CD28 inhibition {Guillot, 2003 #14;Haspot, 2005 #9}. These regulatory non T cells were shown to express the B7 marker {Haspot, 2005 #9}. Here, the selective depletion of the non-T B7⁺ cells also fully restored the proliferation of LS splenocytes (figure 4). We then analyzed the mechanisms of the regulation exerted by this cells. Anergy is likely not involved since purified T cells proliferated normally (figure 3 and 4). Addition of IL-2, however, increased the proliferation of LS cells suggesting that the hyporesponsiveness of these cells is in part due to a lack of IL-2.

Neither IL4 nor IL10 that were shown to be involved in the proliferation inhibition following CTLA4-Ig treatment {Guillot, 2003 #14} were involved in the suppression observed in our model. We also assessed the role of NO and HO-1. In fact, iNOS-derived NO is involved in suppression of several immune responses {Hoffman, 1993 #21;al-Ramadi, 1992 #22} and overexpression of HO-1 using gene therapy can prolonged allograft survival {Braudeau, 2004 #16}. However, neither NO nor HO-1 inhibition could induce full proliferation, indicating that they were not involved in regulation in our model. As the specific blockade of CD28 does not inhibit the CTLA-4/B7 interaction, it is likely that IDO is induced in APC. In fact, IDO inhibition with 1-MT restore proliferation, indicating that IDO activation is involved in T cell

inhibition (figure 5). However, coculture experiments demonstrate that splenocytes from LS animals were unable to suppress naive MLR (figure 6), indicating that in this case, IDO activity alone is not sufficient for suppression.

To conclude, in this study we described a synergism between CSA and anti-CD28 mAb to induce long term cardiac allograft survival and regulatory mechanisms likely sustained by B7⁺CD6⁻ cells. Their regulatory activity appears to be dependent upon IDO. However, unlike kidney allograft model, these regulatory mechanisms are not sufficient to prevent chronic vasculopathy, indicating different requirements for tolerance induction in kidney and cardiac allografts.

Bibliography

1. Dong VM, Yuan X, Coito AJ, *et al.*, *Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection*. *Transplantation*, 2002. **73**(8): p. 1310-7.
2. Dengler TJ, Szabo G, Sido B, *et al.*, *Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation*. *Transplantation*, 1999. **67**(3): p. 392-8.
3. Thiel MA, Steiger JU, O'Connell PJ, *et al.*, *Local or short-term systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival*. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2005. **33**(2): p. 176-80.
4. Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, and Anasetti C, *CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice*. *J Immunol*, 2000. **164**(9): p. 4564-8.
5. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, *et al.*, *CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 1097-101.
6. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, *et al.*, *T cell apoptosis by kynurenines*. *Adv Exp Med Biol*, 2003. **527**: p. 183-90.
7. Li W, Zheng XX, Kuhr CS, and Perkins JD, *CTLA4 engagement is required for induction of murine liver transplant spontaneous tolerance*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(5): p. 978-86.
8. Haspot F, Seveno C, Dugast AS, *et al.*, *Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells*. *Am J Transplant*, 2005. **5**(10): p. 2339-48.
9. Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ, *et al.*, *Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(2): p. 519-27.
10. Graca L, Cobbold SP, and Waldmann H, *Identification of regulatory T cells in tolerated allografts*. *J Exp Med*, 2002. **195**(12): p. 1641-6.
11. Taylor PA, Noelle RJ, and Blazar BR, *CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade*. *J Exp Med*, 2001. **193**(11): p. 1311-8.
12. Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, *et al.*, *Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway*. *Transplantation*, 2001. **72**(9): p. 1556-62.
13. O'Connell PJ, Li W, Wang Z, *et al.*, *Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 143-54.
14. Guillot C, Menoret S, Guillonneau C, *et al.*, *Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 3325-33.
15. Ono K and Lindsey ES, *Improved technique of heart transplantation in rats*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1969. **57**(2): p. 225-9.
16. Guillonneau C, Louvet C, Renaudin K, *et al.*, *The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection*. *J Immunol*, 2004. **172**(3): p. 1619-29.
17. Guillot C, Mathieu P, Coathalem H, *et al.*, *Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5258-68.

18. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, *et al.*, *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
19. Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, *et al.*, *Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts*. *Faseb J*, 2004. **18**(6): p. 765-7.
20. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, *et al.*, *Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer*. *Gene Ther*, 2004. **11**(8): p. 701-10.
21. Hoffman RA, Langrehr JM, Wren SM, *et al.*, *Characterization of the immunosuppressive effects of nitric oxide in graft vs host disease*. *J Immunol*, 1993. **151**(3): p. 1508-18.
22. al-Ramadi BK, Meissler JJ, Jr., Huang D, and Eisenstein TK, *Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4*. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(9): p. 2249-54.

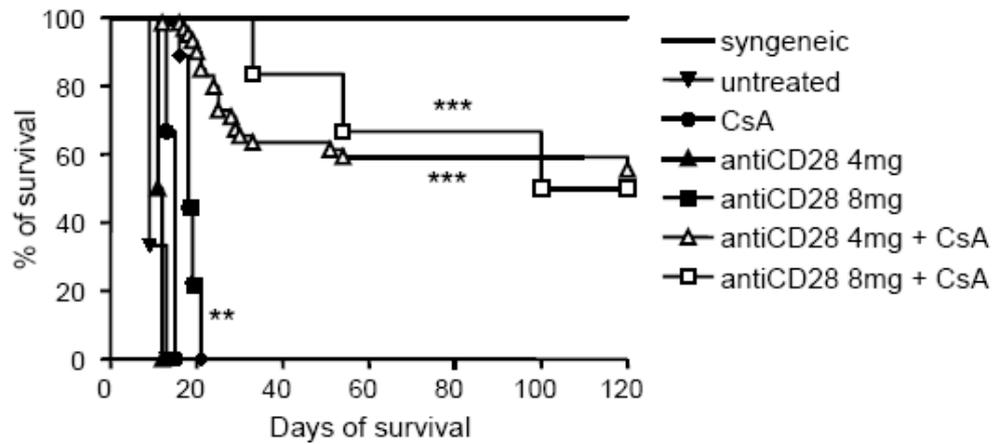


Figure 1. Co-treatment with anti-CD28 and CSA leads to indefinite allograft survival.

Graft survival in LEW.1A recipients transplanted with LEW.1W hearts (day 0) that were either non treated (n=3) or treated with 8mg of anti-CD28 mAb alone (n=9) or in combination with CsA (n=5). Two other groups were or treated with 4mg of anti-CD28 mAb alone (n=2) or in combination with CsA (n=20). The last group was treated with CsA alone (n=3).

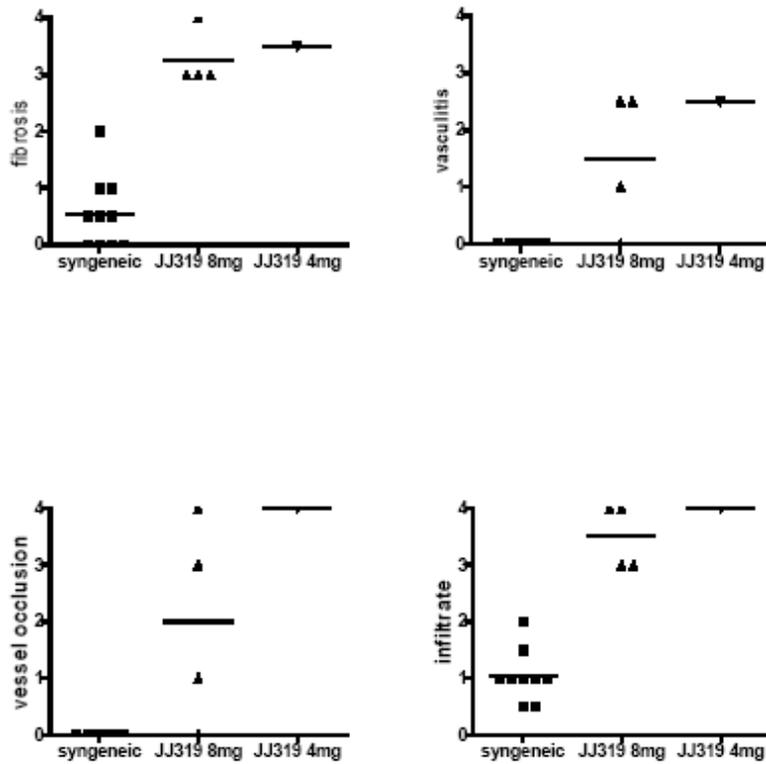


Figure 2. CD28 blockade does not protect from chronic allograft vasculopathy.

Long-surviving grafts were collected at day 120 after transplantation from syngeneic non-treated recipients and recipients and treated anti-CD28 mAb. A morphometric analysis of chronic rejection was performed by a pathologist in a blinded fashion. The severity of each criteria was graded using a scoring system described in the *Materials and Methods*. Syngeneic, n=3; anti-CD28, n=5.

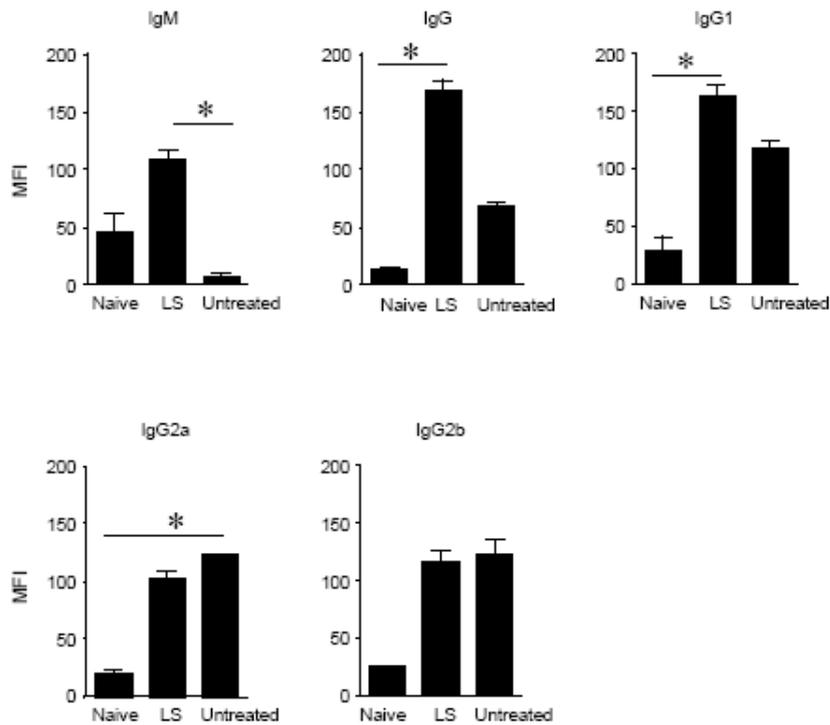


Figure 3. Alloantibody responses

Sera diluted 1/10 from LEW.1A animals non transplanted (naive) (n=3) or transplanted with LEW.1W hearts treated with anti CD28 mAb and CsA (n=5) or non treated (n=2) were analyzed 120 days after transplantation. Reactivity was analyzed by cytofluorimetry using donor-type splenocytes for the presence of IgG, IgG1, IgG2a or IgG2b alloantibodies. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) \pm SD. *, p<0.05

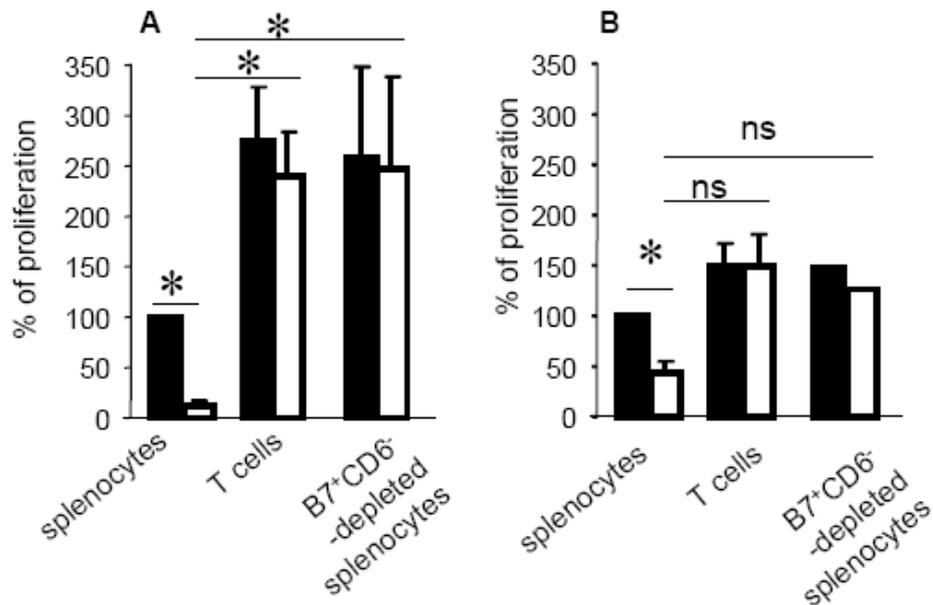


Figure 4 : Proliferation of PBMC from tolerant recipients in MLR. and identification of suppressive cells in MLR.

Proliferation of LS splenocytes (white bars) 120 days after transplantation to donor LEW.1W APC (A) or third party BN APC (B) was compared to the proliferation of naive LEW.1A splenocytes (black bars). The percentage of proliferation was calculated for each independent experiment with 100% being the proliferation of naïve cells stimulated with LEW.1W APC (A) or BN APC (B). T cells purification and B7⁺CD6⁻ depletion was routinely greater than 96% and always above 90%. Cell viability after depletion was confirmed by their ability to proliferate upon Con A stimulation. Naive cell proliferation was comprised between 19,000 and 88,125 cpm versus LEW.1W APC and between 37,000 and 142,000 cpm versus BN APC.

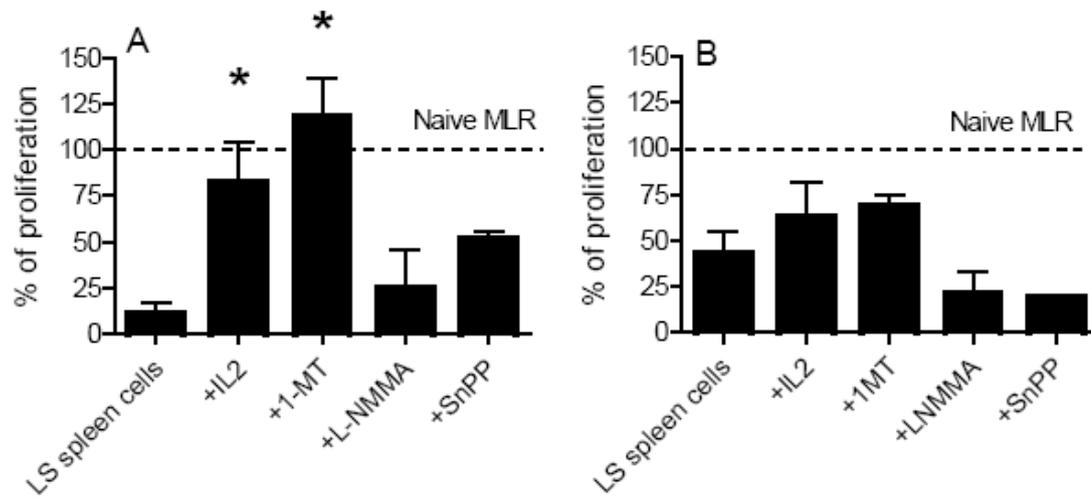


Figure 5 : Implication of IDO and IL-2 and not HO-1 nor NO in the suppression of T cell proliferation: IL-2, 1-MT, L-NMMA or SnPP were added into culture medium. The percentage of proliferation was calculated for each independent experiment with 100% being the proliferation of naïve cells stimulated with LEW.1W APC (A) or BN APC (B). The data are presented as mean \pm SEM of 5 independent experiments for stimulation with donor APC and of 3 independent experiments stimulation with third party APC.

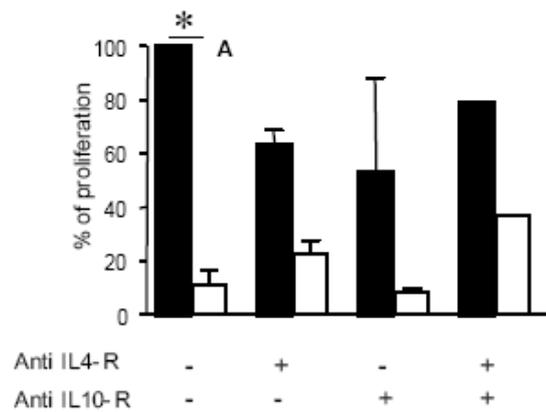


Figure 6 : No role for IL4 or IL10 in the suppression of T cell proliferation. Neutralizing anti IL-4 and IL-10 antibodies were added to the MLR. The percentage of proliferation was calculated for each independent experiment with 100% being the proliferation of naïve cells stimulated with LEW.1W APC. The data are presented as mean \pm SEM of 3 independent experiments

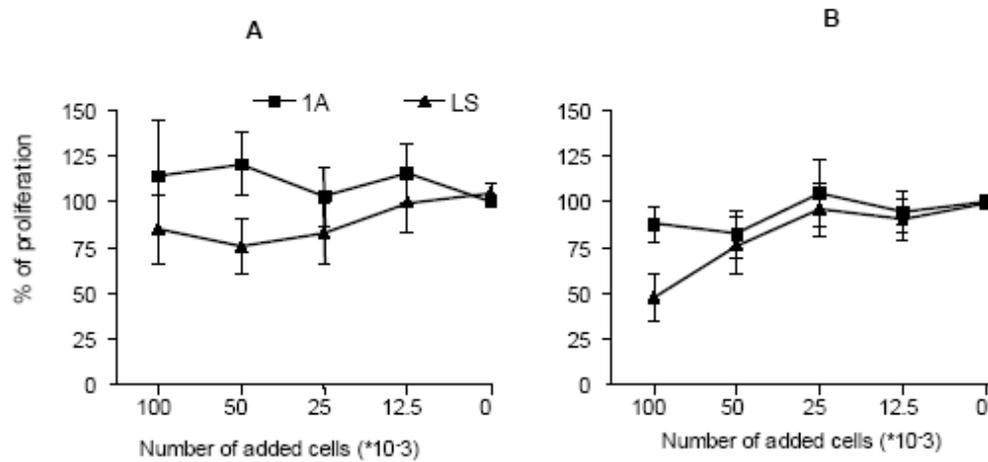


Figure 7. Effect of splenocytes from LS recipients on naive MLR.

Splenocytes were cocultured with irradiated LEW.1W (A) or BN APCs (B) and with splenocytes from naive animals. Cells were collected at day 120 post transplantation and cocultured from a 1:1 to a 1:4 cell ratio for 3 days. Results are expressed as the percentage (mean \pm SD) of cell proliferation with naive MLR considered as 100%.

Résultats complémentaires et discussion

Dans cet article, nous avons étudié l'effet du blocage de CD28 en association avec la CSA dans un modèle de rejet aigu d'allogreffe cardiaque. Nous avons tout d'abord confirmé que ce traitement d'induction permet d'obtenir une longue survie des greffons avec, cependant, présence de lésions de rejet chronique (Dong, Yuan et al. 2002). L'augmentation des doses de JJ319 seul permet d'augmenter la survie des greffons (**tableau 3**). Toutefois, en association avec la CSA, cette augmentation n'a pas d'incidence sur la survie à long terme ni sur l'importance des lésions de rejet chronique.

Tableau 3 : Récapitulatif des différents traitements utilisés ainsi que des survies obtenues

Groupe	Anti CD28 3mg/kg	CsA 10mg/k g	Survie jours
Sans traitement	non	non	10,3±2.3
Anti CD28 4mg	J-1 à J2	non	10,3±2.8
Anti CD28 8mg	J0 à J7	non	18.6±1.5
CsA	non	J0 à J3	14,3±1.15
Anti CD28 4mg+CsA	J-1 à J2	J0 à J3	60%>120
Anti CD28 8mg+CsA	J0 à J7	J0 à J3	50%>120

En ciblant spécifiquement le CD28, l'interaction pro-toléro-gène CTLA-4/B7 est préservée et permet d'envoyer des signaux inhibiteurs à la fois au lymphocyte T mais également à la CPA. Cependant, cette inhibition seule ne permet pas d'induire une longue survie et doit être accompagnée d'un court traitement à la CSA. Il est possible que les signaux toléro-gènes générés par B7 et CTLA-4 soient contrecarrés par des signaux activateurs en provenance d'autres voies de costimulation, notamment CD40/CD40L qui agit à la fois sur les CPA et sur les lymphocytes T et B. Ainsi, la CSA, en bloquant complètement l'activation T, permet aux signaux inhibiteurs d'induire un phénotype toléro-gène et une longue survie.

Nous avons montré que cette longue survie (LS) s'accompagne de mécanismes régulateurs non spécifiques du donneur, caractérisés par une inhibition de la prolifération des splénocytes des animaux LS comparativement à des splénocytes issus d'animaux naïfs. Les lymphocytes T purifiés, ainsi que les splénocytes déplétés en cellules B7⁺CD6⁻, prolifèrent normalement. Cependant, l'ajout de cellules B7⁺CD6⁻ sur une culture de lymphocytes T stimulés par des CPA 1W n'inhibe pas la prolifération de ces lymphocytes (**figure 7**) alors que ces cellules ont été

décrites comme suppressives dans un modèle de tolérance rénale induite par blocage spécifique du CD28. Notre hypothèse est que la purification des cellules, en ciblant la molécule B7, peut induire une modification des propriétés régulatrices de ces cellules. Une coculture avec ajout de cellules non-T ($CD3^-$), obtenues par sélection négative, devrait permettre de répondre à cette question. Il se peut également que les cellules $B7^+$ n'exercent pas directement leur effet régulateur mais activent les cellules régulatrices.

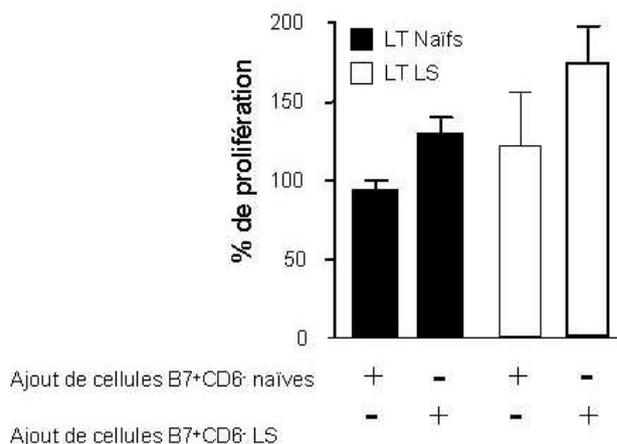


Figure 7 : Test de prolifération après ajout de cellules $B7^+CD6^-$ sur une MLR lymphocytes T/CPA Lew.1W. Les cellules $B7^+CD6^-$ sont ajoutées au ratio 1/1 et la prolifération est mesurée après 5 jours de culture. 100% correspond à la prolifération de la MLR simple, naïve ou LS.

Lors des expériences de coculture, nous avons montré que les splénocytes des animaux LS ne sont pas capables d'inhiber la prolifération de cellules naïves vis à vis de CPA Lew.1W ou BN. Ces résultats semblent en contradiction avec les expériences de MLR simple qui ont mis en évidence un rôle d'IDO dans la régulation. En effet, la déprivation en tryptophane touche l'ensemble du puits de culture et devrait donc inhiber la prolifération de toutes les cellules, aussi bien LS que naïves. De la même façon, les résultats préliminaires obtenus en transwell n'ont pas montré d'inhibition de la MLR naïve, que les splénocytes LS soient stimulés ou non par des CPA 1W (**figure 8**). Il est possible que les lymphocytes T LS aient été sensibilisés *in vivo* et qu'ils soient ainsi plus réceptifs à l'action d'IDO. Il se peut également qu'un deuxième signal soit nécessaire pour une inhibition efficace des lymphocytes T. Cette deuxième hypothèse est cependant moins probable car l'ajout de 1-MT dans le milieu de culture restaure 100% de la prolifération (**article 1**).

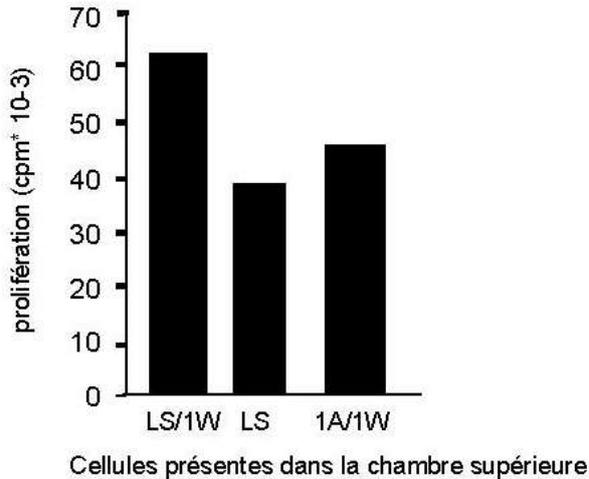


Figure 8 : Test d'inhibition de MLR en transwell. La prolifération d'une MLR naïve (chambre inférieure) est mesurée après 5 jours de culture en fonction des cellules présentes dans la chambre supérieure du transwell.

Le rôle d'IDO, mis en évidence *in vitro*, sera également confirmé *in vivo* par traitement des receveurs avec un inhibiteur spécifique administré par voie orale. Chez le rat, IDO a été impliqué dans la survie d'allogreffes rénales et cardiaques suite à l'inhibition de voies de costimulation. Dans les deux cas, l'administration de 1-MT a conduit au rejet des greffons (Guillonau, en préparation)(Haspot, Seveno et al. 2005). Lors d'expériences de transfert de tolérance, nous avons administré des splénocytes (100 millions de cellules) issus d'animaux LS chez des receveurs naïfs greffés et irradiés. La moyenne de survie n'est pas significativement différente de celle obtenue avec le transfert de splénocytes issus d'animaux ayant rejeté leur greffon (9.7 ± 2 jours vs 16 ± 2 jours, respectivement). Une sensibilité accrue des lymphocytes T LS à une déprivation en tryptophane ou à une augmentation des produits de son catabolisme pourrait également expliquer l'absence de transfert de tolérance. En effet, les lymphocytes T des receveurs irradiés sont de phénotype naïf et peuvent donc être insensibles à l'action régulatrice des splénocytes transférés. Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de coculture avec ajout de cellules transfectées avec le plasmide codant pour IDO sur une MLR LT Lew.1A/CPA Lew.1W pourront être réalisées (**figure 9A**). Les résultats attendus sont une inhibition de la prolifération des lymphocytes T LS mais pas naïfs. De même, une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T LS devrait être observée (**figure 9A**). Enfin, des expériences de transwell pourront nous indiquer si les cellules régulatrices sont constitutivement activées (**figure 9B a**) ou si leur activation dépend de la présence des antigènes du donneur (**figure 9B b et c**). Il se peut en effet que l'activation des cellules régulatrices requiert un signal de la part d'une CPA (cytokine, costimulation) indépendamment de l'antigène porté par ces cellules.

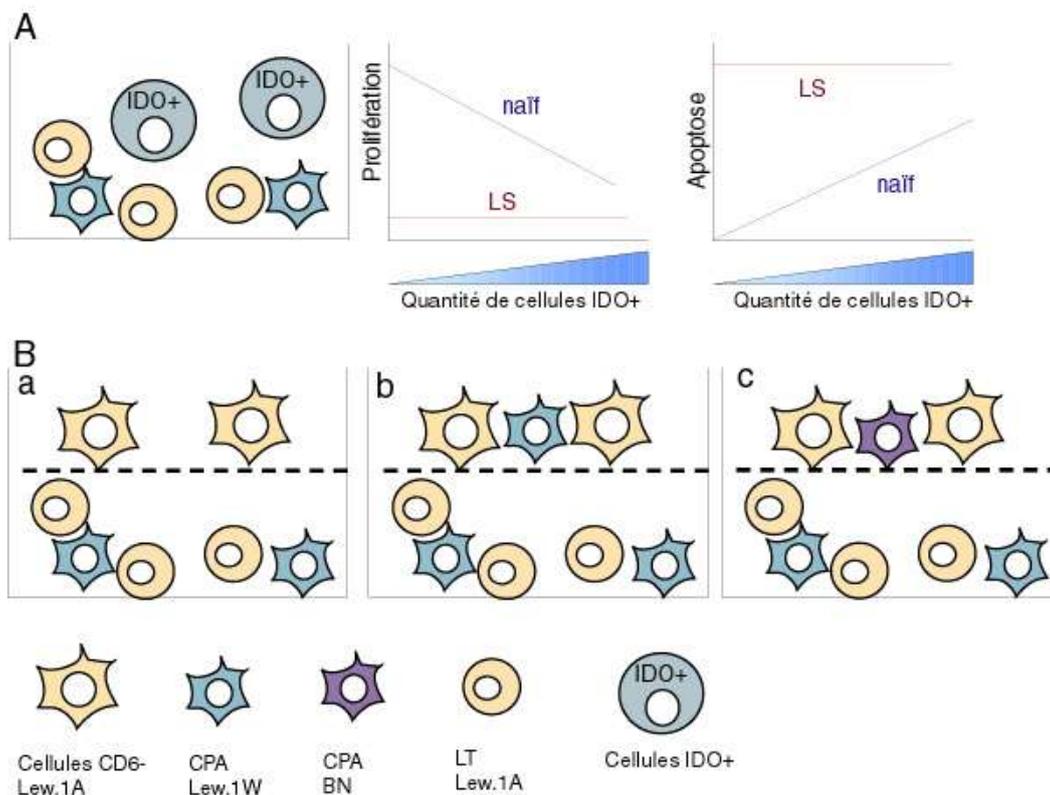


Figure 9 : Schéma récapitulatif des expériences à réaliser afin de vérifier le rôle d'IDO et des lymphocytes T dans l'inhibition de la prolifération. A : Expérience de coculture avec ajout de cellules transfectées avec IDO sur une MLR LT/CPA Lew.1W. Si les lymphocytes T LS sont plus sensibles à l'action d'IDO que des lymphocytes T naïfs, une inhibition plus importante de leur prolifération, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose devrait être observée chez ces cellules. B : Expérience de transwell permettant de vérifier si l'activation des cellules régulatrices est dépendante et/ou spécifique de l'antigène.

Si nous confirmons qu'IDO est bien le mécanisme régulateur impliqué dans la survie à long terme des greffons allogéniques dans notre modèle, cela nous permettra de caractériser les cellules impliquées dans la régulation, aussi bien dans les splénocytes que dans les cellules infiltrant le greffon grâce à un marquage d'IDO et une analyse par FACS. Plusieurs populations cellulaires ont déjà été décrites, qu'il s'agisse de cellules T (Takahashi, Tagami et al. 2000)(Guillonéau, en préparation) ou d'autres types cellulaires comme les cellules NK (Galazka, Stasiolek et al. 2006), les cellules NKT (Miyamoto, Miyake et al. 2001; Sonoda, Faunce et al. 2001) ou des cellules dendritiques (Liang, Chen et al. 2006; Nagatani, Dohi et al. 2006). La déplétion des cellules exprimant le marqueur B7 restaure la prolifération des splénocytes des animaux LS, suggérant que ce sont ces cellules, appartenant au compartiment non T, qui portent les mécanismes régulateurs. Cependant, il est également possible que ces cellules activent des

cellules régulatrices qui vont alors inhiber les lymphocytes T alloréactifs via IDO. Les différents mécanismes pouvant être impliqués dans la régulation sont présentés dans la **figure 10**.

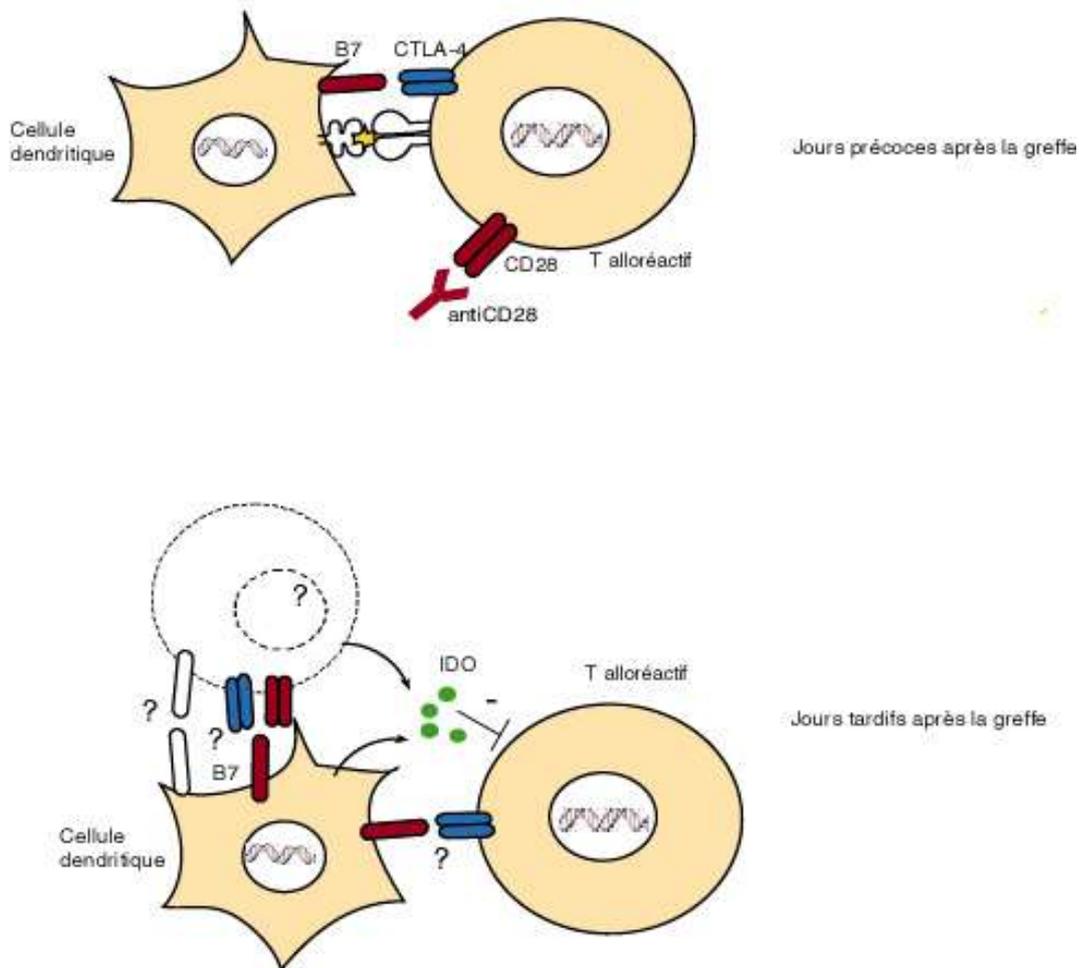


Figure 10 : Schéma récapitulatif présentant les différents mécanismes pouvant être impliqués dans l'inhibition des lymphocytes T alloréactifs. L'activité régulatrice peut être soit directement médiée par des cellules non-T via l'activation d'IDO, soit être médiée par une deuxième population cellulaire activée par des CPA pro-toléroènes.

En conclusion, nous avons mis en évidence des mécanismes régulateurs passant par IDO et permettant la survie à long terme des greffons. Cependant, les cellules impliquées ainsi que leur mode d'action restent à caractériser. De plus, ces mécanismes régulateurs ne préviennent pas l'apparition du rejet chronique. Dans une deuxième partie, nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition spécifique de CD28 dans un modèle de rejet chronique (article 2). Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Ignacio Anegón.

Article 2, en préparation

**Targeting CD28 and CD40L induces antigen-specific tolerance
and promotes acceptance of heart allografts.**

Carole Guillonneau*¹, Céline Séveno*¹, Karine Renaudin#, Fabienne Haspot*, Claire Usal*,
Joëlle Veziers*, Jean-Paul Soulillou*, Ignacio Anegon*² and Bernard Vanhove*².

* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unit 643 and Institut
de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France.

Service d'anatomie pathologique du CHRU de Nantes, Nantes, France.

¹ CG and CS contributed equally to this report and are listed in alphabetical order.

² IA and BV are both senior and corresponding authors and are listed in alphabetical order.

KEYWORDS : Transplantation, costimulation blockade, tolerance, chronic rejection.

Address correspondence to: Bernard Vanhove or Ignacio Anegon, ITERT, INSERM U643,
CHU Hotel Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel: +33-240-
087-410. Fax: +33-240-087-411. Email: Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr and
Ignacio.Anegon@univ-nantes.fr.

Running title: Operational tolerance after CD40L and CD28-blockade.

ABBREVIATIONS

AdCD40Ig : Adenovirus CD40Ig

Adl324 : Adenovirus dl324 (non coding adenovirus)

CR: AdCD40Ig + anti-CD28 antibody-treated allograft recipients displaying histological lesions of chronic rejection.

Tol: AdCD40Ig + anti-CD28 antibody-treated allograft recipients displaying no histological lesions of chronic rejection.

SRBC: sheep red blood cells

ABSTRACT

Blockade of more than one costimulatory pathway is needed to obtain tolerance. In this study, in a rat model of cardiac allotransplantation, CD40-CD40L interactions were blocked by injection of an adenovirus encoding CD40Ig (AdCD40Ig) and CD28/B7 interactions were transiently inhibited by an induction treatment with a down modulating anti-CD28 antibody. Allografts from CD40Ig-treated recipients survived indefinitely but systematically developed chronic rejection lesions. Anti-CD28 monotherapy delayed acute rejection but failed to induce tolerance. Co-administration of CD40Ig and anti-CD28 resulted in the long-term acceptance of allografts with an inhibition of chronic rejection lesions in 60% of the recipients. In the chronic-rejection free recipients, the treatment also completely inhibited alloantibody production, as well as primary and secondary antibody responses to exogenous antigens. The anti-donor proliferative response of splenocytes was inhibited, whereas purified T cells from the spleen responded normally, suggesting a control of proliferation by non-T regulatory cells. Moreover, non-T spleen cells from chronic rejection lesion-free recipients had a regulatory activity inhibiting the proliferation of naïve donor-type T cells. Thus, the association of an initial anti-CD28 treatment with AdCD40Ig resulted in decreased allograft chronic rejection lesions, complete inhibition of antibody production and the development of atypical regulatory cells within the non-T cell compartment.

INTRODUCTION

T-cell costimulatory pathways have drawn considerable interest in transplantation as targets for the prevention of allograft rejection. CD40-CD40L and CD28-B7 are the most extensively studied T cell costimulatory pathways, and their role in supporting T cell activation and acute allograft rejection has been well established (1). Interaction between CD28 on T cells and B7-1/B7-2 on antigen-presenting cells plays an important role in T-cell mediated immune responses, including activation and proliferation of alloreactive T cells (2). The CD40-CD40L costimulatory pathway cooperates with the CD28-B7-1/B7-2 pathway to activate T cells (3). Nevertheless, blockade of the CD40-CD40L pathway (using anti-CD40/CD40L Ab, the recombinant molecule CD40Ig or CD40 KO mice) and the B7-CD28 pathway with CTLA4Ig, alone or in combination, circumvents acute allograft rejection yet cannot prevent the development of chronic rejection lesions (4-9), demonstrating that these treatments do not induce complete tolerance.

B7-CD28 interactions can also be selectively inhibited using anti-CD28 antibodies (10). Since these antibodies target CD28 and not B7, they do not inhibit the B7/CTLA-4 interactions that are important for the development of tolerance (11, 12) and for the function of regulatory T cells (13). Therefore, as compared with CTLA4Ig, targeting CD28 might promote the development of regulatory mechanisms (14). Several studies have demonstrated that the selective blockade of CD28 indeed reduced T cell reactivity in autoimmunity (15, 16) and in transplantation (17). In the rat, the modulating CD28-specific Mab JJ319 (18, 19) induced tolerance to kidney (20, 21) but not to heart allografts (10, 22). However, it promoted long-term survival of heart allografts in a rat strain combination where no acute rejection occurs (22).

The purpose of this study was to investigate the effect of selectively targeting CD28 in a model of chronic vascularized cardiac allograft rejection following CD40L-blockade. We

hypothesized that the modulation of CD28 expression, by allowing for conserved CTLA4-B7-1/B7-2 interactions, would lead to regulatory mechanisms and consequently result in allograft tolerance. Our results identify a critical role for the CD40-CD40L and CD28-B7 costimulatory pathways in the development of regulatory mechanisms. Co-blockade of both pathways resulted in tolerance associated with the generation of suppressive cells in a donor-specific manner.

MATERIALS and METHODS

Animals and cardiac allograft models.

Eight- to 12-week-old male Lewis.1W (LEW.1W, haplotype RT1^b) and Lewis.1A (LEW. 1A, haplotype RT1^a) congenic rats (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), differed in their entire MHC region. Heterotopic LEW.1W heart transplantation was performed as previously described (23). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall.

Recombinant adenovirus coding for CD40Ig and gene transfer.

The adenoviral vector coding for the extracellular portion of mouse CD40 fused to the coding sequences of the constant domains of human IgG1 (AdCD40Ig) and the non-coding adenoviral vector Add1324 have been described previously (7, 24). For gene transfer, recombinant adenoviruses (5×10^{10} IP in 150 μ l) were slowly injected into the portal vein. Serum CD40Ig was detected using a sandwich ELISA as previously described (7).

Anti-CD28 administration.

The modulating JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). In this study, JJ319 was given at a dose of 4 mg/kg/day i.p. from days 0 to 7 post transplantation.

Histological and morphometric analysis of cardiac grafts.

The upper third of the graft was fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five μ m coronal sections were stained with hematoxylin-eosine-safron. Tissues were analyzed by a pathologist (K.R.) blinded to the groups and chronic rejection was evaluated as previously described (25). The percentage of vessel occlusion by intimal thickening was determined

using the following scoring system: 0 = no occlusion; 1 = <20%; 2 = 20-50%; 3 = 50-80% and 4 = >80%. Vasculitis was quantified using the following scoring system: 0 = no leukocyte adhesion to the endothelium; 1 = leukocyte adhesion to the endothelium; 2 = leukocyte infiltration of the intima; 3 = fibrosis of the intima and 4 = leukocyte infiltration of the media. The percentage of pathological vessels was scored taking into account the presence of vessel occlusion and/or vasculitis. Myocardial fibrosis was quantified using the following scoring system: 0 = no fibrosis; 1 = focal; 2 = diffuse-moderate and 3 = diffuse-severe. Three sections of at least 3 different biopsy levels were analyzed for each graft. Only vessels that displayed a clear internal elastica interna were scored.

Immunohistological analysis of myocardial infiltration by mononuclear or polynuclear cells was evaluated using a mixture of two anti-leucocyte CD45 mAbs (OX1 and OX30), in a blinded fashion by two investigators, according to an arbitrary scale and scored as follows: -: negative; +: weakly infiltrated (1 to 5% of the surface area) ; ++ : moderately infiltrated (5 to 15% of the surface area) ; +++: strongly infiltrated (15 to 30% of the surface area) (7).

Immunizations

SRBC (10^9 in 800 μ l of sterile PBS) were injected i.v. on the day of the transplantation. On day 90, animals were rechallenged with a new injection of 10^9 SRBC and simultaneously underwent a primary i.v. immunization with 10^7 K562 human cells.

Antibody detection.

Allo- and xeno-antibodies were analyzed by cytofluorimetry following incubation of ConA-activated allogeneic spleen cells or xenogeneic cells with diluted (1/10) heat-inactivated serum, and then with biotin-conjugated F(ab)'2 goat anti-rat IgG antibodies (γ chain specific) (Jackson Laboratories), a mouse anti-rat IgG1 γ MAb (MARG1-2), IgG2a (MARG2a-7) or

IgG2b (MARG2b-3) (Technopharm, Paris, France). Antibody binding was revealed using FITC-coupled streptavidin or FITC-coupled F(ab)'₂ goat anti-mouse IgG (Jackson Laboratories). Cells were analyzed using a FACScalibur cytofluorimeter (Becton Dickinson, San Jose, CA) and the results were expressed as mean channel fluorescence for each serum.

Cell purification

Erythrocytes were removed from spleen cell suspensions by hypotonic lysis. T cells were purified from total splenocytes after nylon wool adherence and depletion of 3.2.3 (CD161), OX42 (CD11b/c) and OX12 (Ig κ chain) Mab-reactive cells using magnetic beads (DynaL, Compiègne, France). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 1% HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) and $5 \cdot 10^{-5}$ M 2- β -mercaptoethanol (all from Sigma, St Louis, MO). APCs were enriched from LEW.1W or third party BN spleen fragments digested with collagenase D (2 mg/ml) as previously described (7). Low density cells were cultured overnight in complete medium. Non adherent cells were harvested and used as dendritic-enriched APCs.

Mixed lymphocyte reactions

Splenocytes or pure T cells were seeded in triplicate (10^5 cells / well) into round-bottom 96-well plates (Nunc) and evaluated for their proliferative response against irradiated APCs ($5 \cdot 10^4$ cells/well) with or without human recombinant IL-2 at 100 U/ml. Cells were cultured for 3 and 5 days at 37°C, and 1 μ Ci of 3 H-thymidine deoxyribose was added to each well for the final 8 hours of culture. 3 H-thymidine incorporation was quantified using a scintillation counter.

For coculture experiments, splenocytes or T cells (10^5 cells) from graft recipients or control LEW.1A rats were added to splenocytes from naïve LEW.1A rats (10^5 cells) stimulated with irradiated LEW.1W or BN APCs ($5 \cdot 10^4$ cells/well) in round-bottom 96-well plates.

Results were expressed as the percentage (delta mean cpm \pm SD after subtraction of proliferation in the presence of culture medium) of proliferation of cells from treated recipients as compared with that of cells from control-treated recipients receiving an empty adenovirus (Add1324).

Quantitative RT-PCR.

Messenger RNA transcript analysis was performed by real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Two micrograms of RNA were treated with DNase and reverse transcribed using an M-MLV reverse-transcriptase kit (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed with a GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using SYBR Green PCR core reagents (Applied Biosystems). The following primer pairs were used: HPRT (6); IFN- γ (6); IL-2: 5'-CCTTGTC AACAGCGCACCC-3' and 5'-GCTTTGACAGATGGCTATCC-3'; IL-6: 5'-CAAAGCCAGAGTCATTCAGAGC-3' and 5'-GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGT-3'; IL-10 (6); HO-1 (26); IDO: 5'-GCTGCCTCCCATTCTGTCTT-3' and 5'-TGCGATTCCACCATTAGAGAG-3'; TGF- β 1 (6); CTLA-4: 5'-GGCAGACAAATGACCAAGTGAC-3' and 5'-TCTGAATCTGGGCATGGTTCT-3'; perforin: 5'-AGCCTCCACTCCACCCTGACT-3' and 5'-GTTGTTTCTTCTTCTCCTCGC-3'. The PCR method and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ quantification method, after normalization to HPRT values, have been described previously (27). The transcript accumulation index (TAI) is defined as the fold change in mRNA levels in a given sample (Q) relative to levels in a calibrator (CB)—in this case a syngeneic graft. The calibrator is the 1X expression of each

gene. The TAI is calculated as follows: $TAI = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{tTarget} - C_{tHPRT})_Q - (C_{tTarget} - C_{tHPRT})_{CB}$. In order to use the $2^{-\Delta C_t}$ method, the efficiency of the PCR for each gene must be $> 96\%$, as determined by the gradient of the $C_t = f(\log(\text{target DNA}))$ curve. Specific amplification products were checked by amplicon melting curves.

Statistical analysis.

Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test (analysis of two groups) or Kruskal-Wallis tests followed by a Dunn's post-hoc test (analysis of more than two groups) and Kaplan-Meier analysis of graft survival (log-rank test); p values ≤ 0.05 were considered significant. The Grubb's test was used to determine outliers and p values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Induction treatment with anti-CD28 antibodies induces tolerance in a fraction of AdCD40Ig-treated allograft recipients.

In the rat strain combination used here, monotherapy with anti-CD28 Mab (JJ319) from day 0 to day 7 post heart transplantation resulted in a significant prolongation of allograft survival (18.7 ± 1.6 , $n=11$, $p<0.0001$) as compared to untreated controls that uniformly rejected their graft early (6.6 ± 0.5 days, $n=9$) (Fig. 1). As previously shown (7), administration of AdCD40Ig alone resulted in long-term allograft survival (>120 days, $n=11$) in 83% of the recipients compared to recipients treated with the non coding adenovirus (8 ± 0.8 days, $n=9$). Treatment with anti-CD28 Mab up to day 7 in addition to the administration of AdCD40Ig resulted in indefinite allograft survival in all recipients ($n=14$) (Fig. 1). Treatment with an irrelevant mAb (3G8) up to 7 days in addition to CD40Ig did not modify the allograft survival (>120 days, $n=2$) (data not shown).

A morphometric analysis of chronic rejection lesions performed 120 days after transplantation indicated that the grafts of CD40Ig-transduced recipients displayed fibrosis, leukocyte infiltration of the myocardium and vascular lesions compared to syngeneic grafts that showed only minor histological injury (Fig. 2). In the group treated with both AdCD40Ig and anti-CD28 Mab, 8 of the 14 grafts analyzed exhibited no vasculopathy (the pathognomic lesions of chronic rejection), the other 6 displaying vascular chronic rejection lesions undistinguishable from those treated with CD40Ig only (Fig. 2). The co-treated recipients displaying no chronic rejection lesions were thus operationally tolerant and are referred to herein as "Tol" recipients. Those with chronic rejection lesions are referred to as "CR" recipients.

Addition of anti-CD28 Mab treatment to AdCD40Ig reduces graft infiltration and cytokine expression.

As previously shown (7), an immunohistological analysis of the allografts 120 days after transplantation showed that allografts from CD40Ig-treated recipients were infiltrated by mononuclear cells. Infiltrating cells in the group studied here represented from 1 to 30% of the analyzed surface area (Table 1). The initial administration of anti-CD28 Mab to CD40Ig-treated recipients decreased cell infiltration measured 120 days later, as compared with CD40Ig treatment alone. Infiltration in co-treated recipients represented only 1 to 5% of the analyzed surface area in these grafts regardless of whether or not the recipients presented chronic rejection lesions. One co-treated recipient displaying chronic rejection lesions, however, presented a slightly stronger infiltration (Table 1).

In order to analyze cytokine expression associated with tolerance and chronic rejection, total RNA was extracted from the allografts of AdCD40Ig-treated and AdCD40Ig plus anti-CD28 antibody-treated animals at day 120 post-transplantation. Transcripts for IL-6, perforin, CTLA-4, HO-1, TGF β and IDO were significantly reduced in AdCD40Ig + anti-CD28-treated recipients, whereas IL-2, IL-10 and INF γ transcripts were not (Fig. 3). No difference was detected in the expression of any of these cytokines within the AdCD40Ig + anti-CD28 group, regardless of whether or not the recipients had developed chronic rejection lesions (Fig. 3), suggesting that operational tolerance in this model is not dependent on their expression in the graft.

Tolerant recipients treated with AdCD40Ig and anti-CD28 Mab displayed inhibited alloantibody responses.

To assess the mechanisms by which the selective blockade of the CD40-CD40L and CD28-B7 pathways resulted in the development of tolerance or chronic rejection lesions, serum

levels of alloantibodies were measured in long-surviving recipients 120 days after transplantation. As previously shown, IgG alloantibody levels were reduced in the sera of AdCD40Ig-treated recipients with long-surviving grafts compared with those of control (Add1324)-treated recipients (7). The CR recipients had IgG levels that did not significantly differ from those observed in AdCD40Ig-treated recipients (Fig. 4). However, this antibody response was considerably reduced in the sera of Tol recipients, and did not differ from basal levels observed for naïve rats. Compared to CD40Ig-treated recipients, this reduction was statistically significant for total IgG (MCF of 341.9 ± 64.7 vs. 23.3 ± 12.8 , $p < 0.05$), IgG1 (127.6 ± 35 vs. 11.6 ± 7.4 , $p < 0.05$) and for IgG2b (71.8 ± 16.6 vs. 8.4 ± 0.9 , $p < 0.05$).

AdCD40Ig plus anti-CD28 Mab induce tolerance to sheep red blood cells.

In order to analyze whether the absence of alloimmunization in Tol recipients was specific for alloantigens, we injected sheep red blood cells (SRBC) i.v. on the day of transplantation. Within 3 weeks, control (AdCD40Ig + irrelevant antibody)-treated recipients developed IgG and IgM anti-SRBC antibodies, whereas AdCD40Ig + anti-CD28 antibody-treated recipients did not develop any responses (Fig. 5A and 5B). The same animals were re-immunized 3 months later with a recall dose of SRBC (Fig. 5E and 5F) and with a primary injection of xenoantigenic K562 cells (Fig. 5C and 5D). The anatomopathological evaluation of the chronic rejection lesions was performed in parallel. Animals that did not respond to the recall administration of SRBC had no or very few lesions of vasculitis and no occluded vessels. These animals, however, responded normally to K562 cells, demonstrating that they were tolerant to the antigen initially present during the treatment (SRBC and alloantigens), but that they were able to be immunized against antigens (K562 cells) administered at a later time point. Interestingly, the co-treated animal that developed chronic rejection lesions did not develop this humoral tolerance to SRBC (Fig. 5E and 5F).

Cells with in vitro regulatory activity are present in the spleen of tolerant recipients treated with CD40Ig and anti-CD28 Mab.

At day 120 post transplantation, the proliferative response of total splenocytes and purified spleen T cells from Add1324- or AdCD40Ig-treated recipients with or without anti-CD28 antibodies was analyzed. The splenocytes from long-surviving graft recipients consistently displayed low residual proliferative responses to donor-type APCs ($27.4 \pm 5\%$, $52.2 \pm 9.8\%$ and $28.7 \pm 14.2\%$ for AdCD40Ig, CR and Tol recipients, respectively) as compared with Add1324-treated controls (considered as 100%, n=6) (Fig. 6A). The unresponsiveness of spleen cells was not donor-specific since it was also observed when third party Brown Norway APCs were used as stimulators ($30.1 \pm 6.3\%$, $51.3 \pm 8\%$ and $42 \pm 14.3\%$ for AdCD40Ig, CR and Tol recipients, respectively) (Fig. 6A). In contrast with unfractionated splenocytes, purified T cells proliferated normally after stimulation by donor and third party APCs in all groups analyzed (Fig 6B). In order to evaluate whether these regulatory mechanisms could also inhibit the proliferation of naïve cells, co-culture experiments were undertaken where responding naïve recipient-type T cells were stimulated by donor APCs in the presence of graft recipient spleen cells. The data from these experiments revealed that only splenocytes from the Tol recipients were able to significantly inhibit the proliferative response of naïve T cells in MLR ($40\% \pm 11\%$ of the response obtained when spleen cells from Add1324-treated recipients were added, $p < 0.05$). This inhibition was donor-specific since no reduction in proliferation of BN APC-stimulated naïve LEW.1W T cells was observed in any condition (Fig. 6C). In addition, purified T cells from Tol recipients were also added to the co-culture experiments. The results indicated that the inhibitory activity was not exercised by T cells (Fig. 6D), but rather by other non-T cells in the spleen. In order to further analyze the regulatory mechanisms in tolerant, chronic rejection free recipients, IL-2

(100U/ml) was added to the culture medium in mixed lymphocyte reactions. In the presence of IL-2, spleen cells from T01 recipients fully recovered their proliferation capacities against donor and third party APCs, becoming similar to the proliferation of spleen cells from Add1324-treated allograft recipients (n=6, data not shown).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that peri-operative administration of anti-CD28 mAb induced tolerance to cardiac allografts in 60% of animals additionally treated with AdCD40Ig. The 40% of co-treated recipients that did not develop transplant tolerance could not be distinguished from the tolerant recipients by virtue of their anti-mouse antibody response that could otherwise blunt the immunoregulatory effect of anti-CD28 antibodies (data not shown). Also, the circulating levels of CD40Ig were similar in Tol and CR co-treated recipients (superior to 100µg/ml in the serum at day 10 in all cases). The tolerated grafts presented no vascular lesions but did, however, display a substantial amount of fibrosis (Fig. 2). Cellular infiltration and intragraft cytokine expression was reduced in grafts from recipients treated with CD40Ig plus anti-CD28 antibodies as compared with CD40Ig treatment alone, regardless of whether or not these grafts were found to be devoid of chronic rejection lesions. The tolerant state was also associated with an absence of alloantibodies (Fig 4). It has been previously suggested that antibody induction (28) and chronic allograft vasculopathy (4, 7) are driven primarily by costimulation-dependent adaptative immunity that, in the context of CD154 blockade, might be driven by CD28. Blocking CD28 should therefore be effective in controlling pathogenic costimulation pathway activation and in preventing alloantibody production and chronic allograft vasculopathy. In addition, selectively blocking CD28/B7 interactions during the induction phase of transplantation, without blocking those of CTLA-4 and B7, might on the one hand reinforce the initial costimulation blockade whilst on the other, allowing for the development of CTLA-4- and B7-dependant regulatory mechanisms generating suppressive T cells (13) and DCs (11). Here, we demonstrate that selective CD28 blockade during the induction phase of an allograft does indeed result in the differentiation of regulatory cells capable of controlling T cell alloreactivity *in vitro*. *In vivo*, these cells might

control alloantibody production and the development of vascular lesions, either directly or through the action on alloantibodies. Our data suggest that these regulatory cells are different from T regs. Indeed T cells purified from the spleen of tolerant recipients were fully reactive against donor APCs whereas unfractionated cells were hyporesponsive, indicating that the regulation was at least partially T cell-independent and that another cell type controlled T cell proliferation. In addition, purified T cells from tolerant animals were unable to control naïve alloreactive T cell responses whereas unfractionated cells were able to do so. Interestingly, in co-culture experiments designed for the measurement of regulatory cell activity, unfractionated spleen cells from Tol recipients controlled the alloreactivity of naïve T cells responding to stimulation with APCs of the same haplotype as the donor (LEW.1W), whereas the same cells from CR recipients failed to do so. Thus, whereas spleen cells from both Tol and CR recipients were hyporesponsive (Fig. 6A), the presence of regulatory cells controlling anti-donor alloreactivity could be evidenced only in Tol recipients (Fig. 6C). In addition, these regulatory cells in Tol recipients presented no suppressive activity towards T cell responses to third party APCs (Fig 6C). This raises two hypotheses: first, the regulatory non-T cells might function through the action of MHC-associated donor antigens and control T cells recognizing donor antigens through the indirect presentation pathway. Second, as previously suggested (21), the regulatory non-T cells might preferentially control the reactivity of primed T cells that overexpress inducible inhibitors of T cell activation such as CTLA-4. Since exogenous IL-2 restored the proliferation of unfractionated spleen cells from co-treated Tol recipients, the non-T regulatory cells described here likely do not block signals downstream of IL-2 but either stimulate regulatory properties of otherwise inactive Treg, prevent access of immunogenic APCs to alloreactive T cells by competition, block IL-2 production, or function through the action of indoleamine 2,3 dioxygenase, as previously described (11, 29).

Alloantibodies were clearly detected in the blood of CR whereas they were absent in Tol recipients. We have previously shown that CD28 blockade as monotherapy selectively inhibited alloreactivity of T lymphocytes without blocking humoral responses to cognate antigens (14) or to alloantigens (21). Since monotherapy with AdCD40Ig did not prevent antibody responses to cognate antigens, including SRBC (7), the data presented here demonstrate a synergy between CD40Ig and anti-CD28 antibodies in inhibiting antibody responses. This inhibition is likely due to an early antigen-specific tolerance, and not to a late non-specific immunosuppression, for two reasons. First, no response to a recall immunization with SRBC 4 months after a primary immunization under CD40Ig plus anti-CD28 antibody bi-therapy could be observed. Second, these animals were not permanently immunosuppressed since the response to another antigen was unaffected at a later time point (Fig. 5). This tolerance towards SRBC reinforces the notion of tolerance induction towards alloantigens and suggests that the reduction of vascular-type chronic rejection lesions in anti-CD28 Ab + AdCD40Ig-treated animals might also be due to the absence of alloantibodies.

In conclusion, following heart transplantation in the rat, CD28 down-modulation and CD40L blockade act in synergy to induce tolerogenic mechanisms, to blunt antibody responses to allo- and xeno-antigens and to reduce the development of chronic rejection lesions. This suggests that a more effective control of pathogenic costimulation pathways might be a useful immunosuppressive strategy to prevent chronic allograft vasculopathy.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Helga Smit, Bernard Martinet and Emmanuel Merieau for animal care. We thank the Vector Core of the University Hospital of Nantes (Nantes, France), supported by the Association Française Contre les Myopathies, for producing the adenoviral vector used in this study. This program has been in part funded by the ROTRF (Roche Organ Transplant Research Foundation) grant # 466230972 to B.V.

REFERENCES

1. Larsen, C. P., E. T. Elwood, D. Z. Alexander, S. C. Ritchie, R. Hendrix, C. Tucker-Burden et al. Long-term acceptance of cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381:434.
2. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233.
3. Grewal, I. S., and R. A. Flavell. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 1996;153:85.
4. Shimizu, K., U. Schonbeck, F. Mach, P. Libby, and R. N. Mitchell. Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *J Immunol* 2000;165:3506.
5. Shirasugi, N., A. B. Adams, M. M. Durham, A. E. Lukacher, H. Xu, P. Rees et al. Prevention of chronic rejection in murine cardiac allografts: a comparison of chimerism- and nonchimerism-inducing costimulation blockade-based tolerance induction regimens. *J Immunol* 2002;169:2677.
6. Guillot, C., P. Mathieu, H. Coathalem, B. Le Mauff, M. G. Castro, L. Tesson et al. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 2000;164:5258.
7. Guillot, C., C. Guillonnet, P. Mathieu, C. A. Gerdes, S. Menoret, C. Braudeau et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 2002;168:1600.

8. Yamashita, K., T. Masunaga, N. Yanagida, M. Takehara, T. Hashimoto, T. Kobayashi et al. Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies. *Transplantation* 2003;76:1089.
9. Adams, A. B., N. Shirasugi, T. R. Jones, M. M. Durham, E. A. Strobert, S. Cowan et al. Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *J Immunol* 2005;174:542.
10. Dengler, T. J., G. Szabo, B. Sido, W. Nottmeyer, R. Zimmerman, C. F. Vahl et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999;67:392.
11. Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002;3:1097.
12. Guillot, C., S. Menoret, C. Guillonneau, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Anegon. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003;101:3325.
13. Tsai, M. K., H. N. Ho, H. F. Chien, P. Ou-Yang, C. J. Lee, and P. H. Lee. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004;77:48.
14. Haspot, F., F. Villemain, G. Laflamme, F. Coulon, D. Olive, J. Tiollier et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002;99:2228.
15. Perrin, P. J., C. H. June, J. H. Maldonado, R. B. Ratts, and M. K. Racke. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999;163:1704.

16. Silver, P. B., K. S. Hathcock, C. C. Chan, B. Wiggert, and R. R. Caspi. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol* 2000;165:5041.
17. Yu, X. Z., S. J. Bidwell, P. J. Martin, and C. Anasetti. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2000;164:4564.
18. Tacke, M., G. J. Clark, M. J. Dallman, and T. Hunig. Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester. *J Immunol* 1995;154:5121.
19. Tacke, M., G. Hanke, T. Hanke, and T. Hunig. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 1997;27:239.
20. Laskowski, I. A., J. Pratschke, M. J. Wilhelm, V. M. Dong, F. Beato, M. Taal et al. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:519.
21. Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal et al. Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells. *Am J Transplant* 2005;5:2339.
22. Dong, V. M., X. Yuan, A. J. Coito, A. M. Waaga, M. H. Sayegh, and A. Chandraker. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2002;73:1310.
23. Ono, K., and E. S. Lindsey. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969;57:225.

24. David, A., H. Coupel-Claude, J. Chetritt, L. Tesson, A. Cassard, B. Charreau et al. Anti-adenovirus immune responses in rats are enhanced by interleukin 4 but not interleukin 10 produced by recombinant adenovirus. *Hum Gene Ther* 1998;9:1755.
25. Guillonéau, C., C. Louvet, K. Renaudin, J. M. Heslan, M. Heslan, L. Tesson et al.. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 2004;172:1619.
26. Braudeau, C., D. Bouchet, C. Toquet, L. Tesson, S. Menoret, S. Iyer, C. et al.. Generation of heme oxygenase-1-transgenic rats. *Exp Biol Med (Maywood)*2003; 228:466.
27. Braudeau, C., D. Bouchet, L. Tesson, S. Iyer, S. Remy, R. Buelow et al.. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 2004;11:701.
28. Wu, G., S. Pfeiffer, C. Schroder, T. Zhang, B. N. Nguyen, W. Lea, et al.. Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft. *Xenotransplantation* 2005;12:197.
29. Munn, D. H., M. D. Sharma, and A. L. Mellor. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100.

Table 1. Guillonneau, Séveno et al.

Table 1. Immunohistological analysis of graft infiltrating leukocytes at a late time point after transplantation

Group	OX1/OX30
Naive	-, 0+
Syngeneic	-, 0/-
AdCD40Ig	++, +/++, ++, +, ++, +, +/+, +/++
AdCD40Ig + anti-CD28 Tol	+, +, +
AdCD40Ig + anti-CD28 CR	+, +, ++, +

Graft samples were analyzed by immunostaining. Intensity of the stain was evaluated according to an arbitrary scale and scored as described in the Materials and Methods section.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Co-treatment with anti-CD28 mAb and AdCD40Ig leads to indefinite allograft survival.

LEW.1A rats were received LEW.1W heart transplants. Recipients were either untreated (n=9), or received on day 0 an i.v. injection of 10^{10} PI of the noncoding adenovirus Add1324 (n=9) or of the AdCD40Ig adenovirus (n=11). One group was treated with 4mg/kg/day of anti-CD28 Ab from day 0 to day 7 after transplantation (n=9). One other group received a combined treatment with AdCD40Ig (10^{10} PI on day 0) and anti-CD28 mAb (4mg/kg/day from day 0 to day 7; n=14). Graft survival was evaluated by daily palpation of heartbeat through the abdomen. *, p<0.05 vs. untreated or Add1324-treated grafts; °, p<0.05 vs. anti-CD28.

Figure 2. CD28 blockade protects from chronic allograft vasculopathy.

Long-surviving grafts were collected at day 120 after transplantation from syngeneic non-treated recipients and recipients transduced with AdCD40Ig and treated or not with anti-CD28 antibodies. A morphometric analysis of chronic rejection was performed by a pathologist in a blinded fashion. The severity of each criteria was graded using a scoring system described in the Materials and Methods section. Syngeneic, n=7; AdCD40Ig, n=17; AdCD40Ig + anti-CD28, n=11. Individual observations (arbitrary units; AU) are reported with the horizontal bar representing the mean.

Figure 3. Inhibition of cytokine expression in heart grafts of long-surviving recipients following CD28 and CD40L blockade.

Total RNA was extracted from cardiac grafts 120 days after gene transfer for the groups receiving AdCD40Ig alone (square symbols, n=11) or in combination with anti-CD28 antibodies (triangles, n=11). Animal that were ascribed as tolerant (Tol) by the histopathological analysis are represented by open triangles, whereas those that had lesions of vasculitis and occluded vessels are represented by black triangles. Total RNA was then analyzed by quantitative RT-PCR for TGF β 1, IFN γ , IL-2, IL-6, IL-10, perforin, HO-1, CTLA-4 and IDO transcription. Messenger RNA levels were normalized to the level of HPRT and expressed as the fold change relative to corresponding mRNA levels in syngeneic grafts. Individual observations (arbitrary units; AU) are reported with the horizontal bar representing the mean. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.005.

Figure 4. Inhibition of alloantibodies in chronic-rejection free anti-CD28 mAb plus AdCD40Ig-treated recipients.

LEW.1A rats received LEW.1W heart transplants. Recipients received either an i.v. injection of 10^{10} PI of the noncoding adenovirus Add1324 (empty triangles; n=6) or of the AdCD40Ig adenovirus (lozenges; n=9) on day 0, or received a co-treatment combining AdCD40Ig and anti-CD28 antibodies (4mg/kg/day from day 0 to day 7; n=10). These co-treated recipients are represented separately, according to whether they were ascribed as tolerant (black dots; n=5) or as having chronic rejection lesions (crosses; n=5) by the histopathological analysis. Naïve animals were used as negative controls (square symbols; n=4). Sera diluted 1/10 were analyzed 120 days after transplantation by flow cytometry after reaction with donor-type spleen cells for the presence of total IgG alloantibodies and of the IgG1, IgG2a or IgG2b

subclasses. Individual observations (mean channel fluorescence; MCF) are reported with the horizontal bar representing the mean. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.005$.

Figure 5. Humoral responses against cognate antigens.

LEW.1A rats received LEW.1W heart transplants. Recipients were co-treated with AdCD40Ig plus 3G8 irrelevant antibodies (black triangles; $n=2$) or with AdCD40Ig plus anti-CD28 antibodies (4mg/kg/day from day 0 to day 7; empty triangles $n=3$). Recipients were also immunized i.v. on day 0 with 10^9 SRBC. On day 90, animals were rechallenged with a new injection of 10^9 SRBC and simultaneously underwent a primary i.v. immunization with 10^7 K562 cells. Serum samples collected on days 17 (A, B) and 107 (C-F) were analyzed for IgG (A, C, E) and IgM (B, D, F) reactivity against K562 cells and SRBC by flow cytometry. Serum from naïve animals was used as a negative control. In E and F, animals are shown individually since they were ascribed as Tol (lozenges) or RC (empty triangles) after immunohistological analysis of heart allograft at day 120. Results are expressed as mean channel fluorescence for the indicated dilution of serum.

Figure 6. Proliferative activity of splenocytes and T cells from cardiac recipients.

Splenocytes (A, C) and spleen-derived T cells (B, D) were harvested at day 120 post transplantation from cardiac recipients treated with either Add1324 or AdCD40Ig with or without anti-CD28 antibodies. MLR responses were assessed against irradiated first party LEW.1W or third party BN APCs (A, B). Cells were also added with a 1:2 ratio to naïve MLR reactions consisting of LEW.1A splenocytes responding to irradiated LEW.1W or BN APCs (C, D). Proliferation was measured after 5 days by incorporation of ^3H -thymidine during the last 8 hours of culture. In all the experiments, cell viability was confirmed by their ability to proliferate upon ConA stimulation (data not shown). Results are expressed as the

percentage (mean \pm SD) of cell proliferation relative to the proliferation of cells from Add1324-treated. In all cases, specific counts ranged from 30,000 to 100,000 cpm. Animals from the AdCD40Ig + anti-CD28 antibody-treated group, ascribed as tolerant or having chronic rejection lesions by histopathology, are represented separately. *, $p < 0.05$ as compared with responses from Add1324-treated rats.

Figure 1. Gullonneau, Séveno et al.

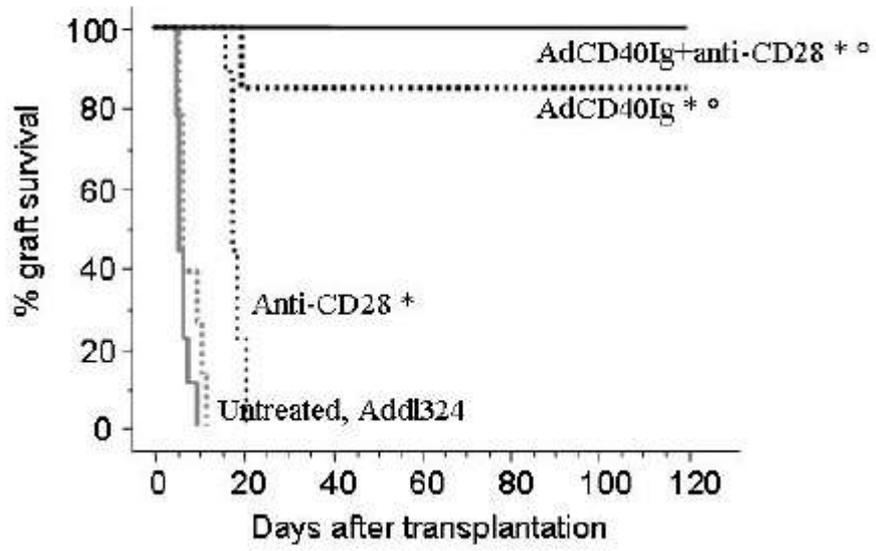


Figure 3. Guillonneau, Séveno et al.

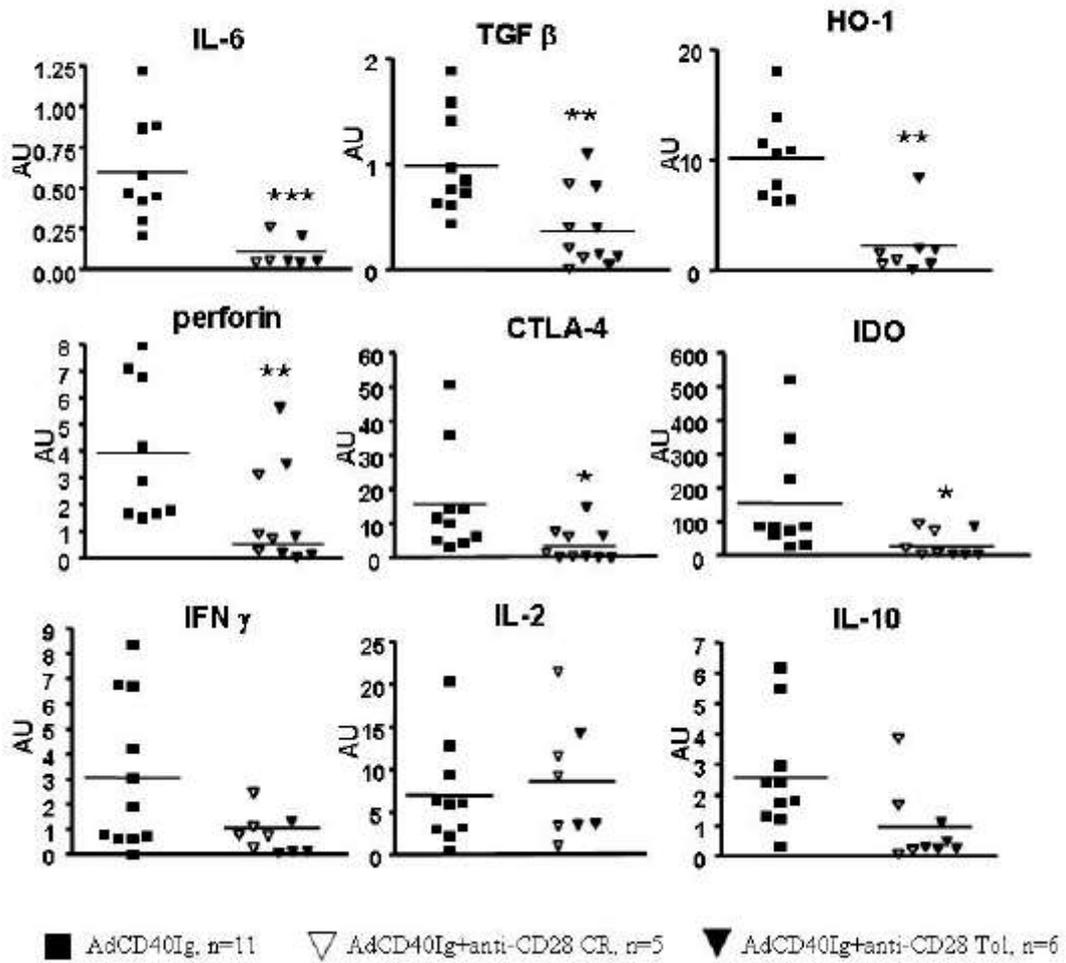
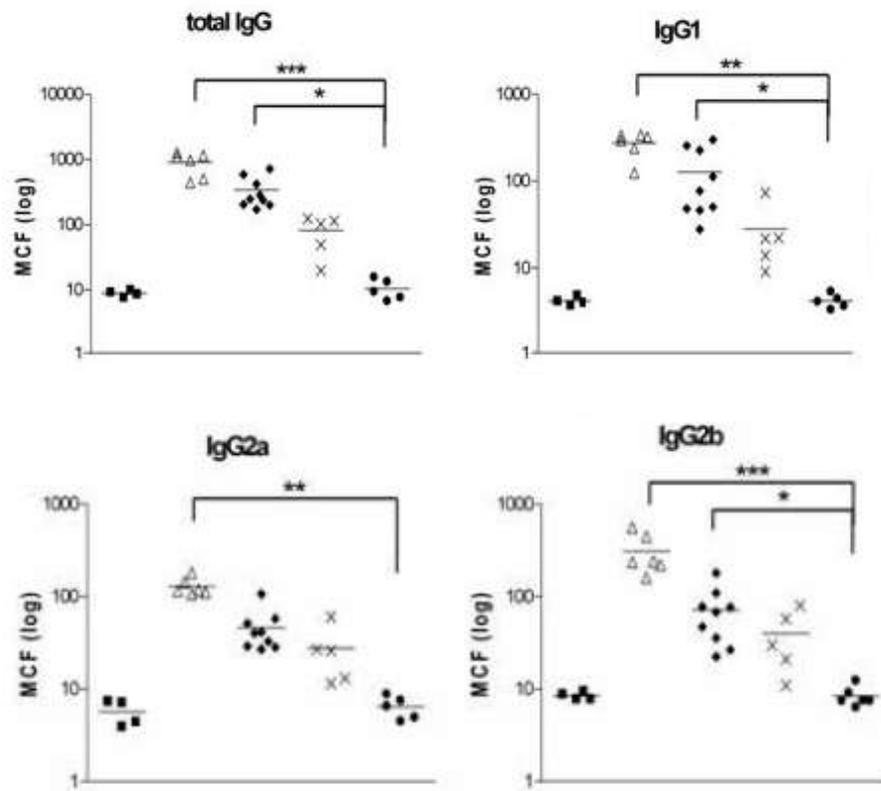


Figure 4. Guillonneau, Séveno et al.



■ Naive △ Add1324 ◆ AdCD40Ig × AdCD40Ig + anti-CD28 CR ● AdCD40Ig + anti-CD28 Tol

Figure 5. Guillonau, Séveno et al.

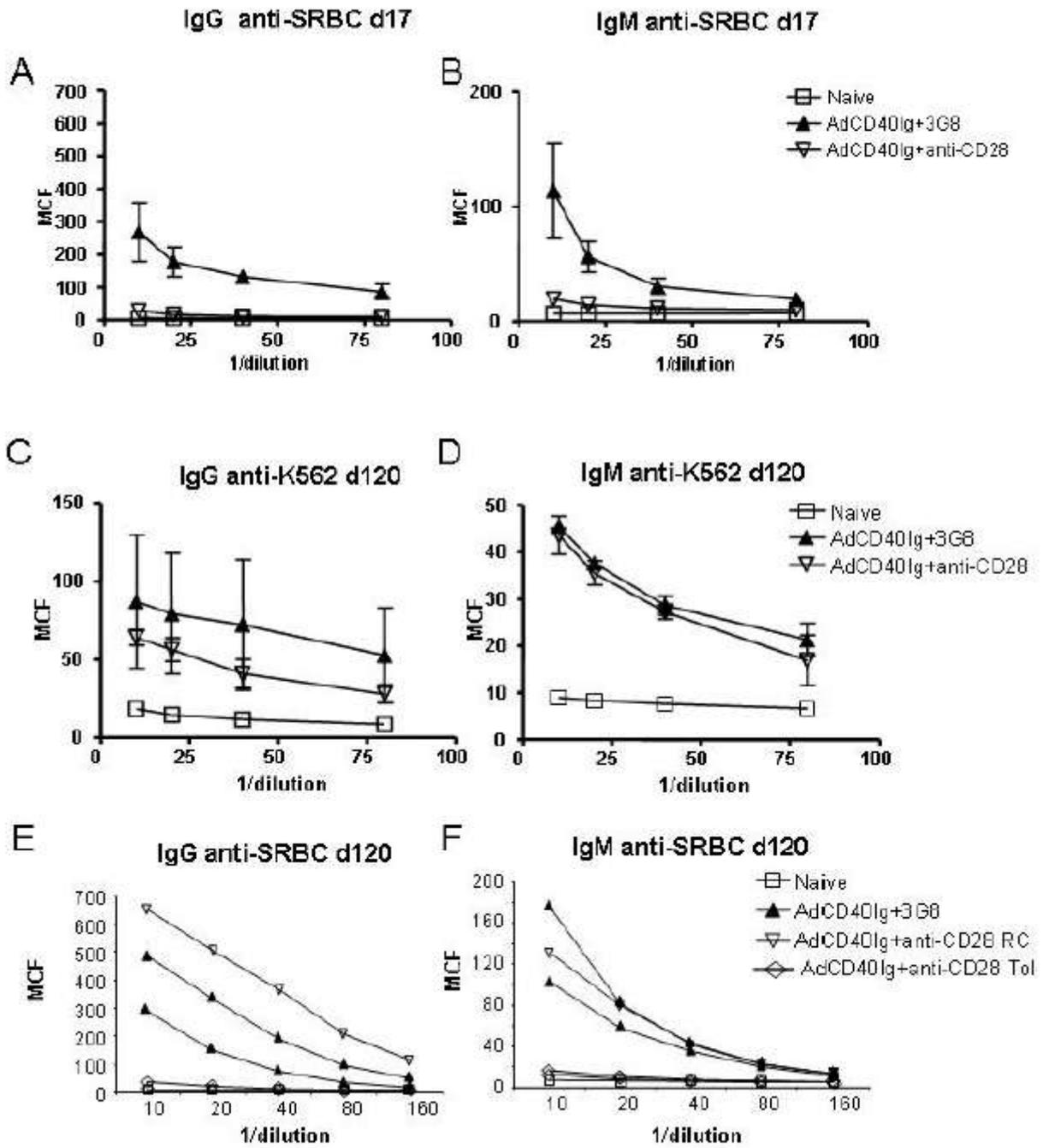
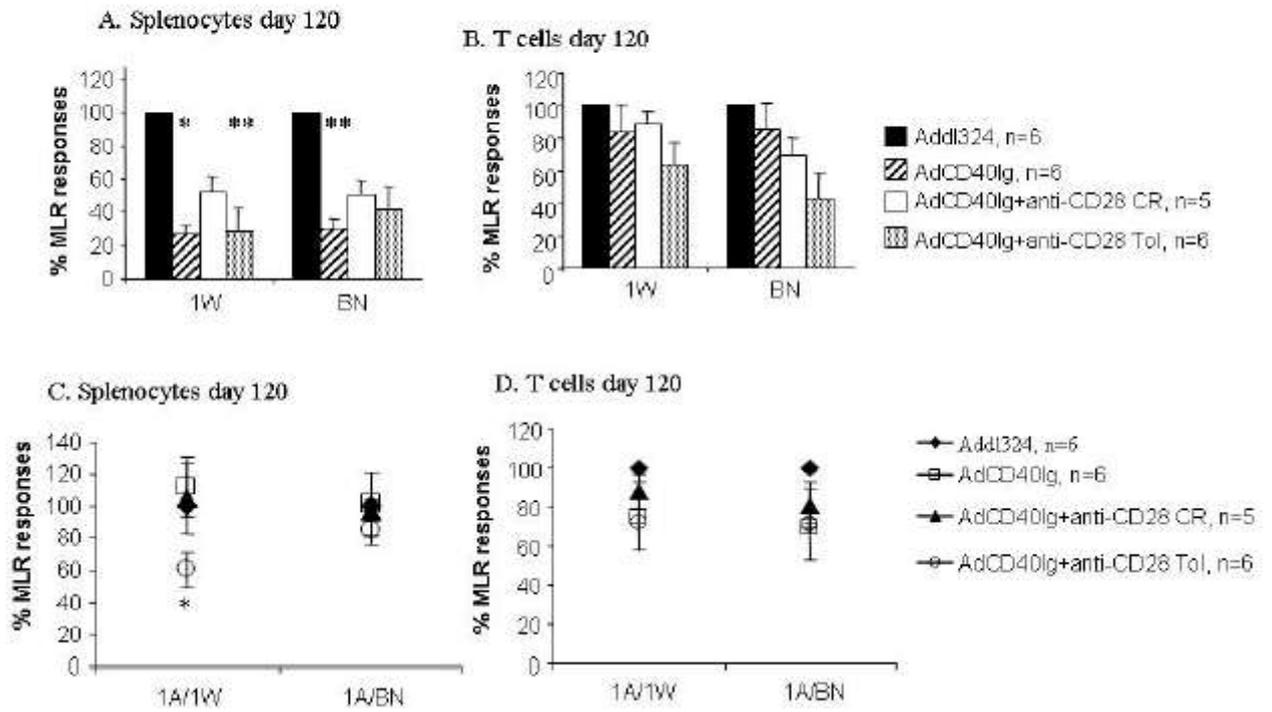
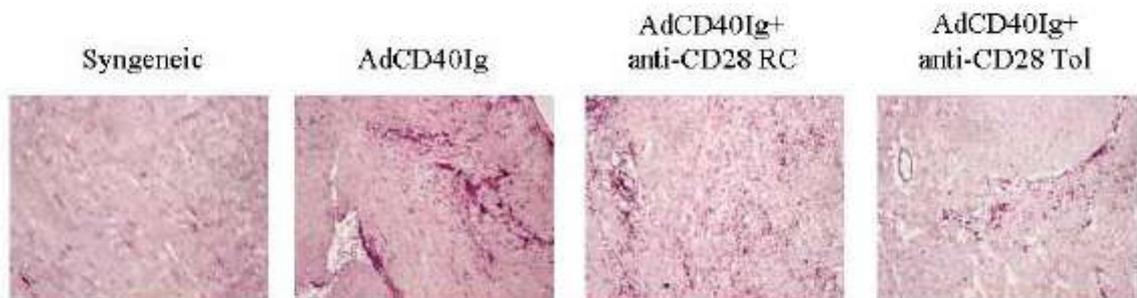


Figure 6. Guillonau, Séveno et al.



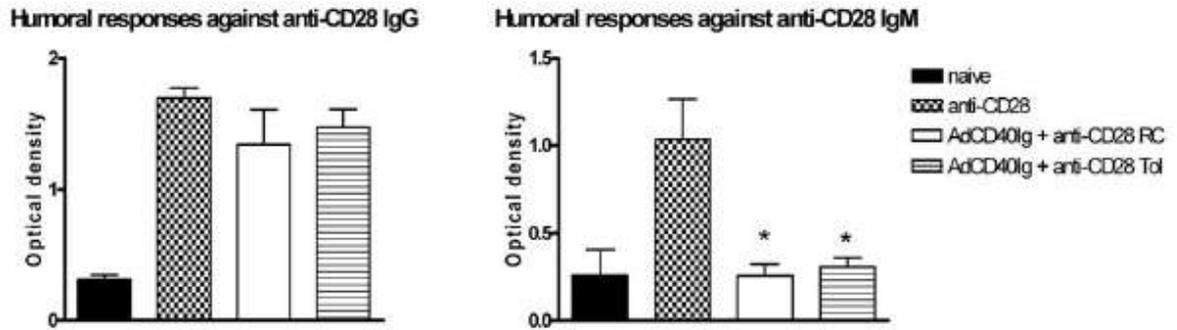
Data not shown. Gullonneau, Séveno et al.



Data not shown. Immunohistological analysis of graft-infiltrating leukocytes at late time point after transplantation.

Long-surviving graft were harvested at day 120 after transplantation and analyzed by immunohistology using anti-CD45 Abs (OX1/OX30). Figures are representative of 4 to 6 animals analyzed in each group. Objective X10.

Data not shown. Guillonnet, Séveno et al.



Data not shown. Detection of anti-CD28 antibody responses in recipients of heart allografts expressing CD40Ig with anti-CD28. Detection of serum anti-anti-CD28 antibodies. Serum from naive, animals transplanted and treated with anti-CD28 alone or with CD40Ig+anti-CD28 displaying or not chronic rejection lesions was harvested 20 days after transplantation and analyzed by ELISA (mean) for the presence of antibody responses against anti-ICOS. Results were expressed in optical density \pm SD. *, $p < 0.05$ vs. anti-CD28.

Résultats complémentaires et discussion

Dans cet article, nous avons montré l'effet bénéfique du blocage simultané des voies CD40/CD40L et CD28/B7. Cette double inhibition permet d'obtenir une tolérance opérationnelle chez 55% des receveurs, alors que le traitement avec l'AdCD40Ig seul ou l'antiCD28 associé à la CSA induit du rejet chronique chez 100% des animaux LS. Chez le rat, cette double inhibition, utilisant deux adénovirus (AdCTLA4-Ig et AdCD40Ig) permet d'obtenir une longue survie d'allogreffe cardiaque mais ne permet pas de prévenir le rejet chronique (Yamashita, Masunaga et al. 2003). Dans cette étude, nous nous sommes donc attachés à analyser l'effet bénéfique d'un traitement d'induction ciblant spécifiquement le CD28 sur un modèle de rejet chronique d'allogreffe cardiaque, ainsi que les mécanismes mis en jeu.

Lors de l'inhibition de la voie CD40/CD40L seule, les mécanismes régulateurs passent par l'induction de cellules régulatrices T CD8⁺CD45RC^{low} capables de sécréter de l'IFN γ et d'activer IDO (Guillonnet, Aubry et al. 2005)(Guillonnet, en préparation). A l'inverse, dans le modèle antiCD28+CSA, les cellules régulatrices, bien qu'encore non caractérisées, semblent appartenir au compartiment non-T. Le blocage des deux voies de costimulation semble favoriser le développement de cellules régulatrices non-T, au détriment des cellules T CD8⁺CD45RC^{low}. En effet, *in vitro*, les splénocytes sont inhibés alors que les lymphocytes T purifiés prolifèrent normalement. Nous souhaitons confirmer ces résultats obtenus en MLR et nous avons donc étudié la production d'IFN γ par ces cellules après une stimulation par la PMA/ionomycine. Chez les deux animaux cotraités analysés, nous n'avons pas observé de production d'IFN γ , indiquant que les cellules T CD8⁺CD45RC^{low} de ces animaux n'auraient pas les mêmes caractéristiques que celles présentes chez les animaux traités par l'AdCD40Ig seul. Ces cellules ont également été purifiées et seront analysées par PCR quantitative en temps réel pour des marqueurs de la régulation tels que FoxP3, CTLA-4 ou GITR.

Lors de l'analyse *in vitro*, nous avons étudié le rôle de l'anergie dans l'inhibition de la prolifération des splénocytes. D'une manière surprenante, l'ajout d'IL-2 dans le milieu de culture restaure la prolifération des splénocytes issus des animaux traités par l'AdCD40Ig et des animaux cotraités tolérants (Tol), alors qu'aucun effet n'est observé sur les splénocytes des animaux cotraités en rejet chronique (CR) (**figure 11**). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence de réponse entre les animaux Tol et CR. Tout d'abord, les cellules régulatrices peuvent agir à des endroits différents de la cascade d'activation T. Si les cellules régulatrices des animaux CR agissent en aval du signal induit par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur, l'ajout d'IL-2 dans

le milieu sera inopérant. Ensuite, les cellules T des animaux CR peuvent exprimer un récepteur de faible affinité pour l'IL-2 (IL-2R β), ce qui rend les cellules insensibles aux doses utilisées dans notre étude (100 U/mL). Il a ainsi été montré dans un modèle d'immunothérapie des tumeurs que des CD8⁺ tolérants expriment ce type de récepteur et ne prolifèrent *in vitro* qu'avec de fortes doses d'IL-2 (1000 U/mL) (Teague, Sather et al. 2006). Enfin, les cellules alloréactives des animaux CR peuvent être d'un phénotype plutôt mémoire et être activées préférentiellement par d'autres cytokines, telles que l'IL-15 (Zhang, Sun et al. 1998).

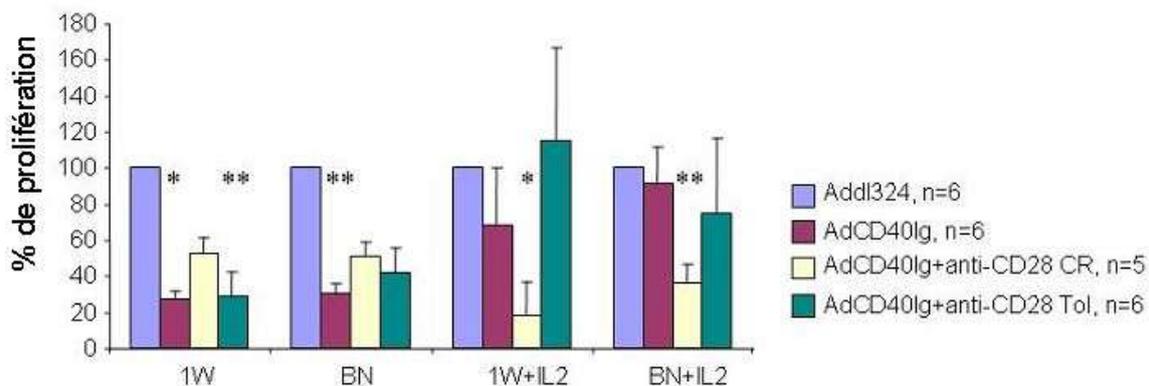


Figure 11 : Réponse proliférative des splénocytes des animaux LS après ajout d'IL-2. *, $p < 0.05$ vs Addl324 ; **, $p < 0.01$ vs Addl324 .

D'autre part, les mécanismes présents chez les animaux Tol restent également à déterminer. Le rôle d'IDO a été mis en évidence aussi bien dans le modèle antiCD28+CSA que dans le modèle AdCD40Ig (Guillonneau, en préparation). Il serait donc intéressant d'étudier son rôle dans notre modèle, *in vitro* puis, éventuellement, *in vivo*. D'autres facteurs peuvent être également impliqués tels que iNOs, HO-1 ou des cytokines (IL-10, IL-4, TGF β ...). L'implication de différentes cytokines a été testée *in vitro* par dosage ELISA dans les surnageants de MLR. Aucune différence n'a été observée entre les animaux AdCD40Ig et les animaux cotraités. De même, il n'y a pas de différence significative au sein du groupe cotraité entre les animaux tolérants et les animaux présentant du rejet chronique (**figure 12**). Ceci indique que ces cytokines ne sont pas impliquées dans l'inhibition de la prolifération *in vitro*. Cependant, il est également possible que les cytokines soient consommées par les cellules cibles au fur et à mesure de leur sécrétion.

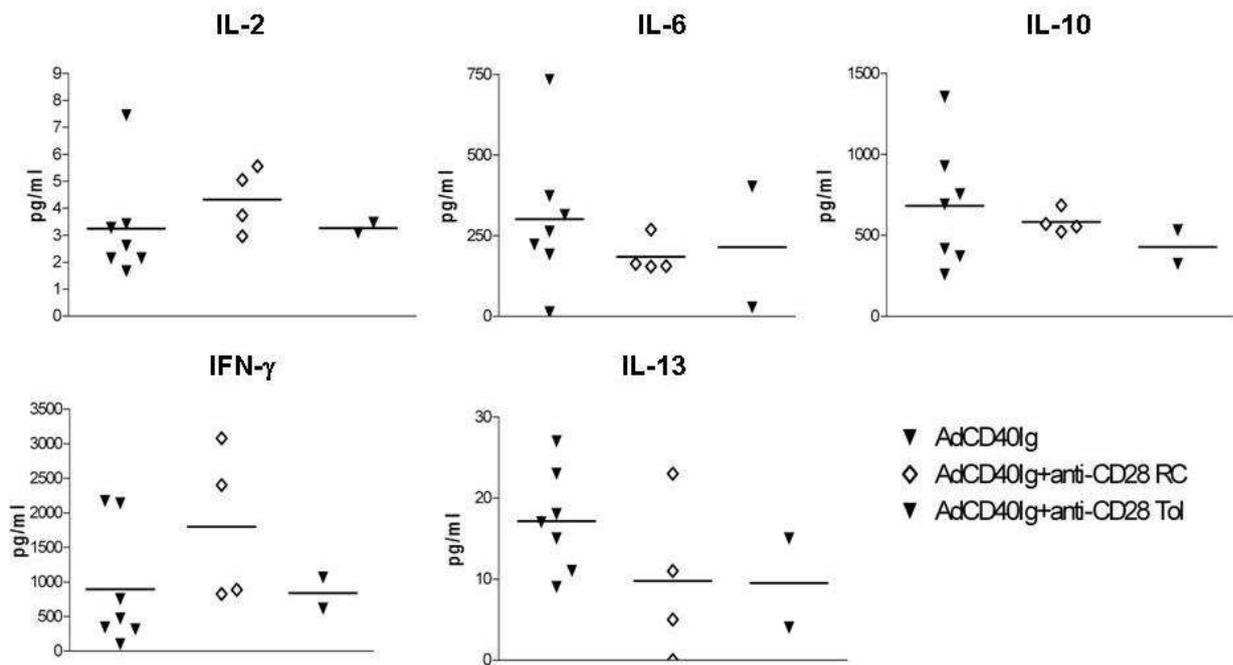


Figure 12 : Analyse des cytokines dans le surnageant de MLR. Les surnageants sont récoltés après 4 jours de culture. Les MLR sont réalisées avec les splénocytes des animaux AdCD40Ig et cotraités 120 jours après la greffe et stimulés par des CPA Lew.1W. Les surnageants ont été analysés par ELISA pour les cytokines suivantes : IL-6, IL-10, IL-13 et IFN γ . L'IL-2 a été dosée en mesurant la prolifération de cellules sensibles à l'IL-2 (lignée CTLL2).

Chez l'homme, il a été montré que des patients présentant un rejet chronique avaient une population T CD8⁺ cytotoxique accrue, comparativement à des patients tolérants (Baeten, Louis et al. 2006). La présence de rejet chronique chez les animaux cotraités pourrait ainsi être due à une réponse cytotoxique contre l'endothélium du greffon. Nous avons donc étudié la réponse cytotoxique anti-donneur des animaux des différents groupes. Comme pour les cytokines, aucune différence dans la capacité de lyse des cellules n'a été mise en évidence (**figure 13**), ce qui suggère que ce n'est pas ce paramètre qui est responsable de l'apparition ou non des lésions de rejet chronique.

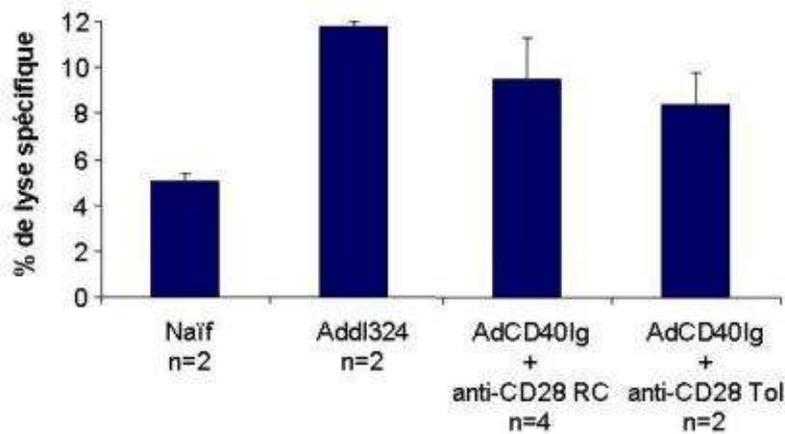


Figure 13 : Activité cytotoxique anti-donneur des splénocytes 120 jours après la greffe au ratio effecteur/cible : 100/1. Les résultats sont exprimés en % de lyse spécifique \pm erreur standard. *, $p < 0.05$ vs Addl324.

Enfin, toujours dans le but de comprendre pourquoi au sein d'un même groupe des animaux présentent des lésions de rejet chronique et d'autres pas, nous avons regardé si une différence de réponse au traitement (réponse anti-CD28) pouvait être à l'origine des différences observées. Nous avons donc étudié les réponses humorales contre l'anticorps anti-CD28 ainsi que les taux circulants d'anticorps 20 jours après la greffe (data not shown, article 2). D'une façon surprenante, les animaux présentent une réponse humorale IgG anti-CD28 identique à celle des animaux traités avec l'anti-CD28 seul. Par contre, la réponse IgM est significativement inhibée chez les cotraités comparativement à la réponse des animaux ayant reçu seulement l'anticorps. Aucune différence n'est constatée entre les animaux tolérants et les animaux en rejet chronique, que ce soit au niveau de la réponse anti-JJ319 ou au niveau des taux sériques de l'anticorps 20 jours après la greffe.

Au cours de cette étude, nous avons également regardé si les splénocytes de nos animaux cotraités étaient capables ou non de transférer la tolérance à des animaux naïfs, greffés et irradiés. Le transfert de 200 millions de splénocytes ($n=3$) ou de 26 millions de cellules non-T ($n=3$) ne permet pas de prolonger la survie des receveurs naïfs. Ces résultats correspondraient plutôt à ceux observés dans le modèle antiCD28+CSA où le transfert de cellules ne permet pas non plus d'induire une prolongation de survie. Bien que l'on observe une tolérance effective (survie à long terme et absence de rejet chronique), les mécanismes régulateurs à l'œuvre chez ces animaux ne sont pas transférables à un animal naïf. A l'inverse, dans le modèle AdCD40Ig seul, un transfert est possible, médié par la population T CD8⁺ (Guillonéau, en préparation).

En conclusion, nous avons montré que l'association d'un traitement d'induction anti-CD28 et l'inhibition à long terme de la voie CD40/CD40L permet de réduire l'incidence du rejet

chronique observé dans les groupes utilisant uniquement l'un ou l'autre traitement. Cependant, cette amélioration ne concerne pas 100% des receveurs et les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore élucidés.

Conclusion-Perspectives

Dans cette première partie, nous avons étudié l'effet d'une inhibition spécifique de la voie CD28/B7 dans des modèles de rejet aigu et chronique. Dans le modèle de rejet aigu, nous avons utilisé la CSA pour renforcer l'effet du CD28. Cependant, cette association ne permet pas d'obtenir une tolérance complète. Des études ont suggéré que les immunosuppresseurs agissant en amont du signal induit par l'IL-2 prévenait le développement de mécanismes régulateurs naturels (Coenen, Koenen et al. 2006) ou induits par le blocage de la costimulation (Sho, Sandner et al. 2002; Taylor, Lees et al. 2002). Il pourrait donc être intéressant de tester d'autres immunosuppresseurs, tels que la rapamycine, qui agissent sur des étapes plus tardives de l'activation T. Il apparaît également qu'un signal passant par le CD28 soit nécessaire à l'activation des T régulateurs. Lorsque ce signal est absent, soit par utilisation de la CSA, soit par inhibition de la costimulation (anti-CD28 mAb (Haspot, Seveno et al. 2005) ou CTLA4-Ig (Guillot, Menoret et al. 2003)), d'autres mécanismes portés par des cellules non-T semblent se mettre en place. C'est le cas notamment dans un modèle d'allogreffe cardiaque utilisant le CTLA4-Ig où les mécanismes régulateurs sont portés par des cellules dendritiques Ox62⁺ (Guillot, Menoret et al. 2003) ou dans un modèle d'allogreffe rénale où, suite au blocage du CD28, des cellules régulatrices B7⁺/CD6⁻ ont été mises en évidence (Haspot, Seveno et al. 2005). De la même façon, l'association anti-CD28+CSA semble favoriser l'apparition de cellules régulatrices portant également le marqueur B7 (article 1). Dans le modèle de rejet chronique utilisant l'AdCD40Ig, les cellules décrites sont de phénotype CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet, en préparation). Lorsqu'un anticorps antiCD28 est ajouté, cela entraîne une modification des phénomènes régulateurs avec notamment la suppression de la production d'IFN γ par ces cellules (article 2). Dans une autre étude associant l'AdCD40Ig avec le blocage de la voie ICOS/ICOSL, les cellules régulatrices obtenues appartiennent également au compartiment lymphocytaire T (Guillonnet, Aubry et al. 2005), confirmant que c'est bien l'inhibition du signal transduit par le CD28 qui induit le développement de cellules régulatrices non-T.

Utilisé en association avec le CD40Ig, le CTLA4-Ig n'a pas les mêmes effets qu'une inhibition spécifique du CD28 par un anticorps antagoniste anti-CD28. En effet, dans ce cas, les receveurs développent tous des lésions de rejet chronique et rejettent une greffe de peau du donneur, indiquant une absence de tolérance (Yamashita, Masunaga et al. 2003). L'utilisation d'un anticorps antiCD28, au contraire permet d'obtenir une tolérance opérationnelle dans 55% des cas.

Il a déjà été montré que si le CTLA4-Ig et l'anti-CD28 sont aussi efficaces l'un que l'autre pour inhiber les réponses alloréactives *in vitro*, seul l'anti-CD28 permettait de maintenir l'immunocompétence des receveurs vis à vis d'antigènes solubles (Haspot, Villemain et al. 2002). Par contre, les animaux traités avec du CTLA4-Ig ont une réponse humorale diminuée vis à vis d'antigènes exogènes (Guillot, Mathieu et al. 2000). Le maintien de l'immunocompétence lors du traitement par l'AdCD40Ig et l'anti-CD28 a également été montré dans notre modèle où les receveurs sont capables de répondre à l'injection d'une lignée de cellules humaines (**article 2**). L'inhibition de la prolifération des splénocytes des animaux cotraités observée *in vitro* vis à vis de CPA tierce partie ne semble donc pas refléter la situation *in vivo* (**tableau 4**). Par conséquent, il serait intéressant de regarder dans le modèle antiCD28+CSA si l'on observe le même phénomène ou si l'inhibition *in vitro* se retrouve *in vivo*, notamment à l'aide de greffes de peau et/ou d'immunisation par des globules rouges de mouton.

Tableau 4 : Tableau comparatif des différents résultats obtenus suite au blocage des voies CD40/CD40L et/ou CD28/B7. Les résultats sur le modèle AdCD40Ig ont été fournis par C. Guillonnet (Guillonnet, en préparation). Les analyses ont été effectuées plus de 100 jours après la greffe.

	AdCD40Ig	AntiCD28+CSA	AdCD40Ig+antiCD28	
% de rejet chronique	100%	100%	45%	
Présence d'allo anticorps (IgG)	Similaire aux contrôles#	Similaire aux contrôles#	Diminuée (RC)	Très faible (Tol)
Immunocompétence	oui	Non testé	oui	
Prolifération vs donneur	inhibé	inhibé	inhibé	
en MLR vs tierce partie	inhibé	inhibé	inhibé	
Inhibition d'une coculture	non	non	Non (RC)	Oui (Tol)
Cellules régulatrices	T CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	B7 ⁺ CD6 ⁻	Non-T	
Transfert de survie	Oui	Non	Non	

Les contrôles sont des animaux non traités ayant rejeté leur greffon.

Concernant la génération de cellules régulatrices, les résultats obtenus dans cette étude et résumés dans le **tableau 4** nous indiquent que leur activation se fait de façon précoce, probablement au cours du premier mois suivant la greffe. En effet, dans le modèle antiCD28+CSA, le traitement d'induction ne dure au maximum qu'une semaine. Dans le modèle AdCD40Ig+antiCD28, l'administration de 8 doses d'anti-CD28 durant 8 jours suffit à modifier profondément les mécanismes régulateurs induits par l'AdCD40Ig seul. Il pourrait donc être intéressant de n'utiliser le CD40Ig qu'en traitement d'induction afin de vérifier si cela permet d'obtenir également une tolérance. En cas de réponse affirmative, cela pourrait permettre une étude chez le primate en association avec la molécule anti-CD28 utilisable chez l'homme (ScFv28AT) (Vanhove, Laflamme et al. 2003) actuellement en cours de développement au laboratoire. Chez le primate, un traitement d'induction associant le CTLA4-Ig et un anticorps anti-CD40L a permis d'obtenir une longue survie chez deux primates sur quatre (Kirk, Harlan et al. 1997), suggérant qu'un tel résultat pourrait être obtenu avec l'anti-CD28.

Une deuxième remarque concernant les cellules régulatrices est que leur présence ne suffit pas à prévenir le rejet chronique. Ainsi, dans un modèle de transfusion spécifique du donneur, la présence de lésions de rejet chronique est détectée, malgré la présence de cellules régulatrices capables de transférer la tolérance à des receveurs naïfs (Koshiba, Kitade et al. 2003). Le critère commun est la présence d'alloanticorps dans le sérum des receveurs. Ces anticorps, ainsi que des dépôts de complément, sont également détectés au sein du greffon (Koshiba, Kitade et al. 2003; Palomar, Lopez-Hoyos et al. 2005). Chez les receveurs cotraités tolérants, le taux d'alloanticorps circulants est quasi nul suggérant qu'un contrôle de la réponse B est nécessaire à l'obtention d'une tolérance. Cependant, il a également été montré qu'une réponse anti-donneur forte n'était pas nécessairement associée à des lésions de rejet chronique dans un modèle d'allogreffe rénale (Haspot, Seveno et al. 2005). Un rôle protecteur des alloanticorps dirigés contre le CMH de classe I a même été décrit dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Semiletova, Shen et al. 2005a; Semiletova, Shen et al. 2005b). L'absence d'anticorps dans notre modèle est donc peut être le reflet uniquement de l'inhibition efficace de l'ensemble des réponses immunes et le rejet chronique observé chez 45% des cotraités pourrait être dû à d'autres facteurs. Il peut en effet s'agir d'éléments non immunologiques comme des lésions d'ischémie-reperfusion ou la qualité du greffon.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette première partie ont mis en évidence des mécanismes régulateurs induits par l'inhibition spécifique du CD28 associé soit à la CSA, soit au

CD40Ig. Les populations régulatrices impliquées, ainsi que leur mode d'action restent cependant à caractériser de manière plus précise.

Introduction Xénotransplantation

I-La xénotransplantation, historique et choix du donneur

Le succès de l'allogreffe, notamment suite à la découverte de l'immunosuppression, a conduit à une pénurie de greffons dès le milieu des années 80. Malgré des campagnes de sensibilisation visant à augmenter le nombre de donneurs, cette pénurie s'aggrave d'années en années. Ainsi, en 2004, la moitié seulement des patients sur liste d'attente a pu bénéficier d'une greffe (d'après le rapport d'activité 2004 de l'Etablissement Français des Greffes (<http://www.efg.sante.fr>)). Malgré des campagnes d'incitation au don d'organes, 49% des donneurs potentiels ne sont pas prélevés, accroissant ainsi la pénurie d'organes. Cette situation a conduit chercheurs et cliniciens à s'intéresser de nouveau à la xénotransplantation.

Le concept de xénotransplantation n'est pas nouveau. Si l'on excepte les nombreuses créatures imaginaires présentes dans les récits mythologiques (sirène, centaure, faune), les premiers essais de greffes de tissus xénogéniques (essentiellement de la peau) ont eu lieu dès le 17^{ème} siècle et se sont poursuivis épisodiquement au cours des siècles (pour revue (Deschamps, Roux et al. 2005b)). Cependant, la violence des rejets observés a fait décliner l'intérêt pour la xénotransplantation jusqu'à l'arrivée des immunosuppresseurs. Les essais ont alors repris, essentiellement en utilisant des singes comme donneurs. En effet, le choix du singe paraissait plus avantageux en terme d'immunogénicité et de compatibilité physiologique étant donné la proximité phylogénétique entre donneur et receveur. Plusieurs essais ont ainsi montré que les organes de singes permettaient de remplacer des organes humains. La survie maximale (9 mois) lors de ces essais a été obtenue avec un rein de chimpanzé (Reemtsma, McCracken et al. 1964). Cependant, les grands singes appartiennent à des espèces menacées qui se reproduisent mal en captivité et ont peu de jeunes par portée. De plus, leurs organes sont trop petits pour des patients adultes et leur utilisation présente un risque infectieux.

Pour toutes ces raisons, c'est le porc qui a été considéré comme donneur potentiellement plus intéressant. Des essais de greffes hépatiques, rénales, pulmonaires et cardiaques ont permis de montrer qu'il existe, dans une large mesure, une compatibilité physiologique entre le porc et les primates (pour revue (Seveno, Fellous et al. 2005)). Cependant, de nombreux problèmes devront être résolus avant que la xénotransplantation porcine ne devienne une réalité clinique, notamment la barrière immunologique, les risques infectieux et l'acceptation par le public de cette nouvelle

thérapeutique. Ce dernier point ne sera toutefois pas développé dans cette thèse (pour revue (Deschamps, Roux et al. 2005a) et (Seveno, Fellous et al. 2005)).

II-Les barrières immunologiques

II-1 Le rejet hyperaigu

I-1.1 L'épitope Gal et les anticorps naturels xénogéniques

En xénotransplantation, le rejet hyperaigu existe dans de nombreuses combinaisons d'espèces, notamment porc/primate de l'ancien monde, porc/homme, porc/souris ou cochon d'Inde/rat. Ces combinaisons, dans lesquelles des anticorps naturels xénogéniques (ANX) sont directement responsables du rejet, sont appelées discordantes (Calne 1970). Les ANX sont des anticorps préformés qui peuvent représenter jusqu'à 1% des anticorps sériques totaux (Galili, Macher et al. 1985). Leur cible est majoritairement constituée par le glucide Gal(α 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc-R (Gal) présent sur des glycolipides membranaires et des glycoprotéines de nombreux types cellulaires (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses) (Galili, Shohet et al. 1988). L'enzyme responsable de la synthèse de cet épitope, l' α 1-3 galactosyl transférase (GT), est exprimée chez de nombreux mammifères, notamment le rat, la souris, le porc et les singes de l'ancien monde (Galili, Shohet et al. 1988). A l'inverse, elle n'est présente que sous forme de pseudogène chez les primates de l'ancien monde (Asie, Afrique) et chez l'homme (Larsen, Rivera-Marrero et al. 1990) où la glycosylation terminale est assurée par l' α 1-2fucosyltransférase qui génère l'épitope H, précurseur des groupes sanguins humains (**figure 14**). Chez ces derniers, les ANX anti-Gal sont produits par des lymphocytes B-1B, probablement en réponse à une stimulation antigénique permanente par des bactéries de la flore gastro-intestinale exprimant l'épitope Gal (Galili, Mandrell et al. 1988).

Cette divergence évolutive est devenue d'une importance majeure lorsque l'épitope Gal a été identifié comme la principale cible des ANX et donc comme première cause du rejet hyperaigu en xénotransplantation (Good, Cooper et al. 1992; Cooper, Good et al. 1993; Oriol, Ye et al. 1993). Il faut noter également que l'épitope Gal n'est pas le seul reconnu par les ANX et qu'il existe d'autres antigènes pouvant être reconnus par ces anticorps (Vetr and Lipp 1996; Macchiarini, Oriol et al. 1998).

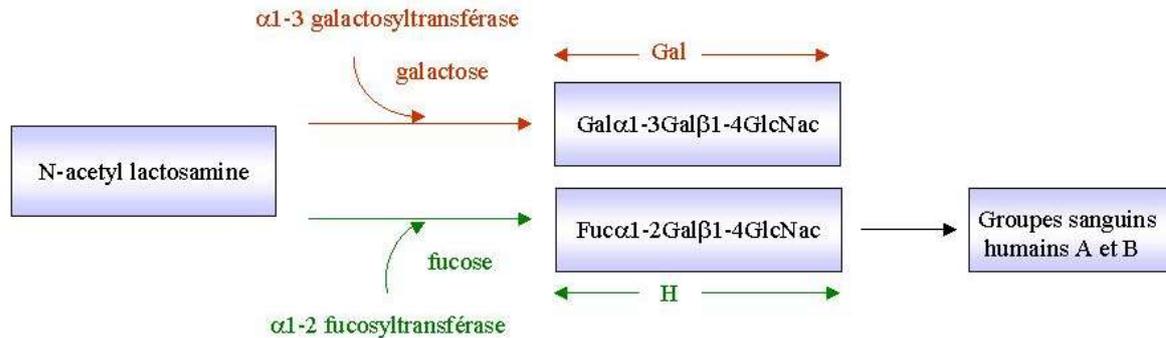


Figure 14: Voies de synthèse enzymatique de l'épitope Gal porcine et des groupes sanguins humains.

I-1.2 Initiation du rejet hyperaigu : le complément et les anticorps naturels xénogéniques

Bien que les ANX soient d'isotypes IgM et IgG et que ces deux isotypes possèdent une activité cytotoxique (Roos, Essers et al. 2001), ce sont principalement les IgM qui sont impliquées dans l'initiation du rejet hyperaigu (Platt, Lindman et al. 1991; Parker, Bruno et al. 1994; Kroshus, Bolman et al. 1996a; Dehoux, Hori et al. 2000). Ceci peut s'expliquer par le fait que les IgM xénoréactives possèdent une forte affinité pour l'épitope Gal (Vanhove and Bach 1993) et qu'une seule IgM fixée sur sa cible peut activer la voie classique du complément alors que plusieurs IgG sont nécessaires pour obtenir le même effet.

Le rejet hyperaigu a été étudié dans de nombreuses combinaisons d'espèces, aussi bien dans des modèles de rongeurs que chez les primates. Dans la combinaison cochon d'Inde/rat, le rejet hyperaigu est déclenché par l'activation de la voie alterne du complément, sans que la fixation des ANX soit nécessaire (Miyagawa, Hirose et al. 1988; Pruitt, Baldwin et al. 1993). Dans la combinaison porc/macaque rhésus, la fixation des IgM anti-Gal provoque l'activation de la voie classique et des dépôts de complément sur les cellules endothéliales porcines (Platt, Fischel et al. 1991; Dalmaso, Vercellotti et al. 1992). Ces observations ont également été confirmées *in vitro* avec l'utilisation de cellules endothéliales porcines comme cibles de sérums humains (Platt, Fischel et al. 1991). Que ce soit par la voie classique ou la voie alterne, l'effet cytotoxique du complément nécessite la formation du complexe d'attaque membranaire (CAM) aussi appelé C5b-9 qui forme des pores dans les membranes cellulaires. Cette dernière étape semble essentielle pour induire l'HAR car des rats déficients pour la molécule C6 présentent un rejet retardé (Brauer, Baldwin et al. 1993). Cependant, des études *in vitro* ont montré que le CAM ne serait pas l'acteur

essentiel de l'HAR mais qu'il s'agirait plutôt du complexe C5b67, responsable de la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale (Saadi and Platt 1995).

Dans des conditions physiologiques, la cascade du complément est régulée par des protéines membranaires (protéines de régulation du complément : PRC) telles que CR1, CD55 ou DAF (Decay Accelerating Factor), CD46 ou MCP (Membrane Cofactor Protein) et CD59 (pour revue (Gasque 2004) et **figure 15**). Cependant, ces protéines semblent interagir de façon espèce-spécifique avec leur cible. Ainsi, des cellules porcines ayant incorporé du DAF humain sont protégées des effets cytotoxiques du complément (Dalmaso, Vercellotti et al. 1991). D'autres études suggèrent que l'effet cytoprotecteur des protéines de régulation ne dépendrait pas uniquement de la compatibilité inter-espèces, mais également du niveau d'expression de ces molécules (Fisicaro, Aminian et al. 2000; van den Berg, Rix et al. 2000).

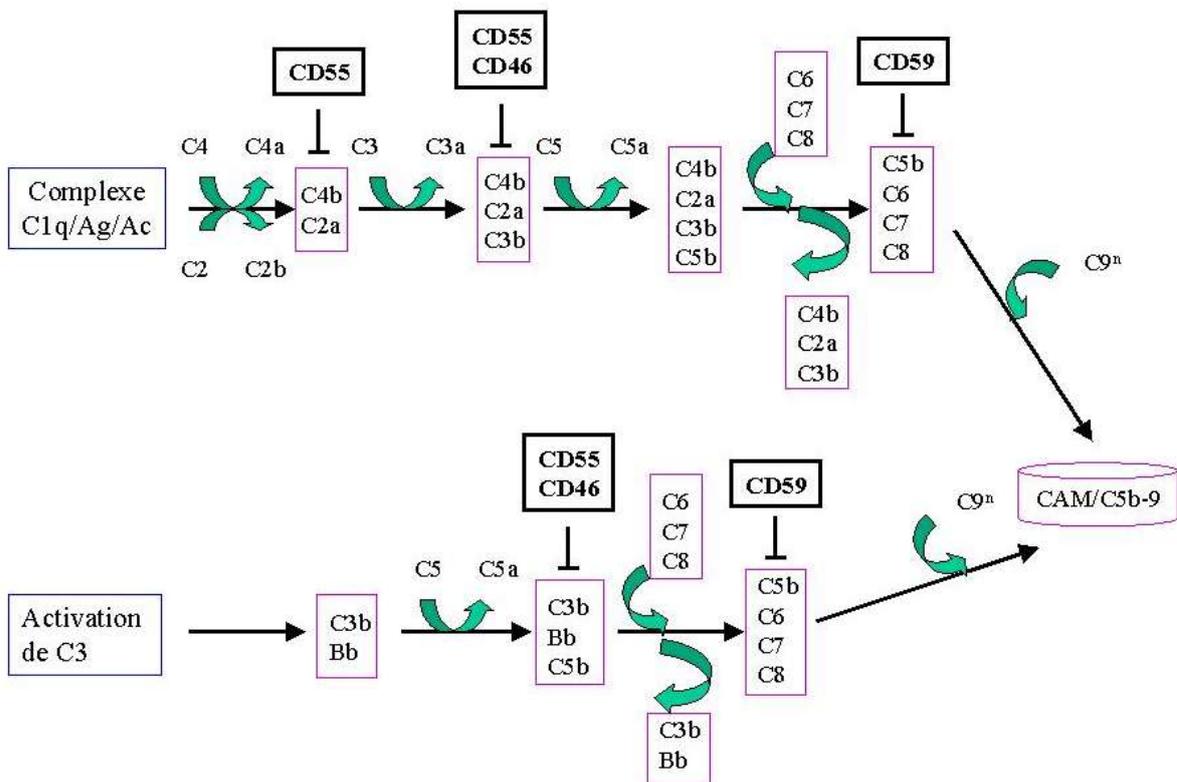


Figure 15 : La voie classique et la voie alterne du complément. Ag : antigène. Ac : anticorps

I-1.3 L'endothélium, acteur principal du rejet hyperaigu

En 1990, le modèle proposé par Platt et Bach place l'activation de l'endothélium au centre du processus de rejet, les autres acteurs principaux étant le complément et les ANX (Platt,

Vercellotti et al. 1990a). Bien que, *in vitro*, l'activation du complément aboutisse à la lyse des cellules endothéliales, *in vivo*, le rejet hyperaigu survient avant que cette lyse puisse avoir lieu (Borche Luis 1994). L'activation de l'endothélium, qualifiée d'activation de type 1, est trop rapide pour permettre la surrégulation de gènes ou la synthèse de protéines. La fixation des complexes C5b-7 sur l'endothélium induit une perte transitoire de l'intégrité endothéliale qui se traduit par l'exposition de la matrice subendothéliale aux composants sanguins (Saadi and Platt 1995). Sont ainsi notamment exposés les facteurs VIIa et von Willebrand qui activent les plaquettes et initient la coagulation (Pareti, Mazzucato et al. 1992). Cet environnement pro-coagulant est également induit par la perte, par les cellules endothéliales, de la thrombomoduline et de l'héparane sulfate induit notamment par le C5a (Platt, Vercellotti et al. 1990a; Platt, Vercellotti et al. 1990b; Platt, Dalmaso et al. 1991). D'autre part, l'activation du complément produit les anaphylotoxines C3a, C4a, et C5a qui ont des effets pro-inflammatoires et chémo-attractants importants. Enfin, l'opsonisation des cellules endothéliales par les fragments C3b permet l'adhésion des polymorphonucléaires neutrophiles via leur récepteur CD11b/CD18 (Vercellotti, Platt et al. 1991). Tous ces phénomènes concourent à un rejet rapide (quelques minutes à quelques heures après la revascularisation du greffon) qui se manifeste par une thrombose des vaisseaux, une suffusion hémorragique et de l'œdème (**figure 16**).

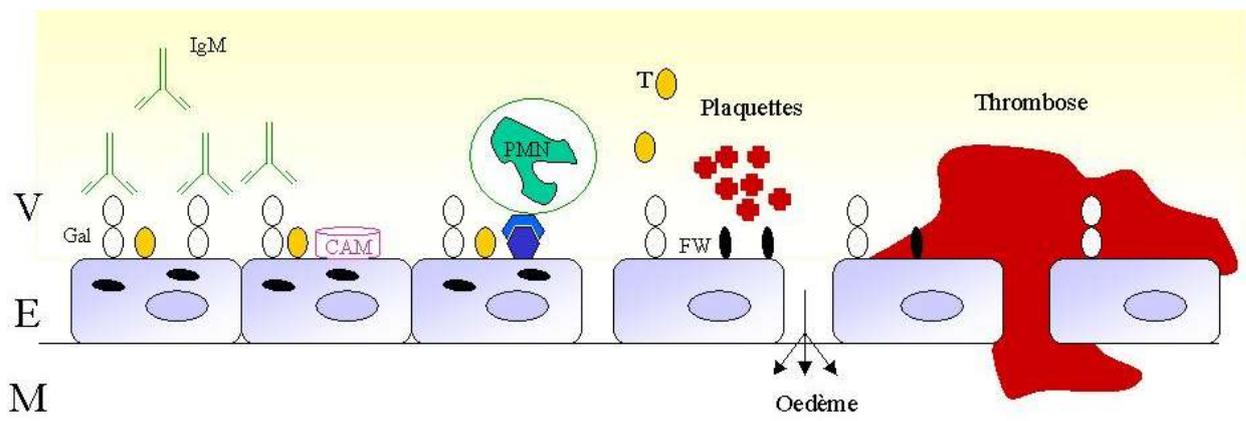


Figure 16 : Physiopathologie du rejet hyperaigu. V : Vaisseau sanguin. E : Endothélium vasculaire. M : Matrice subendothéliale. Gal : Gal(α 1-3)Gal. CAM : Complexe d'attaque membranaire. PMN : Polymorphonucléaire. T : Thrombomoduline. FW : Facteur von Willebrand.

De nombreuses stratégies ont tenté de prévenir l'HAR, aussi bien chez le rongeur que chez le primate. Elles ont permis d'obtenir une prolongation de survie significative. Cependant, un

deuxième type de rejet humoral appelé rejet vasculaire aigu (AVR) est alors responsable de la perte des greffons. Les stratégies pour prévenir ces deux types de rejets humoraux sont décrites au chapitre II-3.

II-2-Le rejet vasculaire aigu.

Dans les modèles discordants, l'AVR est le deuxième type de rejet auquel sont soumis les greffons. Bien que l'AVR puisse être considéré comme une forme tardive d'HAR, plusieurs éléments suggèrent qu'il s'agit d'un phénomène bien distinct. Tout d'abord, l'AVR survient dans les modèles concordants chez lesquels l'HAR n'existe pas. Ensuite, la physiopathologie des deux rejets est différente, l'HAR se caractérisant par une suffusion hémorragique et des thrombi plaquettaires et l'AVR quant à lui se caractérisant par une ischémie focale et une thrombose de la microvasculature constituée principalement de fibrine (Leventhal, Matas et al. 1993). D'autre part, l'AVR implique une activation de l'endothélium avec synthèse protéique, phénomène qui n'a pas lieu lors de l'HAR. Enfin, alors que le complément joue un rôle central dans l'HAR, son rôle est encore discuté dans la survenue du rejet vasculaire aigu.

L'AVR est un rejet rapide, qui survient 3 ou 4 jours après la revascularisation du greffon. Comme dans l'HAR, c'est l'endothélium qui est la cible de ce rejet. Il a surtout été étudié dans des modèles concordants comme les combinaisons hamster/rat ou rat/souris. Des études ont montré, lors du rejet, une augmentation du titre sérique des anticorps xénogéniques, une thrombose des vaisseaux et un infiltrat cellulaire composé essentiellement de macrophages et de cellules NK (Chong, Shen et al. 1996).

II-2.1-Les anticorps xénogéniques induits et le complément

Des études menées chez le primate et chez le rongeur ont montré une augmentation sérique des anticorps xénogéniques. Chez le primate, ces anticorps, IgG et IgM, reconnaissent l'épitope Gal mais également d'autres épitopes porcins (Dehoux, de la Parra et al. 2002). La déplétion de ces anticorps, notamment les IgM, permet de prévenir l'AVR chez le rongeur (Sato, Takigami et al. 1999) et chez le primate (Lin, Weidner et al. 1998), ce qui suggère un rôle dominant des IgM dans l'AVR. Ces anticorps se fixent sur l'endothélium et peuvent induire son activation sans intervention du complément (Vanhove B 1994; Palmetshofer, Galili et al. 1998). Il est difficile de déterminer si ces IgM préexistent à la greffe ou si ce sont des anticorps induits. En effet, le fait qu'ils apparaissent après la greffe dans des modèles concordants suggérerait qu'ils sont induits. Cependant, le fait que ces anticorps soient d'isotype IgM et qu'ils soient présents rapidement après

la greffe (3-4 jours dans le modèle hamster/rat) suggère qu'ils pourraient provenir de l'expansion d'un pool d'ANX présent avant la greffe mais en quantité trop faible pour déclencher un rejet hyperaigu. De plus, il a été montré chez le rat que ces IgM sont T-indépendantes car elles peuvent apparaître chez des rats athymiques greffés avec un cœur de hamster ce qui corrobore l'hypothèse du pool préexistant de lymphocytes B xénoréactifs (Lin, Vandeputte et al. 1998b). Dans ce cas, il pourrait s'agir des mêmes cellules B-1B impliquées dans l'HAR. Il a également été montré que les cellules B qui produisent les IgM xénoréactives chez le rat portent le marqueur CD5, marqueur des cellules B-1 (Lin, Vandeputte et al. 1998b). Dans les modèles concordants, comme la combinaison hamster/rat, les anticorps induits sont dirigés contre d'autres cibles que le Gal. Il s'agit notamment de l'antigène de Forssman, un glycosphingolipide présent sur les cellules endothéliales de hamster mais pas chez le rat (Brouard, Bouhours et al. 2000). Cependant, les anticorps dirigés contre cet antigène ne sont pas capables de provoquer le rejet (Wu, Fujii et al. 1999; Brouard, Bouhours et al. 2000). De la même façon, la déplétion des sérums en anticorps anti-Forssman ne protège pas du rejet (Wu, Fujii et al. 1999; Brouard, Bouhours et al. 2000).

Il a généralement été suggéré que le complément ne jouait pas de rôle dans l'AVR. Néanmoins, plusieurs études récentes tendent au contraire à lui attribuer un rôle dans le développement de ce rejet. En effet, il a été trouvé, dans un modèle porc hDAF⁺/primate, une activation significative du complément suite à la fixation d'anticorps xénogéniques induits (Loss, Vangerow et al. 2000). Des études menées au laboratoire ont également montré des dépôts de C5b-9 lors du rejet d'organes porcins transgéniques pour le DAF humain (Ashton-Chess, Roussel et al. 2003a; Ashton-Chess, Roussel et al. 2003b).

D'autre part, l'AVR peut être efficacement contrôlé par une inhibition systémique du complément via un inhibiteur de C1 dans un modèle porc hDAF⁺/primate (Vangerow, Hecker et al. 2001). Néanmoins, l'AVR peut également survenir en l'absence de complément. Ainsi, dans un modèle cochon d'Inde/rat on observe un rejet vasculaire aigu malgré un traitement par CVF (Leventhal, Matas et al. 1993). Le même phénomène est observé dans un modèle de primate (Leventhal, Dalmaso et al. 1993). Dans les deux cas, on observe un dépôt d'anticorps sans activation du complément ce qui suggère que les anticorps seuls sont capables de provoquer le rejet.

II-2.2-Rôle des cellules NK

Chez le rongeur, il a été montré que les cellules NK et les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat lors du rejet (Blakely, Van der Werf et al. 1994; Candinas, Belliveau et al.

1996). D'autre part, les cellules NK peuvent lyser les cellules endothéliales *in vitro* en présence d'IgG xénoréactives via leur recrutement par leurs récepteurs FcγRIII (Schaapherder, Daha et al. 1994). Cette lyse fait intervenir le mécanisme d'ADCC (Antibody-Dependent-Cell-mediated-Cytotoxicity) (Itescu, Kwiatkowski et al. 1998) médié par le système perforine/granzyme. Cependant, l'absence de l'épitope Gal (Baumann, Forte et al. 2004) ou la neutralisation des ANX (Xia, Ji et al. 2000) ne permet pas de supprimer complètement la cytotoxicité des cellules NK. En effet, les cellules NK peuvent également activer les cellules endothéliales par contact direct (Goodman, Von Albertini et al. 1996) car l'incompatibilité moléculaire entre les molécules de CMH de classe I porcines et les récepteurs inhibiteurs KIR humains (NK Inhibitory Receptor) ne permet pas de réguler l'activation NK. Ainsi, l'expression par les cellules endothéliales porcines de molécules du CMH de classe I (HLA-C ou HLA-G) permet de protéger ces cellules (Seebach, Comrack et al. 1997; Forte p 2004).

II-2. 3-L'endothélium

La fixation des anticorps xénogéniques sur l'endothélium provoque une activation de type II de l'endothélium (pour revue (Bach, Winkler et al. 1996)) qui a deux effets principaux. Le premier consiste en la synthèse et l'expression de molécules pro-inflammatoires et le second en l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant (**figure 17**).

L'apparition du phénotype pro-inflammatoire se traduit par la sécrétion d'Il-1 α par les cellules endothéliales qui va, à son tour, induire la synthèse et la sécrétion de cytokines telles que RANTES, Il-8 et MCP (Selvan, Kapadia et al. 1998) qui vont recruter et activer les monocytes, les macrophages et les cellules T (Schall, Bacon et al. 1990; Loetscher, Seitz et al. 1994). Les neutrophiles sont également recrutés via la sécrétion du PAF (Platelet Activating Factor) et de chémokines se fixant sur le récepteur CXCR2 (CXC-Chemokine Receptor) (Gilli, Schneider et al. 2005).

Les cellules endothéliales activées expriment également des molécules d'adhésion telles que la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 qui vont également permettre le recrutement et l'infiltration du greffon par les leucocytes activés. Ces leucocytes, macrophages et cellules NK, vont contribuer à générer un environnement pro-inflammatoire via la sécrétion de TNF α , d'Il-1 β (macrophages) et d'IFN γ (cellules NK) (Candinas, Belliveau et al. 1996).

Le deuxième effet de l'activation des cellules endothéliales consiste en l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant, via des mécanismes identiques à ceux du rejet hyperaigu, notamment la perte de la thrombomoduline et de l'héparane sulfate et la synthèse de Tissue Factor qui initie la

coagulation en se liant au facteur VIIa (Robson, Young et al. 1996). Les cellules endothéliales synthétisent également du PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et diminuent leur synthèse de Plasminogen Activator ce qui conduit à une diminution de la fibrinolyse. De plus, l'activation de la cascade de coagulation n'est pas régulée efficacement à cause d'incompatibilité moléculaire notamment entre l'inhibiteur du Tissue Factor, le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) exprimé par les cellules porcines et sa cible, le facteur Xa humain (Kopp, Siegel et al. 1997). Dans certains cas, on observe également une coagulopathie qui peut aboutir à une complication systémique, la coagulation intravasculaire disséminée (DIC). Ce phénomène est observé notamment lors de greffes rénales chez le primate (Ierino, Kozlowski et al. 1998; Cowan, Aminian et al. 2000; Buhler, Yamada et al. 2001) mais également avec d'autres organes comme le poumon (Gaca, Leshner et al. 2002). La coagulopathie cesse avec l'excision de l'organe greffé (Ierino, Kozlowski et al. 1998).

En résumé, le rejet vasculaire aigu présente une forte composante humorale, notamment IgM, associée à une inflammation et à une coagulation massive. Les caractéristiques histopathologiques de ce rejet sont une rupture de la barrière endothéliale, de la thrombose et un infiltrat cellulaire. Cependant, on observe des variations dans ce schéma type, notamment dans l'infiltrat cellulaire, en fonction de la combinaison de greffe et des traitements utilisés pour prévenir l'HAR (**tableau 5** d'après (Dorling 2003)).

Tableau 5 : Histologie de l'AVR dans différents modèles où seul le complément a été ciblé pour prévenir l'HAR.

Modèle	Inhibition du complément	Dépôts de fibrine	Infiltrat cellulaire	
Porc /babouin	hDAF	Oui	Oui	(Waterworth, Dunning et al. 1998)
Porc/babouin	hDAF/CD59	Oui	Faible à nul	(Lin, Weidner et al. 1998)
Cochon d'Inde/rat	CVF	Oui	Oui, macrophages et NK	(Leventhal, Matas et al. 1993)

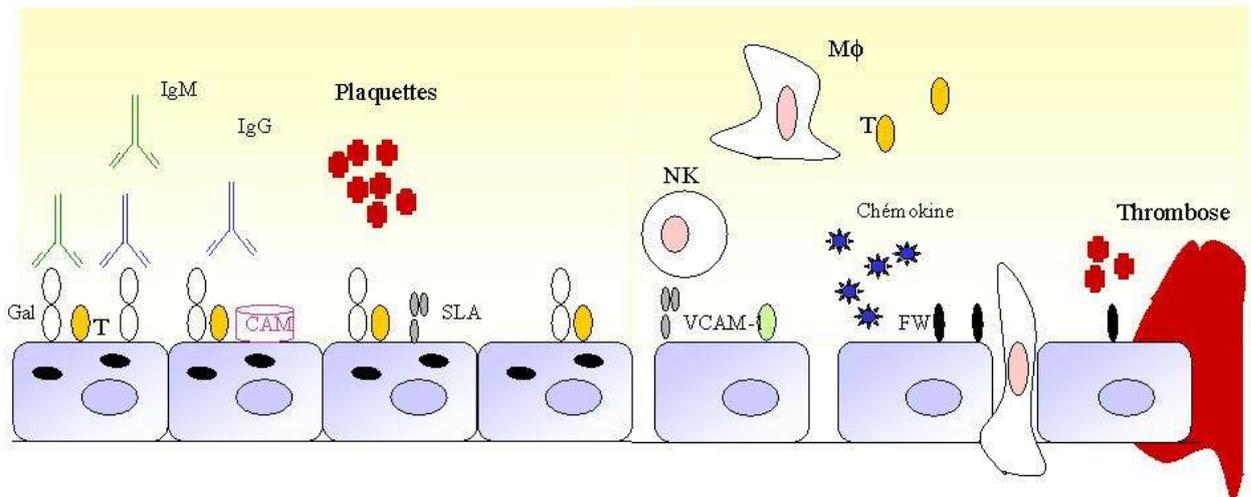


Figure 17: Schéma récapitulatif simplifié de l'AVR. T : thrombomoduline ; CAM : Complexe d'Attaque Membranaire ; SLA : Swine Leucocyte Antigen ; Mφ : macrophages ; FW : Facteur von Willebrand.

II-3-Stratégies visant à prévenir le rejet humoral

De nombreuses stratégies ciblant les différents effecteurs de l'HAR et de l'AVR ont été étudiées. Elles ciblent aussi bien le donneur que le receveur et sont résumées dans le **tableau 6**.

Tableau 6: Récapitulatif des différentes stratégies utilisées pour prévenir le rejet humoral.

Donneur	Cible	Stratégie
	Complément	CD46, CD55, CD59
	Coagulation	CD39, TFPI
	Epitope Gal	Knock Out
	Immunosuppression locale	CTLA4-Ig
Receveur	Cible	Stratégie
	Anticorps xénoréactifs	Immunoabsorption Oligosaccharides Gal Splénectomie
	Coagulation	Héparine, antithrombine III
	Complément	SCR1, CVF
	Immunosuppression	Classique (CsA, CyP, FK506..) Nouveaux immunosuppresseurs (anticorps monoclonaux ...)
	Accommodation	
	Tolérance	Chimérisme hématopoïétique Greffe de thymus

II-3-1 : les anticorps xénoréactifs

La première stratégie permettant de neutraliser les ANX consiste en une déplétion, spécifique ou non, des anticorps du receveur. Ceci peut être obtenu par perfusion du sang du receveur dans un organe intermédiaire avant la transplantation (Lexer, Cooper et al. 1987; Cooper, Human et al. 1988; Brewer, Del Rio et al. 1993). Mais, outre le fait que cette technique est compliquée à mettre en œuvre, ses effets secondaires (diminution du volume sanguin et des facteurs de coagulation) ont fait que ce modèle a été abandonné. La plasmaphérèse permet elle aussi de déléter les anticorps et d'obtenir une prolongation de survie dans des modèles de primates (Fischel, Matas et al. 1992). La déplétion spécifique des ANX se fait par passage du plasma sur des colonnes d'affinité (immunoabsorption). Ces colonnes peuvent être soit non spécifiques et éliminer l'ensemble des anticorps du receveurs (Leventhal, John et al. 1995) (protéine A ou protéine G du staphylocoque), soit spécifiques. Elles sont alors composées

d'oligosaccharides synthétiques α Gal (Neethling, Koren et al. 1994a; Taniguchi, Neethling et al. 1996; Kozlowski, Ierino et al. 1998). Dans tous les cas, elles permettent de prolonger de plusieurs jours la survie de cœurs porcins dans des modèles de primate. Pour un effet durable, la déplétion doit être répétée avant et après la transplantation afin de prévenir le retour des anticorps (Leventhal, John et al. 1995; Lin, Hanaway et al. 2000) ce qui provoque de nombreuses complications associées à une certaine mortalité (Lin, Hanaway et al. 2000).

La neutralisation *in vivo* des ANX par injection intraveineuse d'oligosaccharides Gal (Neethling, Koren et al. 1994b; Ye, Neethling et al. 1994) ou de peptides inhibiteurs (Kooyman, McClellan et al. 1996) et *in vitro* par des anticorps anti-idiotype (Koren, Milotic et al. 1996) a également été testée. L'infusion de di ou de trisaccharides permet de prévenir le rejet (Simon, Neethling et al. 1998; Romano, Neethling et al. 1999). Cependant, la demi-vie de ces molécules est courte (50 minutes) et cette technique nécessite donc une perfusion continue pour être efficace. Le couplage d'oligosaccharides Gal à du polyéthylène glycol permet d'augmenter la demi-vie du conjugué chez le rat et d'obtenir un effet anticomplémentaire *in vitro* en plus de neutraliser les ANX (Nagasaka, Kobayashi et al. 1997). De même, l'utilisation d'oligosaccharides Gal couplés à de l'albumine sérique bovine (Teranishi, Gollackner et al. 2002) ou d'un conjugué trisaccharide Gal-lysine permet de réduire de plus de 90% le taux d'anticorps anti Gal et la cytotoxicité de sérums de primate vis à vis du porc (Katopodis, Warner et al. 2002) et de diminuer la sévérité du rejet d'organes transgéniques porcins sans toutefois permettre une prolongation de survie (Zhong, Luo et al. 2003).

Enfin, l'injection d'Ig humaines concentrées (IVIG) chez le babouin permet de prévenir le rejet hyperaigu d'un cœur porcine (Magee, Collins et al. 1995). *In vitro*, la co-incubation de sérums humains avec des IVIG réduit les dépôts de complément et la perte des héparanes sulfates (Magee, Collins et al. 1995). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'effet protecteur des IVIG. Ainsi, il a été suggéré que ces anticorps contiennent des anticorps anti-idiotype ou que les IVIG accélèrent le catabolisme physiologique des XNA (Yu and Lennon 1999). Il faut noter que dans une étude sur le modèle hamster/rat, l'utilisation des IVIG n'a pas permis d'éviter l'AVR malgré une légère prolongation de survie.

Une deuxième stratégie permettant de neutraliser les ANX consiste à cibler les lymphocytes B. De nombreuses études ciblant les lymphocytes B ont été menées, incluant l'irradiation, la splénectomie et l'immunoabsorption associées ou non à une immunosuppression.

L'irradiation du receveur détruit toutes les cellules en division, notamment les cellules de l'hématopoïèse. L'irradiation non létale du receveur diminue temporairement le nombre de lymphocytes B mais n'affecte pas les plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Cette diminution n'est

donc accompagnée que d'une légère et temporaire réduction de la quantité d'anticorps, notamment les anticorps anti-Gal (Kozlowski, Shimizu et al. 1999). C'est pourquoi l'irradiation est plutôt utilisée pour faciliter la prise de greffe de moelle osseuse lors de protocoles d'induction de tolérance qui seront discutés dans un chapitre ultérieur.

La déplétion des anticorps xénoréactifs peut également être obtenue par splénectomie du receveur. Cozzi et coll. ont ainsi montré que cette technique permet de réduire le taux d'anticorps anti-porcins dans un modèle de greffe rénale porcine (Cozzi, Bhatti et al. 2000).

La déplétion des anticorps xénoréactifs peut également être obtenue par splénectomie du receveur. Cozzi et collègues ont ainsi montré que cette technique permet de réduire le taux d'anticorps anti-porcins dans un modèle de greffe rénale porcine (Cozzi, Bhatti et al. 2000). La déplétion des anticorps anti-Gal par immunoabsorption spécifique permet également de contrôler efficacement le taux de ces anticorps et de prévenir l'AVR dans les premières semaines suivant la greffe (Lin, Hanaway et al. 2000). Néanmoins, cette technique nécessite d'être répétée au cours du temps afin de contrôler le retour des anticorps, ce qui provoque de nombreuses complications associées à une certaine mortalité (Lin, Hanaway et al. 2000).

La neutralisation *in vivo* des anticorps xénoréactifs est également possible. La technique d'infusion d'oligosaccharides, précédemment décrite pour prévenir l'HAR, permet également de prévenir l'AVR. On peut noter, par exemple, l'utilisation d'oligosaccharides Gal couplés à de l'albumine sérique bovine (Teranishi, Gollackner et al. 2002) ou d'un conjugué trisaccharide Gal-lysine qui permet de réduire de plus de 90% le taux d'anticorps anti Gal. Ceci permet de diminuer la cytotoxicité de sérums de primates vis à vis du porc (Katopodis, Warner et al. 2002) et ainsi de réduire la sévérité du rejet d'organes transgéniques porcins sans toutefois permettre une prolongation de survie (Zhong, Luo et al. 2003).

II-3 -2: le complément

Une autre possibilité afin de prévenir le rejet humoral est de cibler le complément, soit par déplétion, soit en inhibant son activité via les protéines de régulation solubles ou membranaires. La déplétion des fragments C5 (Kroshus, Rollins et al. 1995) et C6 (Brauer, Baldwin et al. 1996) permet de retarder le rejet de plusieurs heures dans des modèles de rongeur (Brauer, Baldwin et al. 1996) et de primate (Kroshus, Rollins et al. 1995). Une inhibition efficace du complément peut également être obtenue grâce au facteur de venin de cobra (CVF). Le CVF est un analogue structurel et fonctionnel du C3b (pour revue (Vogel, Fritzinger et al. 2004)). Il s'associe au facteur B pour former le complexe CVF,Bb. Tout comme son analogue, le complexe C3b,Bb ; le CVF,Bb

possède une activité convertase qui génère le facteur C5b. Le CVF induit ainsi une activation systémique du complément et donc une consommation des facteurs complémentaires sériques. De plus, le complexe CVF,Bb possède une longue demi-vie (7h vs 1min30 pour le C3b,Bb) et il est résistant aux inhibiteurs naturels du C3b,Bb, les facteurs H et I. Toutes ces caractéristiques associées permettent d'obtenir grâce au CVF une déplétion efficace du complément. L'utilisation de CVF permet ainsi de prolonger significativement la survie d'une greffe cardiaque chez le rat (69 heures avec CVF vs 15 minutes sans traitement) (Candinas, Lesnikoski et al. 1996). Le CVF permet également d'obtenir une prolongation de survie dans un modèle de primate (Leventhal, Dalmaso et al. 1993; Hecker, Lorenz et al. 2002; Chen, Sun et al. 2004). Cependant, ce traitement génère des anaphylatoxines C3a et C5a, ainsi que du C3b et C4b qui activent les macrophages et les neutrophiles, ce qui résulte en une inflammation systémique qui en limite l'utilisation (Candinas, Lesnikoski et al. 1996). Chez le rat, l'inhibition du complément par le CVF, le sCR1 ou des anticorps tels que l'anti-C6, associée à une inhibition de la réponse cellulaire T, permet d'obtenir une longue survie. Cette survie s'accompagne d'un phénomène appelé accommodation qui sera détaillé dans un chapitre ultérieur.

Une deuxième approche consiste à réguler l'activité du complément via les protéines de régulation, soit par administration de formes solubles, soit en induisant leur expression à la surface de l'endothélium du receveur. Le sCR1 est une forme soluble tronquée du récepteur du complément de type 1 (Weisman, Bartow et al. 1990) qui inhibe les voies classiques et alternes en se fixant au C3b et C4b. Des études chez le rat et le primate ont montré qu'une perfusion de sCR1 permet d'obtenir une survie d'une semaine chez le primate (Pruitt, Bollinger et al. 1997) et de deux jours chez le rat (Candinas, Lesnikoski et al. 1996). L'association du CVF et du SCR1, bien que réduisant les dépôts de C4b, l'activation des macrophages et la production de cytokines dans le greffon, ne permet pas d'obtenir un effet synergique de ces deux traitements quant à la prolongation de survie (Candinas, Lesnikoski et al. 1996).

La troisième possibilité afin de contrôler le rejet humoral est d'obtenir une régulation locale et non plus systémique via l'expression par l'endothélium des PRC du receveur. Cette hypothèse a tout d'abord été testée chez le rongeur où l'expression du DAF ou du CD59 permet de protéger des cellules endothéliales murines incubées avec du sérum humain (Somerville, Kyriazis et al. 1994; van Denderen, Pearse et al. 1996). Le même résultat est obtenu lors de la perfusion *ex vivo* de cœurs de souris avec du sérum humain (Byrne, McCurry et al. 1995; McCurry, Kooyman et al. 1995). Dans les modèles porc/primate, des porcs exprimant CD59, DAF ou des combinaisons de PRC ont été générés suite aux travaux précurseurs de Dalmaso et collègues qui ont montré que le DAF humain inhibe la cytotoxicité des ANX vis à vis des cellules endothéliales

porcines (Dalmasso, Vercellotti et al. 1991). Des expériences de perfusion *ex vivo* d'organes porcins ont montré une prolongation de survie de cœurs et de reins exprimant CD59 ou DAF, associée à une diminution des dépôts de complément (Kroshus, Bolman et al. 1996b; Schmoeckel, Nollert et al. 1996; Storck, Abendroth et al. 1997). Lors de la greffe, ces organes ne sont pas rejetés de façon hyperaigue (Waterworth, Cozzi et al. 1997; Schmoeckel, Bhatti et al. 1998; Zaidi, Schmoeckel et al. 1998). De même, la greffe de cœurs de rats exprimant le DAF humain chez le primate permet d'éviter l'AVR (Charreau, Menoret et al. 1999). La coexpression de deux PRC semble augmenter la survie des greffons (Byrne, McCurry et al. 1997; Charreau, Menoret et al. 1999; Chen, Naficy et al. 1999).

II-3-3 : la coagulation

Plusieurs études ont tenté d'améliorer l'issue de l'AVR en contrôlant la coagulation, soit de façon systémique, soit de façon locale au niveau du greffon. Les traitements systémiques incluent des anticoagulants comme l'antithrombine III qui permet de doubler la survie en prévenant la coagulopathie (Cowan, Aminian et al. 2002), de l'héparine ou de la warfarine (inhibiteur de la synthèse des facteurs II, VII et IX). Cette dernière étude n'a toutefois pas mis en évidence d'effet bénéfique sur la survie de la greffe (Byrne, Schirmer et al. 2005). Des inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes ont également été testés avec succès dans des modèles de pré-greffe chez le babouin. Des études supplémentaires seront néanmoins nécessaires pour conclure sur leur efficacité lors de l'AVR (Alwayn, Appel et al. 2000). Une étude chez le babouin a également permis de mettre en évidence un rôle du CMV (CytoMégaloVirus) dans l'activation endothéliale et l'effet bénéfique sur la coagulopathie de l'utilisation d'organes porcins non infectés dans un protocole de greffe cardiaque (Mueller, Kuwaki et al. 2004).

Chez le rongeur, des études ont ciblé notamment le CD39. Cette enzyme, dont l'activité diminue lors de l'ischémie ou lors de l'activation de l'endothélium par des cytokines, est un inhibiteur de l'activation plaquettaire. La surexpression de CD39 permet de prolonger la survie d'une xéngreffe de cochon d'Inde chez le rat (Imai, Takigami et al. 2000). Des cœurs de souris transgéniques pour le TFPI ou l'hirudine (inhibiteur du facteur IIIa) sont résistants à l'AVR et survivent plus de 100 jours lorsque la réponse cellulaire est inhibée (Chen, Giannopoulos et al. 2004). Des études ont également analysé l'effet d'une inhibition de la prothrombinase fgl-2 (fibrinogen-like protein 2). Cette enzyme, qui joue un rôle dans l'initiation des dépôts de fibrine a été montrée comme étant surexprimée lors de l'AVR dans un modèle porc/babouin (Ghanekar, Mendicino et al. 2004). In vivo, des cœurs issus de souris où le gène fgl-2 a été délété ne subissent

pas de thrombose lors d'une greffe chez le rat (Ghanekar, Mendicino et al. 2004; Mendicino, Liu et al. 2005).

II-3-4 : l'immunosuppression classique pour inhiber la réponse cellulaire et humorale

Les techniques précédemment décrites pour contrôler le rejet humoral, et notamment l'immunoabsorption, ne permettent pas de contrôler le rebond des anticorps observé après une immunoabsorption, ni la réponse cellulaire ou l'inflammation. C'est pourquoi l'intérêt s'est porté sur l'immunosuppression dans le but de contrôler ces différents paramètres.

Chez le primate, de nombreuses études ont été menées, associant des antiprolifératifs (cyclophosphamide (CyP), mycophénolate mofétil (MMF)), des inhibiteurs des lymphocytes T (CsA, tacrolimus) pour prévenir aussi bien la réponse cellulaire que la réponse humorale induite, et des anti-inflammatoires (glucocorticoïdes (GC)).

Les résultats obtenus sont très hétérogènes, la survie des greffons variant de quelques heures à plusieurs mois (**tableau 7**). Cette hétérogénéité s'explique par la diversité des donneurs (transgéniques ou non) et des receveurs (babouins ou macaques) et la variabilité des protocoles d'immunosuppression (dose, combinaison, cinétique d'administration). De plus, les effets secondaires de ces traitements sont importants, notamment des infections parfois létales dues à une trop forte immunosuppression. Les limites de ces traitements semblent donc atteintes, ce qui conduit à rechercher de nouvelles molécules immunosuppressives. Chez le rongeur, un traitement d'induction bloquant les lymphocytes B associé à une inhibition de la réponse cellulaire (généralement via la CsA) permet d'obtenir une longue survie des greffons. Ainsi, le CyP associé à un traitement continu à la CsA permet de prévenir l'AVR. L'arrêt de la CsA coïncide avec le retour des anticorps suivi du rejet (Hasan, van den Bogaerde et al. 1992a; Hasan, van den Bogaerde et al. 1992b). De même, l'association déoxyspergualine/CsA ou léflunomide/CsA permet de prévenir l'AVR dans le modèle concordant hamster/rat (Chong, Ma et al. 1997; Lin, Vandeputte et al. 1998b; Watanabe, Miyatake et al. 2004).

Dans un modèle de rat déficient en lymphocytes T (rat nude), le léflunomide associé à une injection d'antigènes du donneur et à une déplétion transitoire des cellules NK permet d'obtenir une tolérance T-indépendante (Lin, Goebels et al. 1998; Ji, Xia et al. 1999). Enfin, dans un modèle de souris nude, un court traitement avec le léflunomide seul permet d'obtenir une longue survie du greffon (Yan, Verbeken et al. 2005).

Tableau 7 : résumé non exhaustif de la survie d'organes porcins chez des primates soumis à une immunosuppression classique. CS : corticostéroïdes, MTT : méthotrexate

Receveur	Organe	Immunosuppression	Survie maximale	
babouin	coeur	CsA, CyP, MTT, CS	12h	(Ye, Neethling et al. 1994)
babouin	cœur hDAF	CsA, CyP, MMF, CS	12 jours	(Ashton-Chess, Roussel et al. 2003a)
babouin	cœur hDAF/hCD59	CsA, CyP, CS	29 jours	(Lin, Goebels et al. 1998)
babouin	cœur hDAF/hCD59	CsA, azathioprine, CS	3 jours	(Byrne, McCurry et al. 1997)
macaque	cœur hDAF	CsA, CyP, CS	5 jours	(Schmoeckel, Bhatti et al. 1998)
macaque	rein hDAF	CsA, CyP, CS	35 jours	(Zaidi, Schmoeckel et al. 1998)
babouin	rein hDAF	CsA, CyP, MMF, CS	51 jours	(Ashton-Chess, Roussel et al. 2003b)

II-3.5 : De nouveaux immunosuppresseurs pour inhiber la réponse cellulaire et humorale en xénotransplantation

Parmi les nouvelles molécules testées dans le but de prévenir l'AVR, on peut citer notamment un anticorps anti-CD2 (LoCD2b) qui est capable, *in vitro*, d'inhiber une réaction lymphocytaire mixte porc/primate et de réduire la cytotoxicité des cellules NK vis à vis des cellules endothéliales porcines (Dehoux, de la Parra et al. 2001). *In vivo*, cet anticorps induit une forte déplétion des cellules CD2⁺, à savoir les cellules T et NK.

La déplétion de différentes populations lymphocytaires B a également été testée chez le babouin à l'aide d'anticorps couplés ou non à une immunotoxine, la ricine A. Mais, ni la déplétion des populations CD20⁺ (lymphocytes immatures), CD22⁺ (lymphocytes B matures) ou CD38⁺ (plasmocytes) n'a eu d'effet sur le taux des xénoanticorps (Alwayn, Xu et al. 2001). De même, l'anticorps W5 qui déplete les lymphocytes B et la majorité des plasmocytes ne permet pas d'inhiber la production des anticorps anti-Gal (Harper, Gollackner et al. 2004), probablement à cause de la déplétion partielle des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes, d'une part, et le développement d'une réponse dirigée contre le W5, d'autre part.

Une étude incluant un anticorps anti-CD154 associé à une immunosuppression forte a également permis d'obtenir une survie maximale de 139 jours chez le babouin (Kuwaki, Knosalla et al. 2004). L'anticorps anti-CD154 permet de bloquer la voie CD40/CD40L impliquée dans l'activation des lymphocytes T et dans le développement de la réponse humorale induite. Une autre étude incluant l'inhibition de la voie CD40/CD40L n'a pas permis de reproduire la diminution des anticorps anti-Gal et anti non-Gal observée dans l'étude précédente (Wu, Pfeiffer et al. 2005). Le blocage simultané des voies CD28/B7 et CD40/CD40L a toutefois permis de diminuer significativement la réponse vis à vis des épitopes non-Gal. Ceci ne s'accompagne toutefois pas d'une prolongation de survie, probablement à cause des anticorps anti-Gal qui ne sont que partiellement diminués lors de la bithérapie. Ce type de traitement est beaucoup mieux supporté que l'immunosuppression classique (Wu, Pfeiffer et al. 2005) et pourrait être d'un intérêt tout particulier lors de greffes utilisant des porcs Gal-KO comme donneurs. Dans la même optique, des porcs transgéniques exprimant CTLA4-Ig ont été générés au laboratoire dans le but d'obtenir une immunosuppression locale lors de greffes de neurones (Martin, Plat et al. 2005).

D'autres immunosuppresseurs ont été testés comme le sérum anti-thymocytes (RATS) qui s'accompagne d'effets secondaires importants (décès de 6 receveurs sur 7) (Ghanekar, Lajoie et al. 2002) ou, dans notre laboratoire, la mitoxantrone qui, bien qu'induisant une déplétion efficace des lymphocytes B, ne permet pas d'obtenir une prolongation de survie (Ashton-Chess, Meurette et al. 2004).

Afin d'obtenir une efficacité maximale dans la prévention de l'AVR, différentes combinaisons des traitements précédemment décrits ont été testés. Quelques uns des résultats obtenus chez le primate sont résumés dans le **tableau 8**.

Tableau 8: résumé non exhaustif de la survie d'organes porcins chez des primates soumis à une immunosuppression classique combinée à une immunosuppression novatrice. CS : corticostéroïdes.

Donneur/ receveur	Immuno- suppression	Autres traitements	Survie maximale	
Cœur hDAF/ babouin	ATG	AntiCD154, antiCD120, CTLA4-Ig	11 jours	(Wu, Pfeiffer et al. 2005)
Rein hDAF/ babouin	CsA, CS	Oligosaccharide Gal, RATS	50 jours	(Ghanekar, Lajoie et al. 2002)
Cœur hDAF/ babouin	ATG, MMF, CS	Oligosaccharide Gal, irradiation, CVF, héparine, antiCD154	139 jours	(Kuwaki, Knosalla et al. 2004)
Rein hDAF/CD59/ Babouin	CsA, CS, MMF	mitoxantrone	10 jours	(Ashton- Chess, Meurette et al. 2004)

II-3.6 : L'épitope Gal

II-3.6.1 : les compétiteurs de l' α 1-3 galactosyltransférase

L'épitope Gal étant la principale cible des anticorps naturels et induits lors des rejets hyperaigus et vasculaires aigus, il a été suggéré que le masquage ou l'élimination de cet épitope pourrait être une solution de choix pour prévenir ces rejets.

L'une des stratégies utilisée pour diminuer l'immunogénicité des tissus Gal⁺ est de générer des tissus coexprimant une autre glycosyltransférase. Celle-ci entre alors en compétition avec l' α 1-3 galactosyltransférase (GT) pour leur substrat commun, ce qui diminue consécutivement l'expression de l'épitope Gal. Plusieurs essais incluant l' α 1-2 fucosyltransférase (HT) chez la souris (Sharma, Okabe et al. 1996; Costa, Zhao et al. 1999b) et le porc (Sharma, Okabe et al. 1996; Costa, Zhao et al. 1999a), l' α -sialyltransférase (Tanemura, Miyagawa et al. 1998) ou l'acétylglucosaminyltransférase III (GnT III) (Miyagawa, Murakami et al. 2001) chez le porc ont ainsi montré une diminution de l'expression du Gal dans les tissus. Cette réduction dans

l'expression du gal s'accompagne d'une diminution de la fixation des anticorps xénoréactifs, d'une inhibition de la lyse médiée par le complément et, dans le cas de la GnT III, d'une diminution de la lyse médiée par les cellules NK (Miyagawa, Murakami et al. 2001). De façon intéressante, chez la souris, l'expression combinée de HT et du CD59 humain se montre aussi efficace que l'inactivation du gène (knock out, KO) de la GT qui abolit complètement l'expression du Gal (Costa, Zhao et al. 1999b). De plus, on n'observe pas d'effet synergique entre la co-expression du hCD59, de l'HT et le KO de la GT, ce qui suggérerait que l'expression de la HT dans des porcs transgéniques pour les protéines humaines de régulation du complément pourrait suffire à contrôler la composante humorale de l'AVR. Lors d'un essai de greffe chez le macaque, l'un des cœurs transgénique pour la GnT III a subi un AVR alors que le second a survécu plus de 4 heures sans aucun traitement immunosuppresseur (Miyagawa, Murakami et al. 2001). Les analyses ont confirmé les résultats obtenus *in vitro*, à savoir une diminution des dépôts de complément sur l'endothélium vasculaire.

Une autre stratégie visant à diminuer l'expression de l'épitope Gal a été la création d'un anticorps recombinant dirigé contre l' α 1-3 galactosyl transférase. La transfection de cellules endothéliales porcines, suivie de l'expression intracellulaire de cet anticorps, a permis de diminuer l'activité enzymatique de plus de 70%, réduisant ainsi de plus de 90% la cytotoxicité d'ANX purifiés et de 50% la cytotoxicité de sérums humains (Vanhove, Charreau et al. 1998).

II-3.6.2 : Les animaux KO pour l' α 1-3 galactosyltransférase

La disparition totale de l'épitope Gal à la surface des cellules peut également être obtenue par inactivation du gène de la GT afin d'obtenir des animaux GT-KO (knock out). Chez la souris, il a été montré que les cœurs issus d'animaux GT-KO ont une survie augmentée lors de la greffe, comparé au phénotype sauvage. De plus, un effet synergique est observé chez les animaux exprimant en plus des molécules de régulation du complément comme le DAF humain (van Denderen, Salvaris et al. 1997; Cowan, Chen et al. 1998).

Chez le porc, la technique d'inactivation génique a été plus compliquée à mettre en place et les premiers animaux hétérozygotes GT-KO ont été obtenus en 2002 (Dai, Vaught et al. 2002; Lai, Kolber-Simonds et al. 2002). L'année suivante, les porcs homozygotes GT-KO ont vu le jour (Phelps, Koike et al. 2003; Kolber-Simonds, Lai et al. 2004). Ces animaux ont été obtenus par recombinaison homologe suivie d'un transfert de noyau soit dans une souche de porc normal (Dai, Vaught et al. 2002), soit dans une souche de porc miniature (Lai, Kolber-Simonds et al. 2002). Les études *in vitro* ont confirmé une absence d'expression de l'épitope Gal à la surface des

cellules (Kolber-Simonds, Lai et al. 2004). Récemment, l'obtention de porcs hétérozygotes pour l'inactivation de la GT et coexprimant de surcroît le DAF humain et la GnT III a été rapportée (Takahagi, Fujimura et al. 2005).

Des expériences de perfusion *ex vivo* ont montré une diminution de l'activation du complément et des plaquettes associée à une prolongation de survie (Schroeder, Allan et al. 2005). *In vivo*, les premiers essais de greffes cardiaques hétérotopiques chez le babouin ont permis d'obtenir, en association avec un traitement immunosuppresseur, une survie maximale de 179 jours chez un des receveurs et une survie moyenne de 78 jours (Kuwaki, Tseng et al. 2005). Cependant, dans tous les cas, des signes de microangiopathie thrombotique associés à des lésions d'ischémie ont été observés. L'administration d'aspirine permet d'en retarder le développement (Dor, Kuwaki et al. 2005) mais les causes exactes (immunologiques ou non) de cette microangiopathie restent à déterminer.

Il semble donc que l'inactivation du gène de la GT, associée à un traitement immunosuppresseur compatible avec la clinique humaine, puisse prévenir aussi bien l'HAR que l'AVR, ce qui permet à la recherche en xénotransplantation de franchir un obstacle important.

II-3.6.3 : L'accommodation

Dans certains cas, lorsque les anticorps xénoréactifs et/ou le complément sont déplétés chez le receveur d'une xéno greffe, l'AVR n'a pas lieu et la greffe continue de fonctionner malgré le retour des anticorps ou du complément. Ce phénomène s'appelle l'accommodation et il a tout d'abord été décrit chez des receveurs d'allogreffes incompatibles pour les groupes sanguins ABO (Alexandre, Squifflet et al. 1987; Chopek, Simmons et al. 1987). Lorsque les receveurs d'une allogreffe ABO-incompatible subissent une déplétion ou une inhibition transitoire des anticorps anti-A ou anti-B, la greffe n'est pas rejetée de façon hyperaigüe. Ce phénomène a également été observé dans des modèles d'allogreffe chez le primate où l'administration de trisaccharides A ou B pendant quelques jours permet de prévenir le rejet hyperaigu même après l'arrêt du traitement (Cooper, Ye et al. 1993). L'idée que l'accommodation pourrait également être induite en xénotransplantation a été suggérée par Platt et collègues (Platt, Vercellotti et al. 1990a).

Cependant, dans les modèles porc/primate, aucun phénomène d'accommodation vis à vis de l'épitope Gal n'a été décrit, le retour des anticorps xénoréactifs s'accompagnant toujours de l'AVR. Cette différence entre la réponse allogénique et la réponse xénogénique vis à vis des carbohydrates a été étudiée par le groupe de Gallili. En utilisant un modèle de souris Gal-KO, ils ont montré que cette différence est due à l'implication ou non des lymphocytes T. En effet, la

coexpression de xénopeptides et de l'épitope Gal est nécessaire à la production d'IgG. Les lymphocytes T sont activés par les xénopeptides et, à leur tour, activent les lymphocytes B et induisent la commutation de classe des IgM en IgG (Tanemura, Yin et al. 2000). Dans le modèle murin, la faible immunogénicité des peptides ne permet pas la production d'IgG, ce qui expliquerait que l'accommodation soit possible dans ce modèle. L'obtention récente des porcs gal KO devrait permettre de déterminer si l'accommodation est possible dans la combinaison porc/primate.

Chez le rongeur, l'accommodation a été décrite dans le modèle hamster/rat où 75% des rats recevant un court traitement au CVF, associé à une inhibition de la réponse cellulaire T via la CsA, présentent une longue survie de leur greffon (Bach, Ferran et al. 1997). Bien que moins efficace, le sulfate de dextran qui inhibe également le complément, permet d'obtenir l'accommodation du greffon (Laumonier, Mohacsi et al. 2004).

Le même résultat peut être obtenu par l'utilisation de réactifs qui ciblent les lymphocytes B plutôt que le complément. C'est notamment le cas des anticorps monoclonaux anti-IgM (Sato, Takigami et al. 1999), du léflunomide (Yan, Verbeken et al. 2005) ou d'un analogue de la déoxyspergualine, le LF 15-095 (LF) (Wang, Hosiawa et al. 2003). Le LF, développé par les laboratoires Fournier, est un analogue de la déoxyspergualine qui possède les mêmes effets (inhibition de la production d'anticorps) tout en étant moins toxique pour le receveur et plus résistant au métabolisme oxydatif *in vivo*. Associé à une administration continue de CsA, le LF nous a permis d'obtenir une survie de 60% des greffons dans notre modèle hamster/rat (**article 3**)

L'accommodation se caractérise par (i) un infiltrat leucocytaire modéré à dense, identique chez les rejets et les animaux accommodés, composé essentiellement de macrophages et de lymphocytes T CD4⁺, (ii) d'une déviation Th2 de la réponse immune, caractérisée par une absence du marqueur CD45RC sur les lymphocytes infiltrant le greffon, une production d'IgG2c, une synthèse d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 et l'absence d'IFN γ et de TNF α . Enfin, on note l'expression par les cellules endothéliales du greffon de molécules anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (A20, HO-1, Bcl-2, Bcl-x_L) (Bach, Ferran et al. 1997).

Cette modification, à la fois de l'hôte et du greffon, permet à ce dernier, non seulement de survivre au retour des anticorps et du complément, mais également de résister à une injection d'anticorps provenant d'animaux ayant rejeté leur xéno greffe (Bach, Ferran et al. 1997; Lin, Vandeputte et al. 1998a). Elle permet également au greffon de survivre, dans 30% des cas, à une retransplantation dans un animal naïf ne recevant que de la CsA (Miyatake, Koyamada et al. 1998). De même, une seconde greffe chez un animal accommodé provoque le rejet de celle-ci sans

affecter la survie du greffon accommodé, malgré des dépôts identiques d'IgM et de complément (Lin, Soares et al. 1999b). Tous ces résultats sont résumés dans la **figure 18**.

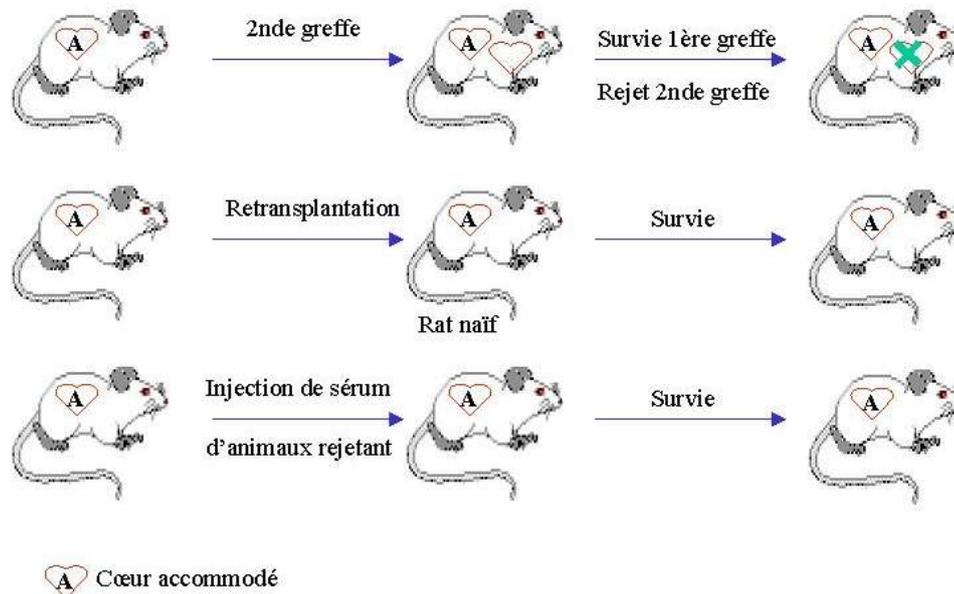


Figure 18 : Récapitulatif des expériences permettant de vérifier l'accommodation d'un greffon.

La modification du greffon consiste en l'expression de gènes anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. Parmi les gènes anti-apoptotiques, on trouve les gènes A20, Bcl-2 et Bcl-x_L qui font partie des gènes induits par NF-κB lors de l'activation des cellules endothéliales. En plus de son activité anti-apoptotique, A20 inhibe NF-κB, bloquant ainsi l'induction de gènes pro-inflammatoires (Cooper, Stroka et al. 1996). L'accommodation est également liée à l'expression de gènes anti-inflammatoires tels que l'Hème Oxygénase-1 (HO-1) dont l'expression précoce est indispensable à la survie des xéno greffes (Koyamada, Miyatake et al. 1998). Ainsi, des cœurs de souris KO pour HO-1, greffés chez des rats traités par du CVF et de la CsA, sont rejetés en 3 jours par un mécanisme d'AVR (Soares, Lin et al. 1998).

En plus de la modification du greffon lors de l'accommodation, certaines études ont montré une modification de la réponse immune du receveur vers un phénotype Th2 (Bach, Ferran et al. 1997). Cette déviation ne semble pas systématique (Brouard, Blancho et al. 1998) ni indispensable à l'accommodation car la greffe d'un cœur accommodé chez un animal naïf ne provoque pas de rejet (Miyatake, Koyamada et al. 1998). Il est possible qu'elle soit induite par les cellules endothéliales accommodées comme le suggèrent certaines études *in vitro* (Dorling, Jordan

et al. 2001). La production de cytokines de type Th2 comme l'IL-13 induit l'expression de A20, renforçant ainsi l'effet protecteur (Dorling, Jordan et al. 2001).

Plusieurs études ont cherché à comprendre la cinétique d'expression des gènes impliqués dans l'accommodation, ainsi que leurs interactions (**figure 19**). Il a été notamment montré que l'exposition de cellules endothéliales à de faibles doses d'anticorps induit l'expression précoce de la NO synthase et la production de NO. A son tour, celui-ci induit l'expression de Bcl-2 et Bcl-x_L (Delikouras, Hayes et al. 2001) et la déviation Th2 des lymphocytes T (Dorling, Jordan et al. 2001). D'autre part, l'interaction cellule endothéliale/anticorps induit également l'expression d'HO-1 et la synthèse de monoxyde de carbone qui inhibe l'activation des plaquettes, prévenant ainsi la thrombose (Sato, Balla et al. 2001).

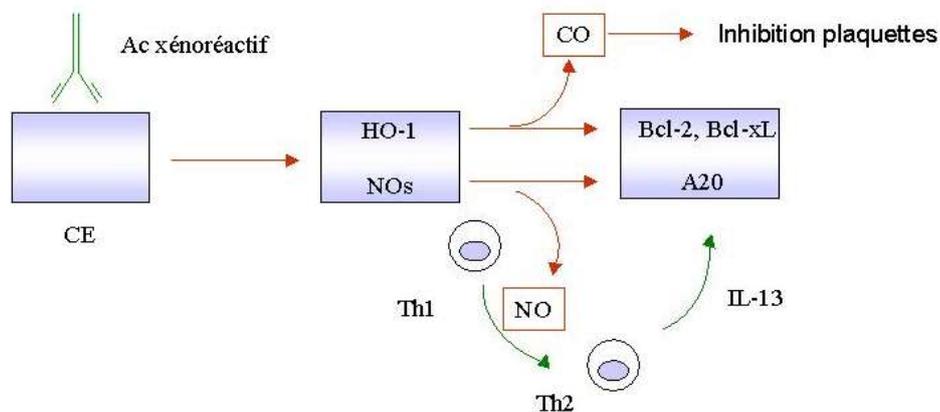


Figure 19 : Schéma récapitulatif de la cinétique des gènes impliqués dans l'accommodation.
CE : Cellule Endothéliale ; Ac : Anticorps.

II-4 : Le rejet cellulaire

La possibilité d'induire l'accommodation dans des modèles de rongeur a permis de surmonter l'obstacle de l'AVR et d'étudier les mécanismes du rejet cellulaire de xéno greffe. Le rôle des cellules de l'immunité innée (macrophages et cellules NK) a déjà été analysé dans le chapitre de l'AVR. C'est pourquoi nous nous focaliserons dans ce chapitre sur le rôle des lymphocytes T.

II-4.1: Compatibilité moléculaire

Au contraire de l'HAR et de l'AVR où il existe des incompatibilités moléculaires entre le porc et le primate au niveau des protéines de régulation du complément et de la coagulation, les molécules qui permettent l'activation des lymphocytes T (CMH et molécules de costimulation) sont suffisamment compatibles pour permettre au rejet cellulaire d'avoir lieu (Bedke, Baars et al. 2003; Bonenfant, Vallee et al. 2003).

Chez le primate, l'absence d'accommodation n'a pas permis d'études approfondies sur le rejet cellulaire d'organes vascularisés *in vivo*. Néanmoins, des études *in vitro* ont montré que les molécules du SLA porcin sont capables d'activer la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ humains par la voie directe de présentation des antigènes (Bedke, Baars et al. 2003; Bonenfant, Vallee et al. 2003). L'ajout d'anticorps anti-SLA permet par ailleurs d'inhiber cette prolifération (Bonenfant, Vallee et al. 2003). Les molécules de costimulation sont elles aussi capables de stimuler les lymphocytes T, de façon aussi efficace que dans une réponse allogénique (Bedke, Baars et al. 2003; Rogers, Jackson et al. 2003). Là encore, l'ajout d'anticorps inhibiteurs de la costimulation permet d'inhiber la réponse proliférative (Popma, Krasinskas et al. 2001). Ainsi, dans les principaux modèles permettant d'étudier le rejet cellulaire (porc/primate, rat/souris, hamster/rat), il n'existe pas d'incompatibilité majeure empêchant l'activation T. Cependant, dans d'autres combinaisons d'espèces, des incompatibilités moléculaires peuvent exister, diminuant de ce fait l'intensité de la réponse. Ainsi, l'incompatibilité entre les molécules de classe I et II murines et entre les CD8 et CD4 humains induisent une inhibition de la réponse xénogénique comparée à la réponse allogénique (Barzaga-Gilbert, Grass et al. 1992; Moses, Winn et al. 1992).

II-4.2 Voie de présentation directe ou indirecte ?

In vitro, plusieurs études ont montré l'existence d'une réponse directe, aussi bien dans les combinaisons porc/homme (Dorling, Lombardi et al. 1996; Popma, Szeto et al. 2001; Popma, Krasinskas et al. 2001) que chez les rongeurs (combinaison rat/souris) (Singh, Guo et al. 2004). Cependant, les études *in vivo* ont montré que la réponse cellulaire T est essentiellement de type indirect. Ainsi, dans la combinaison rat/souris, le traitement par des anticorps dirigés contre les molécules de costimulation du donneur ne prolonge pas la survie d'une greffe cardiaque. A l'inverse, le blocage de la voie indirecte par des anticorps ciblant la costimulation du receveur permet d'augmenter la survie des greffons (Kano, Bashuda et al. 1998). De même, l'inhibition de la voie indirecte par des anticorps anti-CMH de classe II du receveur prolonge la survie d'un

greffon cardiaque. Il faut noter qu'il semble exister des différences quant à l'importance relative des deux voies de présentation entre le rejet d'organes vascularisés comme le cœur et le rejet de cellules comme les îlots pancréatiques (Kano, Bashuda et al. 1998). De même, les populations effectrices sont différentes. Ainsi, dans le cas des greffes vascularisées, ce sont les lymphocytes T CD4⁺ qui sont responsables du rejet (Chong, Ma et al. 2000; Sebille, Guillet et al. 2001) et cette réponse est plus forte qu'une réponse allogénique, comme l'atteste une étude de Kellersmann et collègues qui ont comparé la réponse proliférative *in vivo* des T CD4⁺ après une allogreffe ou une xéngreffe (Kellersmann, Kellersmann et al. 2003). Cette observation est renforcée par la cinétique du rejet, qui est plus rapide lors d'une xéngreffe accommodée que lors d'une allogreffe chez le rat (respectivement, 4±1 vs 18±4 jours) (Brouard, Vanhove et al. 1999), indiquant également une réponse plus vigoureuse envers le greffon xénogénique. Cependant, des études menées sur des rats nude ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ sont également capables d'induire un rejet avec cependant une cinétique plus lente que les lymphocytes T CD4⁺ (Lin, Soares et al. 1999a).

Cette différence d'intensité entre les réponses allogéniques et xénogéniques peut être due à une différence de fréquence des clones répondeurs. En effet, une étude au laboratoire a montré une réponse polyclonale lors d'une xéngreffe, alors que celle-ci est oligoclonale lors de l'allogreffe (Brouard, Vanhove et al. 1999), suggérant l'existence d'un plus grand nombre d'antigènes ou d'une réactivité croisée plus importante envers les MHC xénogéniques.

II-4.3: Rôle de la costimulation

Les premières études sur le rôle de la costimulation dans l'activation lymphocytaire T en xénotransplantation avaient pour but de contrôler la réponse induite des anticorps anti-Gal. Il a ainsi été montré que le blocage de la voie CD28/B7, via le CTLA-4Ig, associé au blocage de la voie CD40/CD40L grâce à des anticorps anti-CD40L permet de prévenir l'apparition des anticorps induits aussi bien chez le primate (Wu, Pfeiffer et al. 2005) que chez la souris (Yin, Ma et al. 2002). L'utilisation du CTLA4-Ig seul, quant à lui, ne permet pas de bloquer la production des ANX (Watanabe, Miyatake et al. 2004).

In vitro, des résultats contradictoires sont obtenus chez le primate. En effet, il a été montré que si le CTLA-4Ig est efficace pour bloquer la prolifération lymphocytaire, l'action de l'anti-CD40L n'est pas aussi tranchée avec parfois un effet significatif seul ou en association avec le CTLA-4Ig (Tadaki, Craighead et al. 2000), et parfois une absence d'effets visibles (Lee, Yamada et al. 2000).

Enfin, une étude récente a montré qu'il était possible d'obtenir une longue survie d'un greffon cardiaque de hamster chez le rat en associant sur le long terme l'inhibition des voies CD28/B7 et CD40/CD40L grâce à la thérapie génique (Hua, Yamashita et al. 2004).

III : La survie à long terme : induction de tolérance.

Comme en allotransplantation, la tolérance se définit comme l'acceptation à long terme d'un greffon en l'absence d'immunosuppression et en maintenant l'immunocompétence du receveur. Par rapport à l'allogreffe, la xénotransplantation présente l'avantage d'une disponibilité des greffons, permettant notamment d'effectuer un conditionnement du receveur et/ou du donneur préalablement à la greffe, ceci afin d'obtenir non seulement une tolérance cellulaire mais également humorale. Trois modèles d'induction de tolérance sont actuellement décrits : le chimérisme moléculaire, le chimérisme hématopoïétique et la greffe thymique.

III-1 : Le chimérisme moléculaire

En utilisant la technique du transfert de gène, Bracy et collègues ont montré que l'injection de cellules hématopoïétiques transduites avec le gène de la GT chez des souris GT-KO permet d'instaurer un chimérisme moléculaire et de supprimer la production d'anticorps anti-Gal (Bracy, Sachs et al. 1998). Cette tolérance n'est pas rompue par l'administration de cellules porcines Gal⁺ et s'accompagne de la délétion des cellules B productrices d'anticorps anti-Gal (Bracy and Iacomini 2000). Ce traitement permet de retarder le rejet d'une greffe cardiaque de souris Gal⁺ (Bracy, Chase et al. 2001). Cependant, il ne permet d'induire la tolérance qu'envers un seul antigène et pour obtenir une tolérance complète envers le donneur, il serait préférable d'induire un chimérisme hématopoïétique par greffe de moelle osseuse ou de fragments thymiques.

III-2 : Le chimérisme hématopoïétique

L'induction d'un chimérisme hématopoïétique nécessite un régime de conditionnement du receveur avant la greffe. Celui-ci cible deux compartiments, les lymphocytes xénoréactifs préexistants afin de prévenir le rejet des cellules greffées et la moelle osseuse afin de créer de « l'espace » pour faciliter l'implantation des cellules. Ainsi, chez la souris, un chimérisme hématopoïétique peut être obtenu suite à la déplétion des cellules T (T $\alpha\beta$ et T $\gamma\delta$) et NK, associée à une irradiation totale non létale, à une irradiation spécifique du thymus et à l'injection des cellules

de la moelle osseuse déplétées en lymphocytes T (Sharabi, Aksentijevich et al. 1990). Dans ce modèle, on obtient non seulement une tolérance T (Nikolic, Lei et al. 1998) mais également une diminution des anticorps xénoréactifs, suggérant une tolérance humorale (Aksentijevich, Sachs et al. 1992). En utilisant des souris GT-KO comme receveuses de cellules hématopoïétiques Gal⁺, il a également été montré qu'il était possible d'obtenir une tolérance B vis à vis de cet épitope (Ohdan, Yang et al. 1999), ce qui permet de prévenir à la fois l'HAR, l'AVR et le rejet cellulaire lors d'une greffe cardiaque ultérieure (Ohdan, Yang et al. 2001).

Chez le primate, des incompatibilités moléculaires entre le porc et le primate nécessitent l'administration de facteurs de croissance porcin, en plus du traitement classique, pour permettre la prise de greffe des cellules hématopoïétiques (Sablinski, Emery et al. 1999). Dans ces conditions, la greffe d'une forte dose de cellules hématopoïétiques porcines, associée au blocage de la voie CD40/CD40L, permet également d'obtenir une tolérance B (Buhler, Awwad et al. 2000). Cette tolérance nécessite la conservation de la voie indirecte de présentation des antigènes et s'accompagne d'un macro- et d'un microchimérisme transitoire (respectivement, 5 jours et un mois environ) (Buhler, Alwayn et al. 2001; Buhler, Awwad et al. 2002). L'utilisation de cellules issues de porcs GT-KO n'a pas permis de prolonger le chimérisme au delà de 5 jours. Malgré cela, une tolérance T a été observée *in vitro* pendant plus de 3 mois (Tseng, Dor et al. 2004). En évitant le développement d'une réponse anti-Gal, les porcs GT-KO permettent d'obtenir plus facilement une tolérance T. La prolongation et l'augmentation du chimérisme hématopoïétique nécessite désormais de résoudre 2 problèmes : (i) la création d'un microenvironnement stromal plus favorable à la prise de greffe et (ii) l'élimination des précurseurs hématopoïétiques par les macrophages du receveur dont la cible est un épitope non-Gal qui reste à déterminer (Rouhani, Dor et al. 2004).

III-3 : La greffe thymique

Chez la souris, la greffe de fragments thymiques porcins associée à la thymectomie du receveur permet d'obtenir une tolérance T et l'acceptation d'une greffe de peau du même haplotype que le thymus (Lee, Gritsch et al. 1994; Zhao, Rodriguez-Barbosa et al. 2000). De même, dans le modèle hamster/rat, la greffe thymique permet d'induire une tolérance à une xéngreffe cardiaque (Xia, Goebels et al. 2001). Cependant, l'adaptation de ce modèle chez le primate n'a pas eu les mêmes effets avec une survie limitée du greffon thymique (Wu, Esnaola et al. 1999). Ce type d'approche a toutefois permis de confirmer que, comme chez la souris, le

thymus xénogénique est capable d'induire une tolérance T vis à vis des xénoantigènes. Cette technique a ensuite été améliorée par la création d'un environnement vascularisé permettant une meilleure prise de greffe. Des fragments sont placés sous la capsule rénale préalablement à la greffe afin de permettre la revascularisation du thymus et c'est donc un organe composite qui est greffé (Yamada, Shimizu et al. 1999). La greffe de ce « thymus-rein » porcin chez des babouins préalablement traités par thymectomie, immunoadsorption et immunosuppression, a permis d'obtenir une survie maximale de 30 jours du greffon. Cependant, l'un des animaux a montré une non réponse T vis à vis du donneur pendant plus de 2 mois après l'arrêt de l'immunosuppression (Barth, Yamamoto et al. 2003). Les greffons rejetés montraient une histologie de rejet humoral sans infiltrat cellulaire, indiquant que le contrôle de la réponse humorale pourrait permettre une survie à long terme. Récemment, une technique de greffe de lobes thymiques vascularisés (LTV) a été mise au point ce qui permettrait d'induire une tolérance vis à vis d'organes autres que le rein (Kamano, Vagefi et al. 2004).

Une étude récente par le groupe de David Sachs a montré que la greffe de « thymus-rein » ou de rein et LTV permet d'obtenir une longue survie, jusqu'à 80 jours (Yamada, Yazawa et al. 2005). Les greffons étaient fonctionnels jusqu'au décès des animaux pour des raisons non immunologiques.

IV : Le risque infectieux

Un obstacle autre que le rejet devra être surmonté avant toute application clinique de la xénotransplantation. Il s'agit du risque de transmission de pathogènes porcins à l'homme. Le passage du virus du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), issu du singe, à l'homme a montré que ce risque existait et qu'il ne devait pas être sous-estimé.

Le porc est notamment le réservoir d'une famille de rétrovirus, les PERV (Porcine Endogenous RetroVirus) qui sont intégrés dans son génome, ce qui rend leur élimination très difficile. *In vitro*, il a été montré que les PERV peuvent infecter des cellules humaines. Cependant, aucune modification, que ce soit dans la morphologie ou dans la prolifération des cellules, n'a été observée après 6 mois de culture (Yu, Zhang et al. 2005). Il a également été montré que les particules virales issues de porcs transgéniques pour CD55 et CD59 mais pas CD46 sont moins sensibles à l'élimination par le sérum humain (Hazama, Miyagawa et al. 2005). Cette résistance risque de s'accroître avec l'utilisation des porcs GT-KO. En effet, les virions issus de porcs sauvages expriment le Gal, ce qui en fait une cible pour les ANX et le complément humain.

Les résultats obtenus *in vivo* sont cependant contradictoires avec les études *in vitro*. Ainsi, la greffe de cellules humaines et porcines sur une souris nude n'aboutit pas à l'infection des cellules humaines (Yang, Wood et al. 2004; Zhang, Yu et al. 2005). De même, la neutralisation des anticorps anti-Gal n'a pas d'effet sur l'infectiosité des PERV dans un modèle de greffe porc hDAF et porc hDAF-hMCP/babouin (Moscoso, Hermida-Prieto et al. 2005). De la même façon, la double greffe porc et homme sur primate n'a pas permis de détecter d'infection des cellules humaines (Winkler, Winkler et al. 2005). Enfin, aucune trace de contamination n'a été détectée chez des patients ayant été en contact avec des tissus porcins (Paradis, Langford et al. 1999; Elliott, Escobar et al. 2000; Irgang, Sauer et al. 2003).

En ce qui concerne la transmission d'autres agents infectieux tels que le CMV porc (CytoMégaloVirus), des conditions EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique) peuvent empêcher la contamination des porcs destinés au don d'organe (Mueller, Kuwaki et al. 2004).

En conclusion, l'obtention récente des porcs GT-KO a permis à la recherche en xénotransplantation d'effectuer un grand pas en avant. Les problèmes liés à l'HAR et à l'AVR semblent en passe d'être résolus. Cependant, de nombreuses questions demeurent, notamment la réactivité des cellules endothéliales conduisant à la coagulopathie ainsi que les mécanismes du rejet cellulaire. En effet, la longue survie obtenue par le groupe de David Sachs (Yamada, Yazawa et al. 2005) s'accompagne d'une immunosuppression forte et la compréhension des mécanismes du rejet cellulaire devrait permettre, comme en allotransplantation, d'adapter les traitements immunosuppresseurs en vue d'une application clinique, voire d'induire une tolérance.

La deuxième partie de ce travail de thèse a eu pour but d'étudier le rôle de la costimulation dans le rejet cellulaire, et plus particulièrement le rôle de la voie CD28/B7 dans le modèle hamster/rat (**article 3**).

.

Résultats

[Xenotransplantation](#). 2007 Jan;14(1):25-33.

Induction of regulatory cells and control of cellular but not vascular rejection by costimulation blockade in hamster-to-rat heart xenotransplantation.

[Séveno C](#), [Coulon F](#), [Haspot F](#), [Mérieau E](#), [Renaudin K](#), [Martinet B](#), [Vanhove B](#).

INSERM U643, Nantes, ITERT, Nantes, Univ Nantes, UFR of Medicine, Nantes, France.

Induction of regulatory cells and control of cellular but not vascular rejection by costimulation blockade in hamster-to-rat heart xenotransplantation

Céline Séveno, Flora Coulon, Fabienne Haspot, Emmanuel Mérieau, Bernard Martinet and
Bernard Vanhove[§]

INSERM, U643, Nantes, France ; ITERT, Nantes, France ; Univ Nantes, UFR of Medicine, Nantes, France.

Running head: Costimulation blockade in xenotransplantation

[§]Correspondence to Dr. Bernard Vanhove, ITERT, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Tel.: 33 (0) 240 08 74 17, Fax: 33 (0) 240 08 74 11, E-mail address: Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

This work was supported in part by the “Progreffe” foundation. C.S. has a fellowship from the “Société Française de Transplantation”.

Abstract word count: 321

Text word count: 3681

Abstract

Background. The hamster -to-rat xenotransplantation combination is a concordant model that mimics the Gal KO pig-to-primate situation. In these combinations, complement activation by evoked xenoreactive antibodies and modifications of EC physiology are the primary cause of rejection in immunosuppressed recipients. In experimental situations where this step is overcome by the induction of accommodation through transient blockade of complement and/or antibodies together with continuous treatment with Cyclosporin A (CSA), withdrawal of CSA results in a rapid and dense polyclonal CD4⁺ T-cell infiltration resulting in rejection. Here, we characterize the implication of T cell costimulation in this rejection process.

Methods. Hamster hearts were transplanted into LEW.1A rats receiving an accommodation-inducing treatment consisting of administration of LF15-0195 and CSA. At day 40 post-transplantation, recipients displaying accommodation were taken off CSA treatment and subsequently given anti-CD28 or anti-ICOS antibodies, or CTLA4Ig. To achieve long term delivery of the CTLA4Ig molecule, an adenovirus vector coding for CTLA4Ig (Ad-CTLA4Ig) was administered intravenously prior to CSA withdrawal. Graft survival, immunohistology, and the development of antibodies and regulatory cells were examined.

Results. Antibody-mediated blockade of CD80/86-CD28 and ICOS-ICOSL pathways, as well as administration of CTLA4Ig, reduced xenograft infiltration and significantly delayed rejection from 6 days to a maximum of 14 days after CSA withdrawal. Xenograft survival was further prolonged in Ad-CTLA4Ig-treated recipients, and this was accompanied by the appearance of regulatory cells exhibiting non donor-specific suppressive activity. These regulatory cells were found in the non-T cell compartment of the spleen and their activity was dependant on IL-2, NO, and IDO. These mechanisms, however, were unable to circumvent an evoked anti-donor IgM response that ultimately led to a complement-dependant vascular rejection.

Conclusion. Costimulation blockade blunts the initial acute rejection in accommodated recipients of hamster heart xenografts after CSA withdrawal and has the potential of inducing cellular regulatory mechanisms. However, such treatment does not prevent the development of xenoreactive IgM antibodies that participate in vascular rejection processes in a complement-dependant manner.

Introduction

Long-term administration of conventional immunosuppressors can result in nephrotoxicity, increase the risk of infection and the development of cancers, and does not protect against chronic allograft vasculopathy. Therefore, non-toxic selective immunosuppressive strategies, including tolerance induction, are currently under evaluation in allotransplantation. Whether these strategies might work in xenotransplantation, however, remains unknown. In this study, we evaluated whether costimulation blockade, that can induce transplant tolerance in rodents and can be used for non-toxic immunosuppression in humans [1], can also control xenoreactive T cell reactivity. In the hamster-to-rat combination, long-term survival of cardiac xenografts can be obtained after an initial 5-day treatment combining CSA and LF-15-0195, a deoxyspergualin analogue, followed by daily administration of CSA alone [2]. In this model a cellular rejection initiated solely by CD4⁺ T cells is observed within 6 days if CsA is withdrawn. Unlike the T cell-mediated rejection of rat heart allografts following a similar treatment, T-cell mediated xenograft rejection is polyclonal and is thought to occur predominantly through the direct presentation pathway [3].

For effector T lymphocytes to respond optimally following the engagement of their T cell receptor (TCR), costimulation is required. The CD28/CTLA-4/B7 co-stimulatory pathway was first targeted with CTLA4Ig, a fusion molecule consisting of the extracellular domain of CTLA-4 and the Fc domain of Ig. This molecule inhibits the interaction of B7 (CD80 and CD86) with CTLA-4 and CD28, thereby inhibiting the costimulatory activity of CD28. CTLA4Ig also directly stimulates B7 on DCs and in doing so, induces in these cells a tolerogenic phenotype [4]. In transplantation, CTLA4Ig blocks alloreactivity and might additionally induce non-classical regulatory cells in the non-T cell compartment [5]. Non-agonist or modulating anti-CD28 antibodies have also been used to inhibit the CD28/CTLA-4/B7 pathway. However, their mechanism of action might be different to that of CTLA4Ig since they do not block CTLA-4/B7 interactions and therefore allow the transmission of regulatory signals to T cells through CTLA-4 [6]. Targeting CD28 results in allograft survival prolongation [7] and tolerance [8, 9]. Other costimulatory molecules such ICOS are also involved in T cell activation. Inducible co-stimulator (ICOS) is induced within 48h of T cell stimulation in humans and rodents. Although ICOS is not essential for T cell activation, it is essential for cytokine production by CD4⁺ T cells and for the effector action of CD8⁺ T cells. In the rat, ICOS blockade results in prolongation of liver allograft survival [10] and synergizes with CTLA4Ig to induce heart allograft tolerance [11].

In this study, we aimed to determine whether costimulation blockade might also control T cell xenoreactivity in the CD4⁺ T cell-mediated rejection process occurring in accommodated recipients of hamster heart xenografts, following withdrawal of CSA [2]. We used antibodies to block the CD28 and ICOS pathways and tested the action of CTLA4Ig. In addition, we used a recombinant adenovirus for long-term delivery of CTLA4Ig. Our observations indicate a responsiveness of xenoreactive CD4⁺ T cells to CD28/B7 as well as to ICOS blockade. We further demonstrate that regulatory cells can develop in xenotransplantation and control T cell responses but are unable to control the anti-donor IgM responses that ultimately lead to vascular rejection.

Materials and methods

Animals and surgical procedures

Inbred 5–7-wk-old male rats of the LEW.1A (RTT^a) strain and inbred adult Syrian hamsters (100–150 g) were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were maintained in our animal facility under standard conditions according to institutional guidelines. Heterotopic cardiac transplantations were performed aseptically as described [12, 13]. Isoflurane was used as the anesthetic in all procedures. Graft survival was monitored by daily abdominal palpation and rejection was indicated by cessation of graft beating and confirmed by direct visualization and histological examination.

Antibodies and the recombinant adenovirus

The anti-ICOS Mab (JTT2) was provided by Dr. K. Tezuka [14] and the modulating anti-CD28 Mab (JJ319 hybridoma) was obtained from Dr. T. Hunig [7]. The IgG1 mouse Mab (clone 3G8), used as an irrelevant control antibody, was prepared in our laboratory. Purified CTLA4Ig of human origin was obtained from R. Peach (Bristol Meyers Squibb, Stanford, CT). The adenoviral vector coding for the extracellular portion of mouse CTLA-4 fused to the coding sequences of the constant domains of the human immunoglobulin γ 1 gene under the control of a human cytomegalovirus promoter as previously described [5] was obtained from the Vector Core of the University Hospital of Nantes (France).

Accommodation

Accommodation was induced in all recipients using the deoxyspergualin analog LF 15-0195 (Fournier Pharma, Chenôve, France) and cyclosporin A (Néoral). LF 15-0195 was given intramuscularly (3 mg/kg) from day 0 to day 4. CsA was given *per os* (10 mg/kg) from day 0 to day 39.

Costimulation blockade

Recipient animals were divided into 3 groups. The first group was used to study the effect of short-term costimulation blockade. After CSA withdrawal 40 days after transplantation, recipients received intraperitoneal injections of either anti-ICOS Mab (JTT2) (8mg/kg at day 40, 42, 44 and 46), or the modulating anti-CD28 Mab (JJ319) (3 mg/kg at day 40, 42, 44 and 46) or CTLA4Ig (1.5mg/kg at day 40 and 47). The second group received Ad-CTLA4Ig

intravenously (3.75×10^{10} pi) at day 5 post-transplantation. The third group also received Ad-CTLA4Ig and received additional intraperitoneal injections of CVF (Quidel, San Diego, CA, USA) (4 units at day 45 and 2 units every 2 days from day 47 to 70).

Immunohistology

Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5 μ m sections and fixed in acetone. Sections were then labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique. Briefly, monoclonal antibodies raised against leucocytes (Ox1+Ox30), $\alpha\beta$ TCR (R7-3), CD25⁺ cells (Ox39), and monocyte/macrophages CD68 (ED1), Class II (Ox6), CD8 T cells (Ox8) and NK cells (3.2.3) were used as primary antibodies. These antibodies were prepared in our laboratory from the corresponding hybridoma (LGC Promochem, Molsheim, France). Biotin-conjugated horse anti-mouse IgG (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) was used as a secondary antibody. Tissue sections were then incubated with horseradish peroxidase streptavidin (Vector), developed with 'intense purple' kit (VIP kit, Vector) and counterstained with hematoxylin (Sigma, St Louis, MO, USA). Absence of non-specific staining was checked by replacing the primary mAb with dilution buffer. Xenoantibody deposition was assessed using fluorescein-conjugated mouse anti-rat IgM or IgG (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA). Complement deposition was assessed by detecting the C3c fragment (Dako, Trappes, France) with a fluorescein-conjugated donkey anti-rabbit secondary antibody (Jackson). Tissue sections were then mounted using anti-fading mounting medium (Dako).

Quantitative analysis of cellular infiltration

The area of each immunoperoxidase-labeled tissue section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis. Positively stained cells on each slide were counted by morphometric analysis using point counting analysis [15] with a 121-intersection squared grid in the eyepiece of the microscope. Briefly, the percentage of the area of each graft section occupied by cells of a particular antigenic specificity (area infiltrate) was calculated as follows: [number of positive cells under grid intersection/total number of grid intersections] x 100. The graft sections were examined at a magnification of x400. The accuracy of the technique is proportional to the number of points counted. Thus, to maintain a SE of <10%, 15 fields were counted for each labeled section. Results are expressed as the percentage of the area of the tissue section infiltrated by leukocytes (\pm SD).

Flow-cytometry

Xenoantibody levels in the blood of recipients was analyzed by flow cytometry, by testing serum reactivity against hamster ConA-stimulated spleen cells, as previously described [16]. Briefly, sera were heat-inactivated at 56°C for 30 min and stored at -80°C until use. Hamster splenocytes were initially incubated with rat sera, followed by a fluorescein-conjugated mouse anti-rat IgM or IgG antibodies (Jackson) or with mouse anti-rat IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c monoclonal antibodies (Technopharm, Paris, France) revealed using fluorescein-conjugated F(ab)' donkey anti-mouse antibodies (Jackson). Cells were then fixed in 1% buffered formalin and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Sera harvested from animals 17 days following immunization by a subcutaneous injection (in the footpad) of 50 µg of a hamster spleen cell lysate in complete Freund adjuvant was used as a positive control.

Proliferative responses to xenoantigens.

Spleens were pressed through a stainless steel mesh, and red blood cells were removed by hypotonic lysis. For T cells purification, non T cells were depleted by warm nylon wool adherence followed by depletion of Ox6 (MHC II) and 3.2.3 (CD161) positive cells with magnetic beads (Dyna, Compiègne, France). Spleen dendritic cells, used as APC, were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz gradient as previously reported [17]. Cells were resuspended in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, and 5×10^{-5} M 2-ME (Sigma). Total splenocytes or purified T cells (10^5 cells/well) were cultured in triplicate in round-bottom 96-well plates (Nunc, Naperville, IL, USA) together with irradiated (35 Gy) hamster spleen cells (10^5 cells/well) or Con A (12.5 µg/ml) in the presence or absence of inhibitors of IDO (1-methyltryptophan, Sigma), iNOS (LNMMMA, Sigma), DNMMMA (Sigma) or IL-2. Proliferation was evaluated 3 days later by adding 1 µCi [3 H]thymidine deoxyribose per well for the final 8 h of culture and measuring thymidine incorporation using a scintillation counter.

Statistical analyses

Statistical significance of graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log rank test.

Results

Targeting B7, CD28 or ICOS delays CD4⁺ T cell-mediated xenograft rejection .

In accommodated rat recipients of hamster xenografts, CSA withdrawal 40 days after transplantation results in a CD4⁺ T cell-mediated rejection within 6 days [2] (Table I). After CSA withdrawal, we found blood CSA to rapidly decrease from an average of 582 ng/ml to undetectable levels (<10ng/ml) within 4 to 5 days (data not shown). Replacement of CSA with CTLA4Ig or anti-CD28 antibodies delayed xenograft rejection by 4 days. Anti-ICOS antibodies, which have been shown to prolong allograft survival in rodents [10, 11], also significantly prolonged xenograft survival (Table I). Since anti-ICOS mAb combined with CD28 blockade resulted in allograft tolerance in rats [11], we also tested this combination and found that, under these conditions, survival was prolonged by 8 days (Table I).

Targeting B7 or ICOS, but not CD28, reduces mononuclear cell infiltration.

Graft infiltration was analyzed six days after CsA withdrawal from rat recipients of accommodated xenografts. Infiltrating cells consisted mainly of macrophages expressing class II molecules, and of an equivalent amount of T cells. These T cells did not present an activated phenotype since only a weak staining was obtained with anti-CD25 antibodies. NK cells also significantly infiltrated the xenografts (Figure 1). In CTLA4Ig and in anti-ICOS antibody-treated recipients, graft infiltration on day 6 by T cells was absent, and no staining for IL2R α was observed. Infiltration by macrophages and class II-positive cells was also reduced in this context (Figure 1). In contrast, despite significantly prolonging survival (Table I), treatment with anti-CD28 antibodies, did not decrease infiltration by mononuclear cells, macrophages, CD25⁺ or CD4⁺ cells, as compared with controls (Figure 1).

Ad-CTLA4Ig delays but does not inhibit xenograft rejection.

In order to analyze whether rejection in recipients treated by injections of costimulation inhibitors was the consequence of a limited efficacy of the injected proteins (either due to a limited half-life or to an elicited neutralizing antibody response) or of alternative cellular mechanisms bypassing costimulation blockade, such as costimulation-independent T cells, NK cells or macrophages, we treated recipients with a recombinant adenovirus coding for CTLA4Ig. This treatment results in a prolonged and sustained delivery of CTLA4Ig [5]. One injection of Ad-CTLA4Ig resulted in the synthesis of 5 to 60 μ g/ml of CTLA4Ig in the blood of rat recipients for at least 2 months (data not shown). This level was shown to completely

inhibit CD28/B7 costimulation in rats [5]. Ad-CTLA4Ig treatment delayed xenograft rejection until day 59, i.e. 19 days after CSA withdrawal (Figure 2). At this time, analysis of graft infiltration revealed many macrophages and class II-positive cells (>30% of the surface area) whereas T cell infiltration (2.5% of the surface) was similar to the infiltration seen in controls rejecting their xenografts in the absence of Ad-CTLA4Ig. Staining for CD25⁺ cells, however, was negative. In contrast, NK cells were markedly more abundant than in controls, reaching 2.6% of the surface area (Figure 3).

Xenoreactive IgM and complement activation induces rejection in Ad-CTLA4Ig-treated recipients.

In accommodated rat recipients of hamster heart xenografts, the CD4⁺ T cell-mediated rejection arising after CSA withdrawal occurs without significant up-regulation of xenoreactive antibodies [2]. In Ad-CTLA4Ig-treated xenograft recipients, however, the serum level of anti-hamster IgM, but not IgG, was high at rejection (Figure 4A). IgM and complement C3c deposition was visible on blood vessel walls at this time (Figure 4B).

Regulatory cells in Ad-CTLA4Ig -treated recipients.

To analyze possible regulatory mechanisms developing within weeks after CSA withdrawal in CTLA4Ig-treated xenograft recipients, we prolonged xenograft survival by inhibiting complement deposition by administering CVF. This strategy prolonged graft survival to at least day 70 in 80% of the recipients (Figure 2) and therefore allowed the analysis of the proliferative responses of spleen cells 30 days after CSA withdrawal. Proliferative responses to donor hamster spleen cells and to alloreactive RT-1^U dendritic cells were evaluated. Spleen cells were found to be hyporesponsive to allogeneic and xenogeneic antigen-presenting cells (Figure 5A and B) but were fully reactive to a polyclonal stimulation with ConA (data not shown). T cells purified from the spleen were similarly hyporesponsive (Figure 5C). Neither the adjunction of IL-2, 1-Methyl Tryptophan (1-MT, an inhibitor of IDO) nor L-NG-monomethyl-arginine (L-NMMA, an inhibitor of NO) could restore proliferation of spleen cells. However, the simultaneous adjunction of these agents resulted in the proliferation of alloreactive and xenoreactive responder spleen cells at a level similar to the response of naive cells (Figure 5). This suggested that alloreactive T cells had not been deleted but were anergic and controlled by NO and IDO-dependant mechanisms. In order to assess the presence of regulatory cells, increasing numbers of spleen cells from naive or Ad-CTLA4Ig-treated

xenograft recipients were added to xenoreactive and to alloreactive MLR assays. Spleen cells from Ad-CTLA4Ig-treated xenograft recipients, but not from naive animals, dose-dependently inhibited the proliferation in these assays. A complete inhibition of the proliferation was seen at an effector:target ratio of 1:4 (Figure 6). It has been previously shown that administration of Ad-CTLA4Ig in allotransplantation in the rat results in the development of regulatory Ox62⁺ dendritic cells present in the spleen and infiltrating the graft [5]. Similarly, we tested whether Ox62⁺ dendritic cells from Ad-CTLA4Ig-treated xenograft recipients could account for this suppressive activity and found that purified Ox62⁺ cells did not inhibit but rather promoted proliferation against xenoreactive stimulatory cells. This activity was similar with Ox62⁺ cells from naive rats and from Ad-CTLA4Ig-treated xenograft recipients (Figure 5C).

Discussion

In this study, we report that the CD4⁺ T cell response involved in the rejection of an accommodated hamster heart in the rat after withdrawal of CSA can be controlled by the inhibition of the CD28 and ICOS-mediated costimulatory signals, and by the action of CTLA4Ig. Prolonged and sustained delivery of CTLA4Ig resulted in the appearance of regulatory cells in the spleen that were unable, however, to control an anti-donor antibody response of the IgM isotype.

More than a decade ago, costimulation blockade using CTLA4Ig was shown to have the potential of inducing long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts in rodents [18]. This, however, turned out to be more difficult for vascularized xenografts, that could only be accepted after induction of accommodation, defined by an upregulation of protective endothelial cell genes within the graft [19], together with daily administration of calcineurin inhibitors. Accommodation has been induced with CVF [20], DSG or DSG-derivatives [2, 21], or by pre-transplant donor blood transfusions [22]. Attempts to replace calcineurin inhibitors by co-stimulation blockade alone using Ad-CTLA4Ig, AdCD40Ig, or both, could not overcome xenograft rejection in the hamster to rat model [23]. However, xenograft rejection in this model is initiated early after transplantation both by xenoreactive T cells and by anti-donor T-dependent and T-independent antibodies, making it difficult to address the role of costimulation inhibitors on the T cell compartment *in vivo*. We have previously reported that withdrawal of CSA from accommodated recipients results in a rejection 6 days later that is solely dependant upon the activation of xenoreactive CD4⁺ T cells, without the confusing parameter of anti-donor antibodies [2]. Using this system, we observe here that this xenoreactive CD4⁺ T cell-dependent rejection *in vivo* can be equally inhibited by administration of antibodies directed to either CD28, ICOS or both (and also CD40L, data not shown), or by targeting CD80/86 with the CTLA4Ig fusion protein. Anti-ICOS antibodies and CTLA4Ig prevented graft infiltration by T lymphocytes, suggesting that these treatments prevented T cell activation by xenoantigens and intragraft recruitment. In contrast, xenografts from recipients treated with anti-CD28 antibodies, although not rejected, were infiltrated by T cells expressing CD25. This suggested that anti-CD28 antibodies prevented effector functions of T cells without preventing their migration into the graft. It is also possible that anti-CD28 antibodies induced the differentiation of CD25⁺ Treg cells, since infiltration by Treg has been associated with allograft survival after costimulation blockade in mice [24]. In conclusion, early (CD28/B7) and late (ICOS/ICOS-L) costimulatory interactions are

implicated in the reactivity of xenoreactive CD4⁺ T cells *in vitro* after CSA withdrawal. Since primed T cells are known to be only partially inhibited by CD28 blockade, whereas naive cells are sensitive [25], our findings suggest that xenoreactive T cells still behave like naive cells 40 days after transplantation. Our former observation that the T cell repertoire of CD4⁺ xenoreactive T cells was of the naive type in this model 40 days after transplantation [3] also suggests that under CSA, no priming or clonal selection occurs.

CTLA4Ig limits T cell responses not only by inhibiting CD28-mediated costimulation signals but also by stimulating B7-positive cells that in turn upregulate IDO and thereby become immunosuppressive [4]. IDO-producing cells responding to B7 engagement have been identified as dendritic cells [26], T cells [27], or other non-T cells [9]. It has previously been demonstrated in heart allotransplantation in the rat that administration of Ad-CTLA4Ig results in the development of Ox62⁺ dendritic cells with regulatory activity *in vitro* [28], without evidence for a role of Treg. In organ xenotransplantation, no regulatory cells have been described so far. We observed here that spleen cells from Ad-CTLA4Ig-treated hamster heart xenograft recipients were hyporesponsive to donor APC. Clonal deletion was not involved in this hyporesponsiveness since it could be abrogated by addition of IL-2 together with NO and IDO inhibitors, suggesting that xenoreactive T cells were anergic and, in addition, controlled by NO and IDO-dependant mechanisms, a feature associated with regulatory APC. In addition, purified T cells extracted from the spleen proliferated in response to xenogeneic APC, although only after enrichment with autologous Ox62⁺ dendritic cells. One possible explanation for these observations is that xenoreactive T cells recognizing xenoantigens through the direct activation pathway are anergic whereas indirect xenoreactive T cells (recognizing xenoantigens through the indirect activation pathway) are controlled by regulatory cells. Furthermore, in co-culture experiments, spleen cells from Ad-CTLA4Ig-treated xenograft recipients dose-dependently inhibited the proliferation of naive T cells stimulated by xenogeneic as well as allogeneic APC, showing that the suppression was not donor-specific. This suppressive activity could not be attributed to Ox62⁺ dendritic cells, as previously suggested in a rat heart allograft model [28], since their addition stimulated, rather than inhibited, the proliferation of xenoreactive T cells in MLR. Thus, our data indicate that IDO-dependant regulatory non-T cells develop in xenograft recipients in response to Ad-CTLA4Ig. Their exact nature still needs to be determined. After CSA withdrawal, CTLA4Ig appears unable to maintain low levels of IgM xenoantibodies whereas xenoantibodies of the IgG isotype, presumably of the T-dependant type, are completely inhibited. This is in

accordance with similar observations in a hamster to rat delayed xenografts rejection model early after transplantation [29].

In conclusion, costimulation blockade of the CD28/CTLA-4/B7 pathway as well as that of ICOS controls T cell rejection of hamster heart xenografts in accommodated rat recipients. Administration of CTLA4Ig results in the development of regulatory cells that control T cell responses but not T-independent IgM responses.

Acknowledgements.

We are grateful to the Vector Core of the University Hospital of Nantes, which is supported by the Association Française contre les Myopathies, for producing the adenoviral vectors used in this study. We thank Dr. K. Tezuka for providing the anti-rat ICOS antibody, Dr. P. Dutartre for providing the LF15-0195, Dr. S. Brouard and Dr. C. Guillonéau for technical advice, and Ms C. Usal and Ms H. Smit for animal care and microsurgery.

Bibliography

1. VINCENTI F. Chronic induction. What's new in the pipeline. *Contrib Nephrol* 2005; 146: 22.
2. SEBILLE F, GUILLET M, BROUARD S, et al. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant* 2001; 1: 21.
3. GUILLET M, GAGNE K, LAIR D, et al. Different patterns of TCR beta chain regulation following allo- and xeno-transplantation. *Xenotransplantation* 2004; 11: 315.
4. GROHMANN U, ORABONA C, FALLARINO F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097.
5. GUILLOT C, MATHIEU P, COATHALEM H, et al. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 2000; 164: 5258.
6. VANHOVE B, LAFLAMME G, COULON F, et al. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 2003; 102: 564.
7. DENGLER TJ, SZABO G, SIDO B, et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 392.
8. DONG C, JUEDES AE, TEMANN UA, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001; 409: 97.
9. HASPOT F, SEVENO C, DUGAST AS, et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2005; 5: 2339.
10. GUO L, FUJINO M, KIMURA H, et al. AdCTLA-4Ig combined with donor splenocytes, bone marrow cells and anti-ICOS antibody treatment induce tolerance in a rat heart transplantation model. *Transpl Int* 2004; 17: 15.
11. GUO L, FUJINO M, KIMURA H, et al. Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation. *Transpl Immunol* 2003; 12: 41.
12. ONO K and LINDSEY ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 57: 225.
13. DEDJA A, DALL'OLMO L, CADROBBI R, et al. Heterotopic cardiac xenotransplantation in rodents: report of a refined technique in a hamster-to-rat model. *Microsurgery* 2005; 25: 227.
14. TEZUKA K, TSUJI T, HIRANO D, et al. Identification and characterization of rat AILM/ICOS, a novel T-cell costimulatory molecule, related to the CD28/CTLA4 family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 335.
15. MCWHINNIE DL, THOMPSON JF, TAYLOR HM, et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352.
16. BROUARD S, BOUHOURS D, SEBILLE F, et al. Induction of anti-Forssman antibodies in the hamster-to-rat xenotransplantation model. *Transplantation* 2000; 69: 1193.
17. VOISINE C, HUBERT FX, TRINITE B, HESLAN M, and JOSIEN R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169: 2284.

18. LENSCHOW DJ, ZENG Y, THISTLETHWAITE JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science* 1992; 257: 789.
19. BACH FH, FERRAN C, CANDINAS D, et al. Accommodation of xenografts: expression of "protective genes" in endothelial and smooth muscle cells. *Transplant Proc* 1997; 29: 56.
20. MIYATAKE T, KOYAMADA N, HANCOCK WW, SOARES MP, and BACH FH. Survival of accommodated cardiac xenografts upon retransplantation into cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 1998; 65: 1563.
21. WATANABE T, MIYATAKE T, KUMAMOTO H, et al. Adenovirus-mediated CTLA4 immunoglobulin G gene therapy in cardiac xenotransplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 2478.
22. VRIENS PW, STOOT JH, VAN DER STEENHOVEN TJ, et al. Pre-transplant blood transfusion and cyclosporin A induce long-term hamster cardiac xenograft survival in immunocompetent rats. *Xenotransplantation* 2005; 12: 63.
23. HUA N, YAMASHITA K, HASHIMOTO T, et al. Gene therapy-mediated CD40L and CD28 co-stimulatory signaling blockade plus transient anti-xenograft antibody suppression induces long-term acceptance of cardiac xenografts. *Transplantation* 2004; 78: 1463.
24. TSAI MK, HO HN, CHIEN HF, et al. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004; 77: 48.
25. SCHWEITZER AN and SHARPE AH. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 1998; 161: 2762.
26. MUNN DH, SHARMA MD, HOU D, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 2004; 114: 280.
27. BOASSO A, HERBEUVAL JP, HARDY AW, WINKLER C, and SHEARER GM. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 2005; 105: 1574.
28. GUILLOT C, MENORET S, GUILLONNEAU C, et al. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003; 101: 3325.
29. HAYASHI S, LEU D, YAMII Y, et al. Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTLA4IG gene in hamster-to-rat xenotransplantation. *Transplantation* 2005; 80: 494.

Table 1 : Mean survival time of heart xenografts after CSA withdrawal. * $p < 0.01$ vs. controls, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

	n	Individual survival after CSA withdrawal (days)	Mean \pm SD (days)
Untreated	10	5,5,6,6,6,6,6,8,10	6,4 \pm 1.5
Control mAb	4	6,6,6,7	6,25 \pm .,5
CTLA4Ig	4	6,9,13,14	10.5 \pm 3.7*
Anti ICOS	4	8,8,14,17	11.7 \pm 4.5**
Anti CD28	5	9,10,11,11,12	10.6 \pm 1.3***
Anti-ICOS +Anti-CD28	4	14,14,14,14	14 \pm 0***

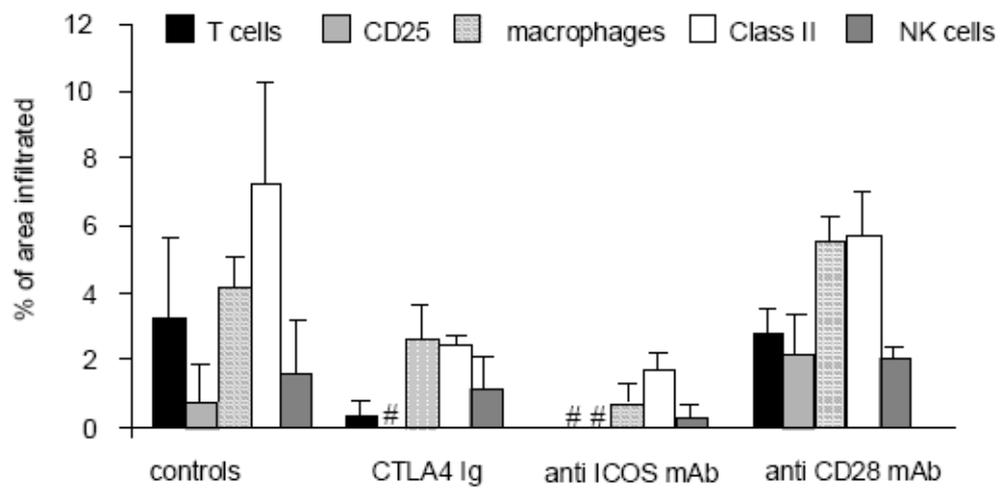


Figure 1:

Immunohistological analysis of cardiac xenografts 6 days after CSA withdrawal (i.e. 46 days post transplantation). Recipients received either no additional treatment (controls), CTLA4Ig, anti-ICOS or anti CD28 Mab. Grafts were analyzed for infiltration by $\alpha\beta$ TCR⁺ cells (R7-3), CD25⁺ cells (Ox39), monocyte/macrophage CD68 (ED-1), class II (Ox6) and NKRP-1 NK cells (3.2.3). Results are expressed as a percentage of the biopsy area occupied by positive cells. # % of area infiltrated measured as zero.

Figure 2

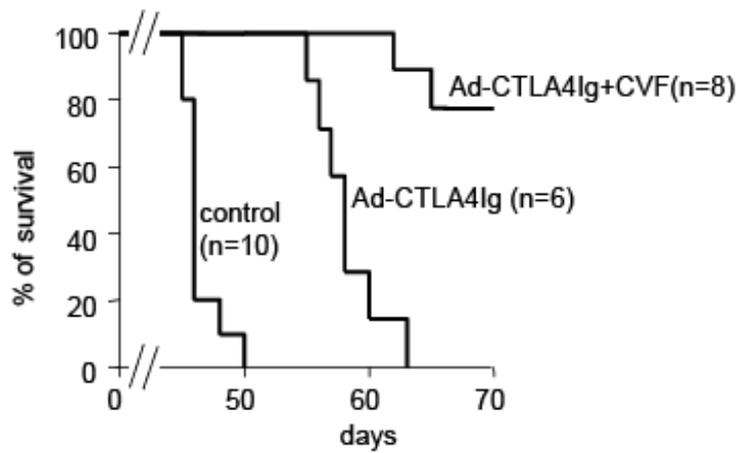


Figure 2 :

Xenograft survival of controls (n=10, MST: $46,4 \pm 1,5$), Ad-CTLA4Ig (n=6, MST: $59,5 \pm 2,6$) and Ad-CTLA4Ig+CVF-treated recipients (n=8, MST > 30) after CSA withdrawal.

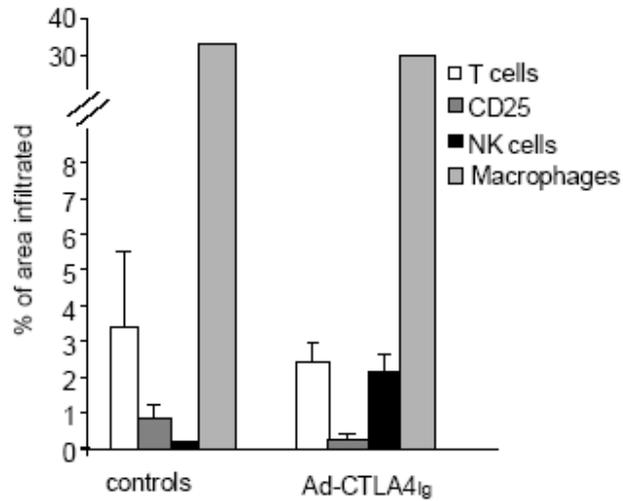


Figure 3 :

Immunohistological analysis of hearts from Ad-CTLA4Ig-treated animals. Grafts were harvested at rejection and analyzed for infiltration by $\alpha\beta$ TCR⁺ cells (R7-3), CD25⁺ cells (Ox39), CD161 (NKR-P1, 3.2.3) and macrophages (ED-1). Results are expressed as a percentage of the biopsy area occupied by cells. Mean of 5 observations \pm SD.

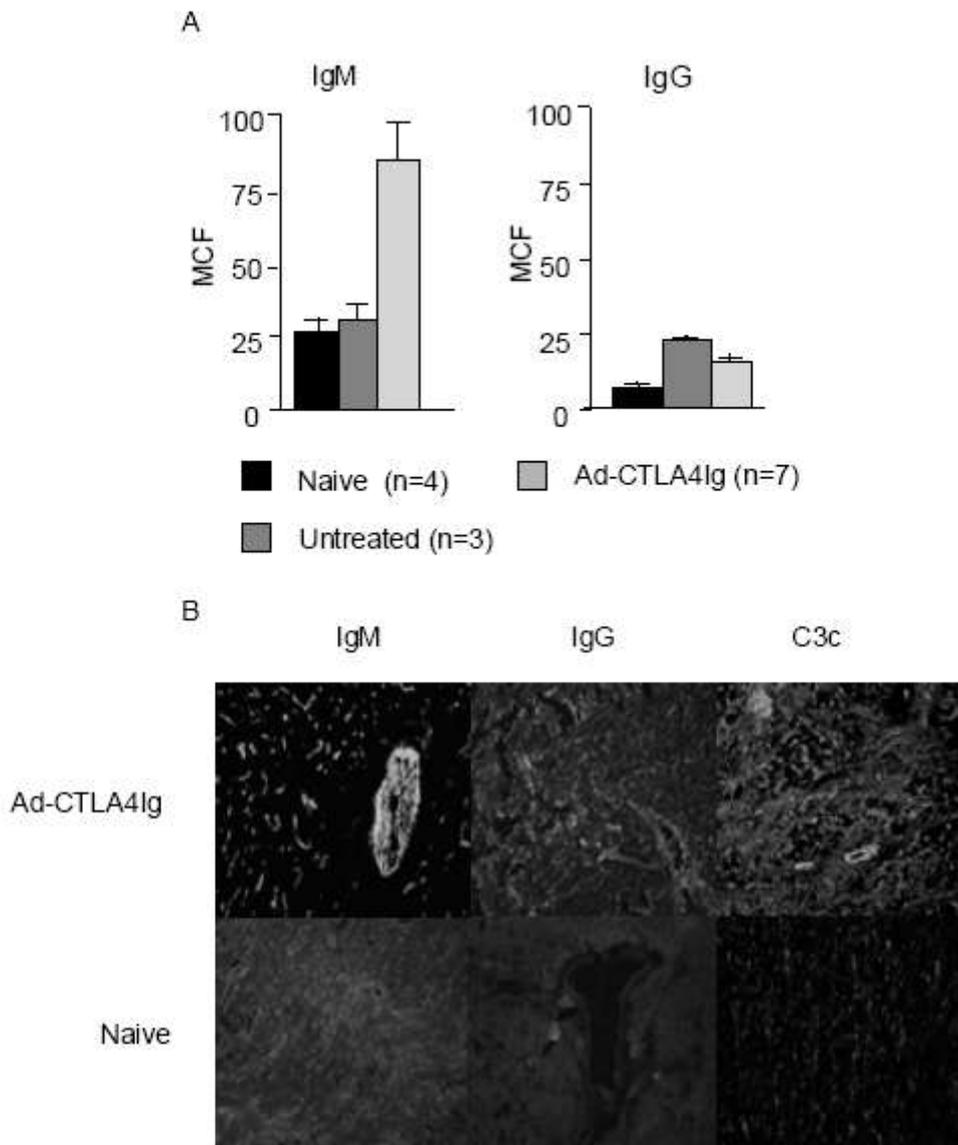


Figure 4 :

(A): Sera diluted 1/10 from naive, untreated rejecting recipients or rejecting recipients treated with Ad-CTLA4Ig were incubated with hamster Con A blasts and analyzed by cytofluorimetry for the presence of IgM and IgG . Serum from a rat immunized with a hamster splenocyte lysate was used as a positive control for IgG detection (data not shown). Results are expressed as mean channel fluorescence (MCF) of 5 samples \pm SD.

(B) Immunohistological analysis of hearts from naive or Ad-CTLA4Ig -treated animals. Grafts were harvested at rejection and analyzed for IgM, IgG and C3c complement deposition. Pictures are representative of 3 naive animals and 6 Ad-CTLA4Ig -treated recipients.

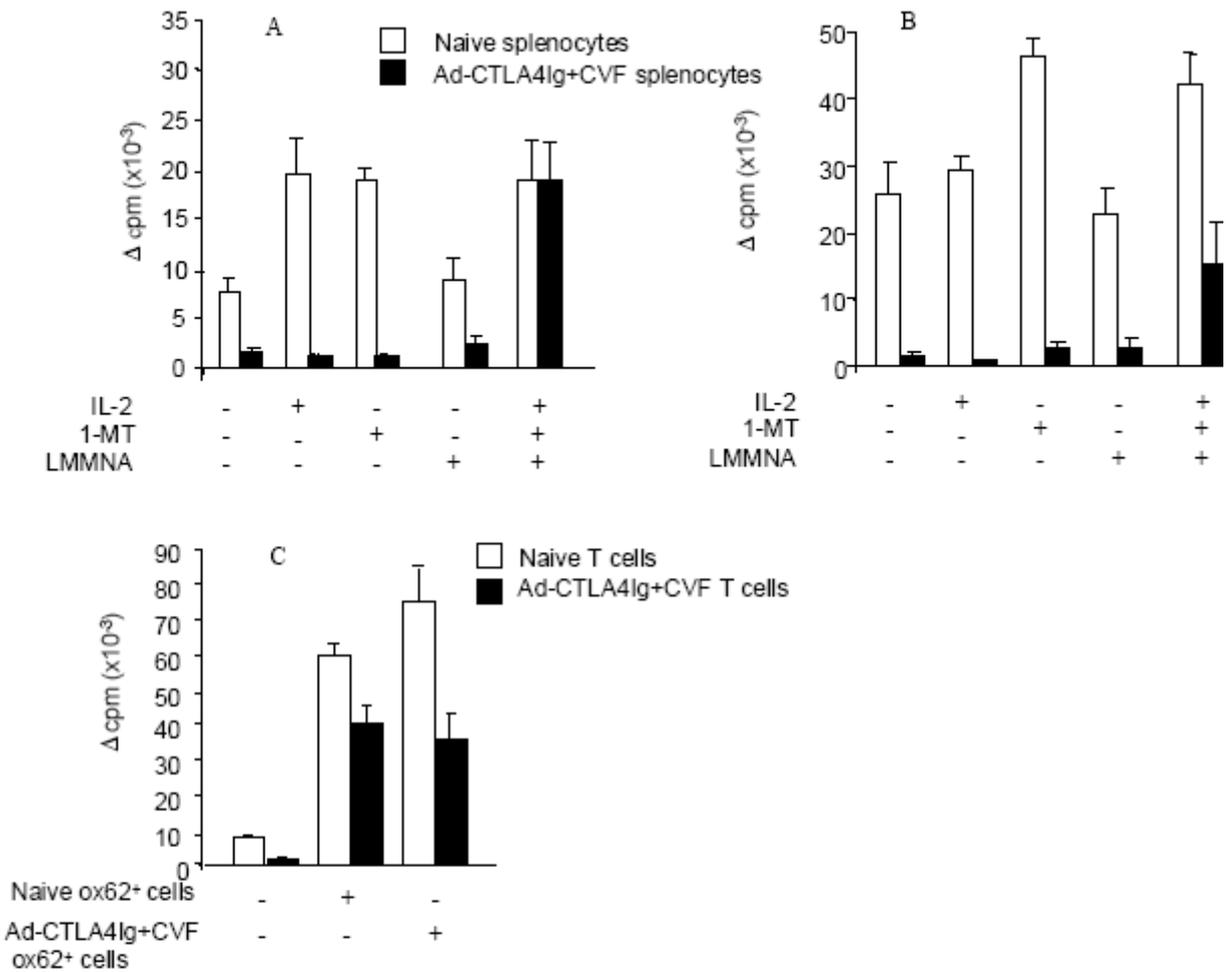


Figure 5 :

Proliferation of splenocytes (A and B) or T cells (C) from naive (□) or Ad-CTLA4Ig+CVF-treated rats (■) against donor (A) and third party (B) cells was assessed 30 days after CSA withdrawal. A and B: IL-2, 1-methyltryptophan (1-MT, IDO inhibitor) or L-NNMA (iNOS inhibitor) were added to the culture medium. C: Ox62⁺ cells purified from splenocytes from naive or AdCTLA4Ig+CVF-treated rats were added to the MLR at a ratio of 1:1. Proliferation was assessed after 3 days of culture and results are expressed as Δ cpm.

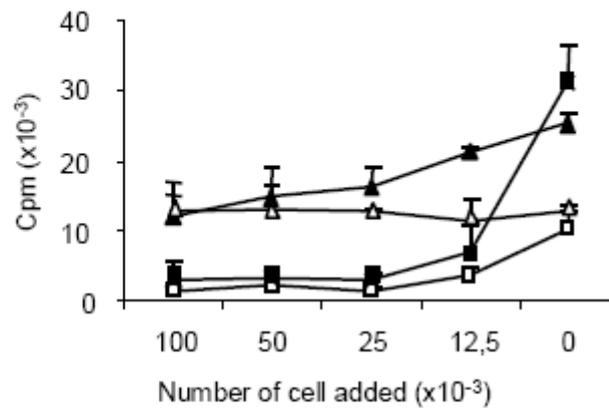


Figure 6 :

Proliferation of Lew 1A splenocytes stimulated by hamster (empty symbol) or third party Lew 1W (filled symbol) APC. X axis: addition of the indicated amount of spleen cells from naive Lew 1A (square) or from AdCTLA4g+CVF-treated rats (triangle). Proliferation was assessed after 3 days of culture and results are expressed as Δ cpm.

Résultats complémentaires et discussion.

Lors de l'analyse des animaux traités avec l'Ad-CTLA4Ig et ayant rejeté leur greffon, nous avons observé la présence d'un important infiltrat macrophagique au sein de la greffe, ainsi qu'une augmentation des cellules NK. Nous avons donc voulu savoir si ces cellules participaient également au rejet, en plus des IgM xénoréactives. Nous avons donc tout d'abord réalisé une déplétion des macrophages grâce à l'injection de liposome clodronate. Les liposomes injectés par voie intraveineuse sont phagocytés par les macrophages et le clodronate est relargué dans le cytoplasme, induisant leur apoptose (van Rooijen, Sanders et al. 1996). Cependant, les deux animaux traités sont morts de façon précoce (10 et 11 jours après l'arrêt de la CSA), probablement à cause d'une immunosuppression sévère due au double traitement avec l'Ad-CTLA4Ig et les liposomes clodronate.

Le rôle des cellules NK a également été étudié, grâce à l'utilisation d'un anticorps déplétant dirigé contre le marqueur NKRP-1 (clone 3.2.3). Bien que ce marqueur soit exprimé par plusieurs types cellulaires, l'injection iv de cet anticorps ne provoque que la déplétion des cellules NKRP-1^{high}, ce qui correspond aux cellules NK (van den Brink, Hunt et al. 1990). Les survies obtenues sont présentées dans le **tableau 9**. La déplétion a été confirmée par FACS dans le sang des animaux traités ainsi que par l'analyse immunohistologique des greffons. Ce traitement n'a toutefois pas permis d'obtenir une prolongation de survie comparativement à l'utilisation de l'Ad-CTLA4Ig seul, indiquant que les cellules NK ne jouent pas de rôle prédominant dans ce rejet.

Tableau 9 : résumé des traitements testés pour prévenir le rejet de xéngreffe chez les receveurs traités par l'Ad-CTLA4Ig. Le symbole # correspond au décès des animaux avec un greffon fonctionnel.

Traitement	n	Survie (jours)
Ad-CTLA4Ig	7	15,16,17,18,18,20,23
Ad-CTLA4Ig + liposome clodronate	2	10 [#] , 11 [#]
Ad-CTLA4Ig + Ac anti NKRP-1	3	16, 17, 20

Lors de l'analyse des greffons, nous avons également détecté des dépôts d'IgM xénoréactives ainsi que des dépôts de complément. Ces dépôts se situaient principalement au niveau des vaisseaux (**article 3**). La déplétion des cellules NK n'ayant pas d'incidence sur la survie des xéngreffes, il semble donc que seules les IgM xénoréactives soient responsables du

rejet observé après l'arrêt de la CSA chez les receveurs traités par l'Ad-CTLA4Ig. Leur mécanisme d'action passe notamment par l'activation du complément dont on retrouve des dépôts dans les greffons, principalement au niveau des vaisseaux. Ces anticorps sont de type induit car l'analyse de receveurs d'une xéno greffe cardiaque 40 jours après la greffe (sous traitement par CSA) ne montre pas d'anticorps xénoréactif dans le sérum. Il semble donc que les doses de CSA que nous avons utilisées soient suffisamment importantes pour inhiber la production d'anticorps T-dépendants et T-indépendants. Il apparaît également que le CTLA4Ig, dans ce modèle, inhibe efficacement la production d'IgG xénoréactives. En effet, en l'absence de traitement de substitution, les anticorps sont détectables dans le sérum entre 7 et 17 jours après l'arrêt de la CSA (**figure 20**). En présence de CTLA4-Ig circulant, on ne détecte pas d'IgG xénoréactives dans le sérum des receveurs (**article 3**).

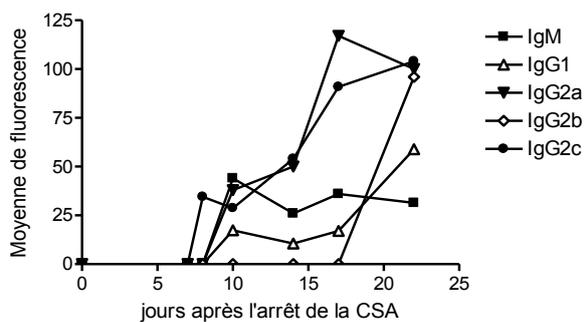


Figure 20 : Dosage sérique des xénoanticorps après l'arrêt de la CSA, en l'absence de tout traitement de substitution.

Afin d'étudier la présence d'éventuels mécanismes régulateurs dont la présence a été décrite en allotransplantation (Guillot, Menoret et al. 2003), nous avons déplété le complément par du CVF et analysé les animaux 30 jours après l'arrêt de la CSA. La déplétion a été confirmée par immunofluorescence sur les greffons : aucun dépôt de complément n'a été observé. Grâce à ce traitement, nous avons ainsi pu prolonger la survie et mettre en évidence la présence de cellules régulatrices dans la rate des animaux cotraités. Nos résultats sont similaires à ceux observés dans un modèle d'allogreffe cardiaque (Guillot, Menoret et al. 2003). En effet, nous observons une inhibition non spécifique de la prolifération des splénocytes issus des receveurs. D'autre part, les lymphocytes T purifiés à partir de ces splénocytes prolifèrent normalement lorsqu'ils sont stimulés par la voie indirecte de stimulation (**article 3**). Ceci suggère que l'inhibition de la prolifération des splénocytes observée en MLR est due à des cellules régulatrices non T. Cependant, l'ajout de cellules dendritiques Ox62⁺ restaure la prolifération lymphocytaire, indiquant que ce n'est pas

cette population qui porte l'effet inhibiteur, contrairement à ce qui a été rapporté en allotransplantation (Guillot, Menoret et al. 2003).

Afin de caractériser les mécanismes régulateurs, nous avons testé le rôle de l'IL-2, de IDO et de iNOs dans l'inhibition de la MLR. Il apparaît que l'ajout d'IL-2, associé à l'inhibition des deux enzymes précédemment citées, permet de restaurer la prolifération des splénocytes. Cependant, dans la suite des études, il serait intéressant de tester ces associations deux à deux afin de déterminer la combinaison la plus efficace. Dans le cas d'une implication d'IDO dans les mécanismes régulateurs, il serait intéressant d'étudier la présence de cette enzyme dans les cellules de nos animaux par FACS d'une part et sa fonctionnalité en dosant les produits issus de son activité comme la kynurénine dans les surnageants de MLR d'autre part. La présence et l'activité de iNOs pourra également être évaluée de la même manière.

Il serait également intéressant de déterminer si les cellules régulatrices sont constitutivement activées ou si la présence de l'antigène est nécessaire à leur activité. Nous avons donc réalisé des MLR en transwells, cependant nous avons rencontré des difficultés techniques (absence de prolifération de la MLR de base) qui ne nous permettent pas pour l'instant de répondre à cette question.

Lors du sacrifice des animaux, nous avons constaté une mégalosplénie importante chez tous les animaux traités par Ad-CTLA4Ig et CVF (**figure 21**). La rate des animaux traités était 2 à 3 fois plus grosse que celle des animaux naïfs et le nombre de splénocytes était également 2 à 3 fois plus important. Cette mégalosplénie n'a pas été décrite en allotransplantation lors de l'utilisation de l'Ad-CTLA4Ig. Les résultats préliminaires de phénotypage ont montré une diminution significative du pourcentage de lymphocytes T totaux comparativement à des animaux naïfs. Cependant, l'analyse en nombre absolu de cellules montre une augmentation significative des lymphocytes totaux, aussi bien T CD4⁺ que T CD8⁺. Il apparaît donc qu'une autre population cellulaire a fortement augmenté dans la rate des animaux traités. Il peut s'agir des cellules NK dont une augmentation est observée à la fois dans les splénocytes et dans les greffons, des macrophages qui sont également présents en quantité importante dans les greffons ou des lymphocytes B. Un phénotypage de ces différentes populations nous permettra de déterminer la ou les populations impliquées dans la mégalosplénie.

Lors de l'analyse anathomopathologique des greffons des animaux traités par Ad-CTLA4Ig et CVF, nous avons constaté la présence de lésions de rejet vasculaire ainsi que des lésions de rejet chronique. Nous souhaitons donc vérifier si les IgM xénoréactives détectées dans le greffon peuvent être responsables des lésions observées. Pour cela, des cultures primaires de cellules endothéliales, obtenues à partir d'aortes de hamster, sont incubées avec les sérums des

animaux et le profil d'activation des cellules sera étudié par PCR en analysant l'expression des gènes suivants : ICAM-1, IL-8, RANTES et ELAM. Le rôle des IgM dans le développement des lésions de rejet chronique pourra également être évalué *in vivo* par injection de sérum des animaux traités à des receveurs sous CSA et CVF. L'activation des cellules endothéliales par des IgM a déjà mise en évidence *in vitro* dans un modèle porc/primate (Vanhove B 1994). D'autre part, il apparaît que des anticorps dirigés contre d'autres épitopes que le Gal peuvent induire un rejet de xénogreffe d'organes Gal KO (Lee, Mansfield et al. 2005). Le contrôle efficace de la réponse B dans des combinaisons concordantes de xénogreffes est donc un élément clé d'une survie à long terme.

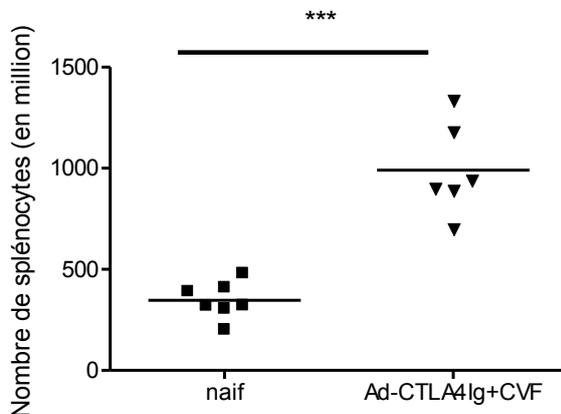


Figure 21 : Comparaison du nombre de splénocytes chez des animaux naïfs et chez des receveurs de xénogreffe traités par Ad-CTLA4Ig et CVF.

Dans le but de comparer le rôle de différentes voies de costimulation dans le rejet cellulaire, nous avons également bloqué la voie CD40/CD40L grâce à un adénovirus codant pour la molécule de fusion CD40-Ig. Ce traitement permet d'obtenir une longue survie, associée à des lésions de rejet chronique, dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillot, Guillonnet et al. 2002). Cependant, dans notre modèle, nous n'avons pas obtenu de prolongation significative de la survie des greffons. Il se peut que la voie CD40/CD40L soit peu ou pas impliquée dans l'activation des lymphocytes T xénoréactifs. Cela peut également être dû au fait que le signal généré par le TCR soit suffisamment puissant pour que l'activation T ne soit pas affectée par l'inhibition d'une voie secondaire de la costimulation. Cependant, le fait que l'inhibition à court terme de la voie ICOS/ICOSL permette de prolonger la survie de xénogreffes accommodées suggérerait plutôt que CD40/CD40L soit peu impliquée dans l'activation T. En effet, l'interaction CD40/CD40L entre le lymphocyte T et la CPA permet de renforcer le signal antigénique (Cella, Scheidegger et al. 1996), ce qui n'est peut-être pas nécessaire dans le cas d'une réponse

xénogénique qui est plus immunogène qu'une réponse allogénique. D'autre part, la voie CD40/CD40L est également impliquée dans l'activation des lymphocytes B de façon T-dépendante (Castigli, Alt et al. 1994; Renshaw, Fanslow et al. 1994). Cependant, dans notre modèle, les lymphocytes B responsables de la production des IgM semblent indépendants des lymphocytes T, excluant ainsi un rôle de la voie CD40/CD40L dans leur activation. Néanmoins, une étude des greffons sera nécessaire afin d'évaluer si l'inhibition de cette voie de costimulation n'a pas un effet, même modéré, sur la réponse lymphocytaire. En effet, des effets bénéfiques de cette inhibition, en association avec une immunosuppression forte, ont été reportés dans un modèle de primate (Kuwaki, Knosalla et al. 2004). En conclusion, la génération de mécanismes régulateurs grâce à l'inhibition de la costimulation semble possible en xénotransplantation. Une comparaison entre l'effet du CTLA4-Ig et d'un anticorps anti-CD28 serait intéressante à effectuer. L'inhibition à long terme d'autres voies, telles que ICOS, reste également à explorer. Des inhibitions simultanées de plusieurs voies de costimulation devrait permettre, comme en allotransplantation (Guillonnet, Aubry et al. 2005), d'améliorer la survie et l'aspect histologique des greffons. Enfin, il apparaît que le blocage seul de la costimulation ne permet pas de contrôler complètement la réponse humorale chez le rat. Le contrôle de la réponse anticorps est primordial en xénotransplantation, aussi bien chez le rat que chez le primate où le rejet humoral persiste malgré l'obtention de porcs GT-KO (Chen, Qian et al. 2005).

Conclusion générale

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle de la costimulation, et plus particulièrement de la voie CD28/CTLA-4/B7 sur le rejet aigu et chronique d'allo et de xéno greffe. Une longue survie, voire une tolérance, est plus difficile à obtenir en xénotransplantation qu'en allotransplantation et les résultats obtenus jusqu'à présent sont encore loin d'être applicables en clinique. En allotransplantation, l'obtention d'une tolérance opérationnelle est d'ores et déjà une réalité pour un petit nombre de patients. Il est donc raisonnable d'espérer comprendre les mécanismes mis en jeu chez ces patients et pouvoir en faire bénéficier le plus grand nombre. Les études menées chez les rongeurs indiquent que le blocage de la costimulation est un moyen prometteur d'y arriver. La tolérance permettrait ainsi de diminuer les effets secondaires inhérents aux traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés (infection et cancer) mais également d'augmenter le nombre d'organes disponibles pour la greffe en réduisant le nombre de secondes et troisièmes greffes effectuées pour cause de rejet aigu ou chronique.

Cependant, même une augmentation du nombre d'organes disponibles ne devrait pas permettre de combler la disparité qui existe entre le nombre de patients en attente de greffe et la quantité d'organes disponibles. A cet égard, la xénotransplantation possède un réel avantage. Le rejet humoral reste à contrôler et le rejet cellulaire risque également de poser de nombreux problèmes. Cependant, là encore, le blocage de la costimulation semble une voie prometteuse pour contrôler finement les réponses cellulaires.

Bibliographie

- Abe, R., P. Vandenberghe, et al. (1995). "Distinct signal transduction in mouse CD4+ and CD8+ splenic T cells after CD28 receptor ligation." *J Immunol* **154**(3): 985-97.
- Acuto, O. and F. Michel (2003). "CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 939-51.
- Acuto, O., S. Mise-Omata, et al. (2003). "Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor." *Immunol Rev* **192**: 21-31.
- Aksentijevich, I., D. H. Sachs, et al. (1992). "Humoral tolerance in xenogeneic BMT recipients conditioned by a nonmyeloablative regimen." *Transplantation* **53**(5): 1108-14.
- Albert, M. H., X. Z. Yu, et al. (2005). "Prevention of lethal acute GVHD with an agonistic CD28 antibody and rapamycin." *Blood* **105**(3): 1355-61.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, et al. (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **188**(7): 1359-68.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Alderson, M. R., R. J. Armitage, et al. (1993). "CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40." *J Exp Med* **178**(2): 669-74.
- Alegre, M. L., P. J. Noel, et al. (1996). "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells." *J Immunol* **157**(11): 4762-70.
- Alexander-Miller, M. A., G. R. Leggatt, et al. (1996). "Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL." *J Exp Med* **184**(2): 485-92.
- Alexandre, G. P., J. P. Squifflet, et al. (1987). "Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts." *Transplant Proc* **19**(6): 4538-42.
- Alwayn, I. P., J. Z. Appel, et al. (2000). "Inhibition of platelet aggregation in baboons: therapeutic implications for xenotransplantation." *Xenotransplantation* **7**(4): 247-57.
- Alwayn, I. P., Y. Xu, et al. (2001). "Effects of specific anti-B and/or anti-plasma cell immunotherapy on antibody production in baboons: depletion of CD20- and CD22-positive B cells does not result in significantly decreased production of anti-alphaGal antibody." *Xenotransplantation* **8**(3): 157-71.
- Anderson, G., K. M. Partington, et al. (1998). "Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus." *J Immunol* **161**(12): 6599-603.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, et al. (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-401.
- Armitage, R. J., T. W. Tough, et al. (1993). "CD40 ligand is a T cell growth factor." *Eur J Immunol* **23**(9): 2326-31.
- Ashton-Chess, J., G. Meurette, et al. (2004). "The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide." *Xenotransplantation* **11**(2): 112-22.
- Ashton-Chess, J., J. C. Roussel, et al. (2003a). "The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons." *Xenotransplantation* **10**(6): 552-561.
- Ashton-Chess, J., J. C. Roussel, et al. (2003b). "Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons." *Xenotransplantation* **10**(5): 446-53.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, et al. (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3373-7.
- Aviner, S., X. Yao, et al. (2005). "Large-scale preparation of human anti-third-party veto cytotoxic T lymphocytes depleted of graft-versus-host reactivity: a new source for graft facilitating cells in bone marrow transplantation." *Hum Immunol* **66**(6): 644-52.
- Azuma, H., A. Chandraker, et al. (1996). "Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22): 12439-44.
- Bacchetta, R., C. Sartirana, et al. (2002). "Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines." *Eur J Immunol* **32**(8): 2237-45.
- Bach, F. H., C. Ferran, et al. (1997). "Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment." *Nat Med* **3**(2): 196-204.
- Bach, F. H., H. Winkler, et al. (1996). "Delayed xenograft rejection." *Immunol Today* **17**(8): 379-84.
- Baeten, D., S. Louis, et al. (2006). "Phenotypically and Functionally Distinct CD8+ Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free Tolerance and Chronic Rejection in Human Kidney Graft Recipients." *J Am Soc Nephrol* **17**(1): 294-304.

- Baker, R. J., M. P. Hernandez-Fuentes, et al. (2001). "Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy." *J Immunol* **167**(12): 7199-206.
- Baratin, M., K. Bonin, et al. (2004). "Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition." *Eur J Immunol* **34**(12): 3305-14.
- Barrat, F. J., D. J. Cua, et al. (2002). "In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines." *J Exp Med* **195**(5): 603-16.
- Barth, R. N., S. Yamamoto, et al. (2003). "Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model: I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness." *Transplantation* **75**(10): 1615-24.
- Barzaga-Gilbert, E., D. Grass, et al. (1992). "Species specificity and augmentation of responses to class II major histocompatibility complex molecules in human CD4 transgenic mice." *J Exp Med* **175**(6): 1707-15.
- Batchelor, J. R., K. I. Welsh, et al. (1979). "Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. I. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys into secondary AS recipients." *J Exp Med* **150**(3): 455-64.
- Baumann, B. C., P. Forte, et al. (2004). "Lack of galactose-alpha-1,3-galactose expression on porcine endothelial cells prevents complement-induced lysis but not direct xenogeneic NK cytotoxicity." *J Immunol* **172**(10): 6460-7.
- Bedford, P., K. Garner, et al. (1999). "MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions." *Int Immunol* **11**(11): 1739-44.
- Bedke, T., W. Baars, et al. (2003). "Modulation of human anti-pig T cell responses by monoclonal antibodies directed to porcine CD45 molecules." *Ann Transplant* **8**(3): 35-8.
- Bendelac, A., M. N. Rivera, et al. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 535-62.
- Bensinger, S. J., A. Bandeira, et al. (2001). "Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells." *J Exp Med* **194**(4): 427-38.
- Beyersdorf, N., S. Gaupp, et al. (2005). "Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* **202**(3): 445-55.
- Bickerstaff, A. A., A. M. VanBuskirk, et al. (2000). "Transforming growth factor-beta and interleukin-10 subvert alloreactive delayed type hypersensitivity in cardiac allograft acceptor mice." *Transplantation* **69**(7): 1517-20.
- Bjorndahl, J. M., S. S. Sung, et al. (1989). "Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies." *Eur J Immunol* **19**(5): 881-7.
- Blair, P. J., J. L. Riley, et al. (1998). "CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction." *J Immunol* **160**(1): 12-5.
- Blakely, M. L., W. J. Van der Werf, et al. (1994). "Activation of intragraft endothelial and mononuclear cells during discordant xenograft rejection." *Transplantation* **58**(10): 1059-66.
- Blazar, B. R., P. A. Taylor, et al. (1997). "Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation." *J Immunol* **158**(1): 29-39.
- Bluestone, J. A., A. Kaliyaperumal, et al. (1993). "Peptide-induced changes in class I heavy chains alter allorecognition." *J Immunol* **151**(8): 3943-53.
- Boasso, A., J. P. Herbeval, et al. (2005). "Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells." *Blood* **105**(4): 1574-81.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity* **3**(1): 87-98.
- Bonenfant, C., I. Vallee, et al. (2003). "Analysis of human CD4 T lymphocyte proliferation induced by porcine lymphoblastoid B cell lines." *Xenotransplantation* **10**(2): 107-19.
- Boonen, G. J., A. M. van Dijk, et al. (1999). "CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes." *Eur J Immunol* **29**(3): 789-98.
- Borche Luis, T. K., Navenot Jean-Marc, Soulillou Jean-Paul, Blanchard Dominique (1994). "Cytolytic effect of human anti-Gal IgM and complement on porcine endothelial cells: A kinetic analysis." *Xenotransplantation* **1**(2): 125-131.
- Bowen, K. M., L. Andrus, et al. (1980). "Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients." *Diabetes* **29 Suppl 1**: 98-104.
- Boyson, J. E., B. Rybalov, et al. (2002). "CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(21): 13741-6.
- Bracy, J. L., C. M. Chase, et al. (2001). "Induction of molecular chimerism by gene therapy prevents antibody-mediated heart transplant rejection." *Gene Ther* **8**(22): 1738-44.
- Bracy, J. L. and J. Iacomini (2000). "Induction of B-cell tolerance by retroviral gene therapy." *Blood* **96**(9): 3008-15.

- Bracy, J. L., D. H. Sachs, et al. (1998). "Inhibition of xenoreactive natural antibody production by retroviral gene therapy." *Science* **281**(5384): 1845-7.
- Brandle, D., J. Joergensen, et al. (1998). "Contribution of donor-specific antibodies to acute allograft rejection: evidence from B cell-deficient mice." *Transplantation* **65**(11): 1489-93.
- Brauer, R. B., W. M. Baldwin, 3rd, et al. (1993). "Use of C6-deficient rats to evaluate the mechanism of hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts." *J Immunol* **151**(12): 7240-8.
- Brauer, R. B., W. M. Baldwin, III, et al. (1996). "Functional activity of anti-C6 antibodies elicited in C6-deficient rats reconstituted by liver allografts. Ability to inhibit hyperacute rejection of discordant cardiac xenografts." *Transplantation* **61**(4): 588-94.
- Brent, L. and P. B. Medawar (1967). "Cellular immunity and the homograft reaction." *Br Med Bull* **23**(1): 55-60.
- Brewer, R. J., M. J. Del Rio, et al. (1993). "Depletion of preformed antibody in primates for discordant xenotransplantation by continuous donor organ plasma perfusion." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 1): 385-6.
- Brouard, S., G. Blanche, et al. (1998). "Long-term survival of hamster-to-rat cardiac xenografts in the absence of a Th2 shift." *Transplantation* **65**(12): 1555-63.
- Brouard, S., D. Bouhours, et al. (2000). "Induction of anti-Forssman antibodies in the hamster-to-rat xenotransplantation model." *Transplantation* **69**(6): 1193-201.
- Brouard, S., B. Vanhove, et al. (1999). "T cell repertoire alterations of vascularized xenografts." *J Immunol* **162**(6): 3367-77.
- Bruder, D., M. Probst-Kepper, et al. (2004). "Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells." *Eur J Immunol* **34**(3): 623-30.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." *Nat Genet* **27**(1): 68-73.
- Buhler, L., I. P. Alwayn, et al. (2001). "CD40-CD154 pathway blockade requires host macrophages to induce humoral unresponsiveness to pig hematopoietic cells in baboons." *Transplantation* **72**(11): 1759-68.
- Buhler, L., M. Awwad, et al. (2000). "High-dose porcine hematopoietic cell transplantation combined with CD40 ligand blockade in baboons prevents an induced anti-pig humoral response." *Transplantation* **69**(11): 2296-304.
- Buhler, L., M. Awwad, et al. (2002). "Pig hematopoietic cell chimerism in baboons conditioned with a nonmyeloablative regimen and CD154 blockade." *Transplantation* **73**(1): 12-22.
- Buhler, L., K. Yamada, et al. (2001). "Pig kidney transplantation in baboons: anti-Gal(alpha)1-3Gal IgM alone is associated with acute humoral xenograft rejection and disseminated intravascular coagulation." *Transplantation* **72**(11): 1743-52.
- Buhler, L. H., T. R. Spitzer, et al. (2002). "Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease." *Transplantation* **74**(10): 1405-9.
- Byrne, G. W., K. R. McCurry, et al. (1995). "Protection of xenogeneic cardiac endothelium from human complement by expression of CD59 or DAF in transgenic mice." *Transplantation* **60**(10): 1149-56.
- Byrne, G. W., K. R. McCurry, et al. (1997). "Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage." *Transplantation* **63**(1): 149-55.
- Byrne, G. W., J. M. Schirmer, et al. (2005). "Warfarin or low-molecular-weight heparin therapy does not prolong pig-to-primate cardiac xenograft function." *Am J Transplant* **5**(5): 1011-20.
- Calne, R. Y. (1970). "Organ transplantation between widely disparate species." *Transplant Proc* **2**(4): 550-6.
- Candinas, D., S. Belliveau, et al. (1996). "T cell independence of macrophage and natural killer cell infiltration, cytokine production, and endothelial activation during delayed xenograft rejection." *Transplantation* **62**(12): 1920-7.
- Candinas, D., B. A. Lesnikoski, et al. (1996). "Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival." *Transplantation* **62**(3): 336-42.
- Castigli, E., F. W. Alt, et al. (1994). "CD40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(25): 12135-9.
- Cederbom, L., H. Hall, et al. (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." *Eur J Immunol* **30**(6): 1538-43.
- Cella, M., A. Engering, et al. (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." *Nature* **388**(6644): 782-7.
- Cella, M., D. Scheidegger, et al. (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *J Exp Med* **184**(2): 747-52.
- Chai, J. G., I. Bartok, et al. (1999). "Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo." *Eur J Immunol* **29**(2): 686-92.
- Chai, J. G., S. Vendetti, et al. (2000). "CD152 ligation by CD80 on T cells is required for the induction of unresponsiveness by costimulation-deficient antigen presentation." *J Immunol* **165**(6): 3037-42.

- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." *Nat Immunol* **3**(3): 237-43.
- Charreau, B., S. Menoret, et al. (1999). "Protection against hyperacute xenograft rejection of transgenic rat hearts expressing human decay accelerating factor (DAF) transplanted into primates." *Mol Med* **5**(9): 617-30.
- Chen, D., K. Giannopoulos, et al. (2004). "Inhibition of intravascular thrombosis in murine endotoxemia by targeted expression of hirudin and tissue factor pathway inhibitor analogs to activated endothelium." *Blood* **104**(5): 1344-9.
- Chen, G., H. Qian, et al. (2005). "Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys." *Nat Med* **11**(12): 1295-8.
- Chen, G., Q. Y. Sun, et al. (2004). "Improved suppression of circulating complement does not block acute vascular rejection of pig-to-rhesus monkey cardiac transplants." *Xenotransplantation* **11**(2): 123-32.
- Chen, R. H., S. Naficy, et al. (1999). "Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates." *Xenotransplantation* **6**(3): 194-200.
- Chen, W., M. S. Ford, et al. (2003). "Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival." *J Immunol* **170**(4): 1846-53.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-86.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." *Science* **265**(5176): 1237-40.
- Chikuma, S., J. B. Imboden, et al. (2003). "Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **197**(1): 129-35.
- Chong, A. S., L. Ma, et al. (2000). "Non-depleting anti-CD4, but not anti-CD8, antibody induces long-term survival of xenogeneic and allogeneic hearts in alpha1,3-galactosyltransferase knockout (GT-Ko) mice." *Xenotransplantation* **7**(4): 275-83.
- Chong, A. S., L. L. Ma, et al. (1997). "Modification of humoral responses by the combination of leflunomide and cyclosporine in Lewis rats transplanted with hamster hearts." *Transplantation* **64**(12): 1650-7.
- Chong, A. S., J. Shen, et al. (1996). "Delayed xenograft rejection in the concordant hamster heart into Lewis rat model." *Transplantation* **62**(1): 90-6.
- Chopek, M. W., R. L. Simmons, et al. (1987). "ABO-incompatible kidney transplantation: initial immunopathologic evaluation." *Transplant Proc* **19**(6): 4553-7.
- Chuang, E., T. S. Fisher, et al. (2000). "The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A." *Immunity* **13**(3): 313-22.
- Cinek, T., A. Sadra, et al. (2000). "Cutting edge: tyrosine-independent transmission of inhibitory signals by CTLA-4." *J Immunol* **164**(1): 5-8.
- Ciubotariu, R., A. I. Colovai, et al. (1998). "Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells." *J Immunol* **161**(10): 5193-202.
- Ciubotariu, R., Z. Liu, et al. (1998). "Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts." *J Clin Invest* **101**(2): 398-405.
- Claesson, M. H. (1987). "Veto cell H-2 antigens: veto cell activity is restricted by determinants encoded by K, D, and I MHC regions." *Cell Immunol* **109**(2): 360-70.
- Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." *Nature* **357**(6380): 695-7.
- Cobbold, S. and H. Waldmann (1998). "Infectious tolerance." *Curr Opin Immunol* **10**(5): 518-24.
- Coenen, J. J., H. J. Koenen, et al. (2006). "Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27+ subset of human CD4+CD25+ regulatory T cells." *Blood* **107**(3): 1018-23.
- Colovai, A. I., Z. Liu, et al. (2000). "Induction of xenoreactive CD4+ T-cell anergy by suppressor CD8+CD28- T cells." *Transplantation* **69**(7): 1304-10.
- Contardi, E., G. L. Palmisano, et al. (2005). "CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction." *Int J Cancer* **117**(4): 538-50.
- Cooper, D. K., A. H. Good, et al. (1993). "Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man." *Transpl Immunol* **1**(3): 198-205.
- Cooper, D. K., P. A. Human, et al. (1988). "Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon." *J Heart Transplant* **7**(3): 238-46.
- Cooper, D. K., Y. Ye, et al. (1993). "Specific intravenous carbohydrate therapy. A new concept in inhibiting antibody-mediated rejection--experience with ABO-incompatible cardiac allografting in the baboon." *Transplantation* **56**(4): 769-77.
- Cooper, J. T., D. M. Stroka, et al. (1996). "A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism." *J Biol Chem* **271**(30): 18068-73.

- Corbascio, M., H. Mahanty, et al. (2002). "Anti-lymphocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody inhibits CD40 ligand-independent immune responses and prevents chronic vasculopathy in CD40 ligand-deficient mice." *Transplantation* **74**(1): 35-41.
- Costa, C., L. Zhao, et al. (1999a). "Expression of the human alpha1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytolysis." *Faseb J* **13**(13): 1762-73.
- Costa, C., L. Zhao, et al. (1999b). "Comparative analysis of three genetic modifications designed to inhibit human serum-mediated cytolysis." *Xenotransplantation* **6**(1): 6-16.
- Coulson, M. T., P. Jablonski, et al. (2005). "Beyond operational tolerance: effect of ischemic injury on development of chronic damage in renal grafts." *Transplantation* **80**(3): 353-61.
- Cowan, P. J., A. Aminian, et al. (2000). "Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons." *Transplantation* **69**(12): 2504-15.
- Cowan, P. J., A. Aminian, et al. (2002). "Protective effects of recombinant human antithrombin III in pig-to-primate renal xenotransplantation." *Am J Transplant* **2**(6): 520-5.
- Cowan, P. J., C. G. Chen, et al. (1998). "Knock out of alpha1,3-galactosyltransferase or expression of alpha1,2-fucosyltransferase further protects CD55- and CD59-expressing mouse hearts in an ex vivo model of xenograft rejection." *Transplantation* **65**(12): 1599-604.
- Cozzi, E., F. Bhatti, et al. (2000). "Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts." *Transplantation* **70**(1): 15-21.
- Croft, M., L. Carter, et al. (1994). "Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles." *J Exp Med* **180**(5): 1715-28.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2002). "CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy." *Curr Opin Immunol* **14**(6): 771-8.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, et al. (2004). "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion." *J Immunol* **173**(12): 7259-68.
- Curotto de Lafaille, M. A., S. Muriglian, et al. (2001). "Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes." *J Exp Med* **194**(9): 1349-59.
- Czapiga, M., A. D. Kirk, et al. (2004). "Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation." *Exp Hematol* **32**(2): 135-9.
- Dai, Y., T. D. Vaught, et al. (2002). "Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs." *Nat Biotechnol* **20**(3): 251-5.
- Dai, Z., B. T. Konieczny, et al. (1998). "Impaired alloantigen-mediated T cell apoptosis and failure to induce long-term allograft survival in IL-2-deficient mice." *J Immunol* **161**(4): 1659-63.
- Dallman, M. J., O. Shiho, et al. (1991). "Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway." *J Exp Med* **173**(1): 79-87.
- Dalmaso, A. P., G. M. Vercellotti, et al. (1992). "Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients." *Am J Pathol* **140**(5): 1157-66.
- Dalmaso, A. P., G. M. Vercellotti, et al. (1991). "Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection." *Transplantation* **52**(3): 530-3.
- Danese, S., C. de la Motte, et al. (2004). "Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification." *J Immunol* **172**(4): 2011-5.
- Davila, E., Y. M. Kang, et al. (2005). "Cell-based immunotherapy with suppressor CD8+ T cells in rheumatoid arthritis." *J Immunol* **174**(11): 7292-301.
- Dehoux, J. P., B. de la Parra, et al. (2001). "Effect in vitro and in vivo of a rat anti-CD2 monoclonal antibody (LO-CD2b) on pig-to-baboon xenogeneic cellular (T and natural killer cells) immune response." *Xenotransplantation* **8**(3): 193-201.
- Dehoux, J. P., B. de la Parra, et al. (2002). "Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft." *Xenotransplantation* **9**(5): 338-49.
- Dehoux, J. P., S. Hori, et al. (2000). "Specific depletion of preformed IgM natural antibodies by administration of anti-mu monoclonal antibody suppresses hyperacute rejection of pig to baboon renal xenografts." *Transplantation* **70**(6): 935-46.
- Delfs, M. W., Y. Furukawa, et al. (2001). "CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection." *Transplantation* **71**(5): 606-10.
- Delidakis, A., M. Hayes, et al. (2001). "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* **71**(5): 599-605.
- Dengler, T. J., G. Szabo, et al. (1999). "Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation." *Transplantation* **67**(3): 392-8.

- Derbinski, J., A. Schulte, et al. (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." *Nat Immunol* **2**(11): 1032-9.
- Deschamps, J. Y., F. A. Roux, et al. (2005a). "Reluctance of French patients with type 1 diabetes to undergo pig pancreatic islet xenotransplantation." *Xenotransplantation* **12**(3): 175-80.
- Deschamps, J. Y., F. A. Roux, et al. (2005b). "History of xenotransplantation." *Xenotransplantation* **12**(2): 91-109.
- Dhein, J., H. Walczak, et al. (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." *Nature* **373**(6513): 438-41.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, et al. (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." *J Exp Med* **196**(2): 247-53.
- Diehl, S. and M. Rincon (2002). "The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation." *Mol Immunol* **39**(9): 531-6.
- Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2002). "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11796-801.
- DiSanto, J. P., J. Y. Bonnefoy, et al. (1993). "CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM." *Nature* **361**(6412): 541-3.
- Dong, V. M., X. Yuan, et al. (2002). "Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection." *Transplantation* **73**(8): 1310-7.
- Dor, F. J., K. Kuwaki, et al. (2005). "Potential of aspirin to inhibit thrombotic microangiopathy in alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pig hearts after transplantation in baboons." *Transplant Proc* **37**(1): 489-90.
- Dorado, B., M. J. Jerez, et al. (2002). "Autocrine IL-4 gene regulation at late phases of TCR activation in differentiated Th2 cells." *J Immunol* **169**(6): 3030-7.
- Dorling, A. (2003). "Are anti-endothelial cell antibodies a pre-requisite for the acute vascular rejection of xenografts?" *Xenotransplantation* **10**(1): 16-23.
- Dorling, A., W. Jordan, et al. (2001). "Accommodated" pig endothelial cells promote nitric oxide-dependent Th-2 cytokine responses from human T cells." *Transplantation* **72**(10): 1597-602.
- Dorling, A., G. Lombardi, et al. (1996). "Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population." *Eur J Immunol* **26**(6): 1378-87.
- Duncan, S. R., N. G. Capetanakis, et al. (2002). "Thymic dendritic cells traffic to thymi of allogeneic recipients and prolong graft survival." *J Clin Invest* **109**(6): 755-64.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." *Immunity* **16**(1): 23-35.
- Elliott, R. B., L. Escobar, et al. (2000). "No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts." *Cell Transplant* **9**(6): 895-901.
- Epperson, D. E. and J. S. Pober (1994). "Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells." *J Immunol* **153**(12): 5402-12.
- Erdmann, A. A., U. Jung, et al. (2004). "Co-stimulated/Tc2 cells abrogate murine marrow graft rejection." *Biol Blood Marrow Transplant* **10**(9): 604-13.
- Facchetti, F., C. Appiani, et al. (1995). "Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Abortive germinal center cell reaction and severe depletion of follicular dendritic cells." *J Immunol* **154**(12): 6624-33.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." *Cell Death Differ* **9**(10): 1069-77.
- Fallarino, F., C. Vacca, et al. (2002). "Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells." *Int Immunol* **14**(1): 65-8.
- Fandrich, F., X. Lin, et al. (2002). "Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning." *Nat Med* **8**(2): 171-8.
- Ferber, I., G. Schonrich, et al. (1994). "Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen." *Science* **263**(5147): 674-6.
- Ferrari, S., S. Giliani, et al. (2001). "Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12614-9.
- Finkelman, F. D., A. Lees, et al. (1996). "Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion." *J Immunol* **157**(4): 1406-14.
- Fischbein, M. P., J. Yun, et al. (2002). "Role of CD8+ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts." *J Thorac Cardiovasc Surg* **123**(4): 803-9.
- Fischel, R. J., A. J. Matas, et al. (1992). "Plasma exchange, organ perfusion, and immunosuppression reduce "natural" antibody levels as measured by binding to xenogeneic endothelial cells and prolong discordant xenograft survival." *Transplant Proc* **24**(2): 574-5.
- Fischer, K., S. Voelkl, et al. (2005). "Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells." *Blood* **105**(7): 2828-35.

- Fisicaro, N., A. Aminian, et al. (2000). "The pig analogue of CD59 protects transgenic mouse hearts from injury by human complement." *Transplantation* **70**(6): 963-8.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Ford, M. S., K. J. Young, et al. (2002). "The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo." *J Exp Med* **196**(2): 261-7.
- Forte p, P. I., Matter-Reissmann ub, Stussi m, Schneider mk, Seebach jd (2004). "HLA-G inhibits rolling adhesion of activated human NK cells on porcine endothelial cells." *J Immunol*(167): 6002.
- Foussat, A., F. Cottrez, et al. (2003). "A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation." *J Immunol* **171**(10): 5018-26.
- Fowler, D. H. and R. E. Gress (2000). "Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma." *Leuk Lymphoma* **38**(3-4): 221-34.
- Frasca, L., C. Scotta, et al. (2002). "Human anergic CD4+ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival." *J Immunol* **168**(3): 1060-8.
- Freedman, A. S., G. Freeman, et al. (1987). "B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells." *J Immunol* **139**(10): 3260-7.
- Friberg, M., R. Jennings, et al. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection." *Int J Cancer* **101**(2): 151-5.
- Frumento, G., R. Rotondo, et al. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Exp Med* **196**(4): 459-68.
- Fujigaki, S., K. Saito, et al. (2001). "Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-gamma-independent mechanism." *Eur J Immunol* **31**(8): 2313-8.
- Furtado, G. C., M. A. Curotto de Lafaille, et al. (2002). "Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function." *J Exp Med* **196**(6): 851-7.
- Furtado, G. C., D. Olivares-Villagomez, et al. (2001). "Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *Immunol Rev* **182**: 122-34.
- Gaca, J. G., A. Leshner, et al. (2002). "Disseminated intravascular coagulation in association with pig-to-primate pulmonary xenotransplantation." *Transplantation* **73**(11): 1717-23.
- Gajewski, T. F., M. Pinnas, et al. (1991). "Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations." *J Immunol* **146**(6): 1750-8.
- Galazka, G., M. Stasiolek, et al. (2006). "Brain-derived heat shock protein 70-peptide complexes induce NK cell-dependent tolerance to experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **176**(3): 1588-99.
- Galili, U., B. A. Macher, et al. (1985). "Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1---3)-linked galactose residues." *J Exp Med* **162**(2): 573-82.
- Galili, U., R. E. Mandrell, et al. (1988). "Interaction between human natural anti-alpha-galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora." *Infect Immun* **56**(7): 1730-7.
- Galili, U., S. B. Shohet, et al. (1988). "Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells." *J Biol Chem* **263**(33): 17755-62.
- Gasque, P. (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." *Mol Immunol* **41**(11): 1089-98.
- Gauchat, J. F., S. Henchoz, et al. (1995). "CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils." *Eur J Immunol* **25**(3): 863-5.
- George, J. F., S. D. Sweeney, et al. (1998). "An essential role for Fas ligand in transplantation tolerance induced by donor bone marrow." *Nat Med* **4**(3): 333-5.
- Gershon, R. K. (1975). "A disquisition on suppressor T cells." *Transplant Rev* **26**: 170-85.
- Gershon, R. K. and K. Kondo (1970). "Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes." *Immunology* **18**(5): 723-37.
- Ghanekar, A., G. Lajoie, et al. (2002). "Improvement in rejection of human decay accelerating factor transgenic pig-to-primate renal xenografts with administration of rabbit antithymocyte serum." *Transplantation* **74**(1): 28-35.
- Ghanekar, A., M. Mendicino, et al. (2004). "Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection." *J Immunol* **172**(9): 5693-701.
- Gilli, U. O., M. K. Schneider, et al. (2005). "Human polymorphonuclear neutrophils are recruited by porcine chemokines acting on CXC chemokine receptor 2, and platelet-activating factor." *Transplantation* **79**(10): 1324-31.
- Godfrey, V. L., J. E. Wilkinson, et al. (1991). "Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5528-32.

- Goldstein, D. R., T. Chang, et al. (2000). "A differential requirement for CD8+ donor cells in the augmentation of allograft survival by posttransplantation administration of donor spleen cells and donor bone marrow cells." Transplantation **70**(7): 1068-73.
- Good, A. H., D. K. Cooper, et al. (1992). "Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans." Transplant Proc **24**(2): 559-62.
- Goodman, D. J., M. Von Albertini, et al. (1996). "Direct activation of porcine endothelial cells by human natural killer cells." Transplantation **61**(5): 763-71.
- Gotter, J., B. Brors, et al. (2004). "Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters." J Exp Med **199**(2): 155-66.
- Gowans, J. L. (1977). "Cellular mediators of allograft immunity." Transplant Proc **9**(1): 685-90.
- Graca, L., S. P. Cobbold, et al. (2002). "Identification of regulatory T cells in tolerated allografts." J Exp Med **195**(12): 1641-6.
- Graca, L., S. Thompson, et al. (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." J Immunol **168**(11): 5558-65.
- Gracie, J. A. and J. A. Bradley (1996). "Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass." Eur J Immunol **26**(6): 1217-21.
- Graf, D., S. Muller, et al. (1995). "A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation." Eur J Immunol **25**(6): 1749-54.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol **16**: 111-35.
- Grewal, I. S., J. Xu, et al. (1995). "Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand." Nature **378**(6557): 617-20.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." Nat Immunol **3**(11): 1097-101.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." Nature **389**(6652): 737-42.
- Guillonneau, C., V. Aubry, et al. (2005). "Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade." Transplantation **80**(2): 255-63.
- Guillot, C., C. Guillonneau, et al. (2002). "Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection." J Immunol **168**(4): 1600-9.
- Guillot, C., P. Mathieu, et al. (2000). "Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression." J Immunol **164**(10): 5258-68.
- Guillot, C., S. Menoret, et al. (2003). "Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig." Blood **101**(8): 3325-33.
- Gur, H., R. Krauthgamer, et al. (2002). "Tolerance induction by megadose hematopoietic progenitor cells: expansion of veto cells by short-term culture of purified human CD34(+) cells." Blood **99**(11): 4174-81.
- Ha, J., A. W. Bingaman, et al. (2001). "Aggressive skin allograft rejection in CD28-/- mice independent of the CD40/CD40L costimulatory pathway." Transpl Immunol **9**(1): 13-7.
- Hancock, W. W., R. Buelow, et al. (1998). "Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes." Nat Med **4**(12): 1392-6.
- Harper, D., B. Gollackner, et al. (2004). "In vitro and in vivo investigation of a novel monoclonal antibody to plasma cells (W5 mAb)." Xenotransplantation **11**(1): 78-90.
- Hasan, R., J. van den Bogaerde, et al. (1992a). "Inhibition of rejection of hamster-to-rat heart xenografts." Transpl Int **5 Suppl 1**: S313-7.
- Hasan, R. I., J. van den Bogaerde, et al. (1992b). "Prolonged survival of hamster to rat heart xenografts with cyclophosphamide therapy." Transplant Proc **24**(2): 517-8.
- Haspot, F., C. Seveno, et al. (2005). "Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR Class II B7 Regulatory Cells." Am J Transplant **5**(10): 2339-48.
- Haspot, F., F. Villemain, et al. (2002). "Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses." Blood **99**(6): 2228-34.
- Hassanain, H. H., S. Y. Chon, et al. (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." J Biol Chem **268**(7): 5077-84.
- Hazama, K., S. Miyagawa, et al. (2005). "The effect of complement regulatory protein expression on pig endothelial cells to porcine endogenous retrovirus lyses by human sera." Transplant Proc **37**(1): 503-5.
- Hecker, J. M., R. Lorenz, et al. (2002). "C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation." Transplantation **73**(5): 688-94.
- Henn, V., J. R. Slupsky, et al. (1998). "CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells." Nature **391**(6667): 591-4.

- Henn, V., S. Steinbach, et al. (2001). "The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40." *Blood* **98**(4): 1047-54.
- Herrera, O. B., D. Golshayan, et al. (2004). "A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells." *J Immunol* **173**(8): 4828-37.
- Hiruma, K., H. Nakamura, et al. (1992). "Clonal deletion of postthymic T cells: veto cells kill precursor cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* **175**(3): 863-8.
- Honjo, K., X. Xu, et al. (2004). "CD4+ T-cell receptor transgenic T cells alone can reject vascularized heart transplants through the indirect pathway of alloantigen recognition." *Transplantation* **77**(3): 452-5.
- Honjo, K., X. Yan Xu, et al. (2004). "Evidence for cooperativity in the rejection of cardiac grafts mediated by CD4 TCR Tg T cells specific for a defined allopeptide." *Am J Transplant* **4**(11): 1762-8.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Hornick, P. I., P. D. Mason, et al. (1998). "Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans." *Circulation* **97**(13): 1257-63.
- Hsu, Y. M., J. Lucci, et al. (1997). "Heteromultimeric complexes of CD40 ligand are present on the cell surface of human T lymphocytes." *J Biol Chem* **272**(2): 911-5.
- Hu, B. T., S. C. Lee, et al. (1997). "Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro." *J Immunol* **159**(3): 1068-71.
- Hua, N., K. Yamashita, et al. (2004). "Gene therapy-mediated CD40L and CD28 co-stimulatory signaling blockade plus transient anti-xenograft antibody suppression induces long-term acceptance of cardiac xenografts." *Transplantation* **78**(10): 1463-70.
- Huang, C. T., C. J. Workman, et al. (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." *Immunity* **21**(4): 503-13.
- Huang, J., P. F. Lo, et al. (2002). "CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9369-73.
- Ierino, F. L., T. Kozlowski, et al. (1998). "Disseminated intravascular coagulation in association with the delayed rejection of pig-to-baboon renal xenografts." *Transplantation* **66**(11): 1439-50.
- Iida, T., H. Ohno, et al. (2000). "Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165**(9): 5062-8.
- Imai, M., K. Takigami, et al. (2000). "Recombinant adenoviral mediated CD39 gene transfer prolongs cardiac xenograft survival." *Transplantation* **70**(6): 864-70.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, et al. (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* **180**(5): 1849-60.
- Irgang, M., I. M. Sauer, et al. (2003). "Porcine endogenous retroviruses: no infection in patients treated with a bioreactor based on porcine liver cells." *J Clin Virol* **28**(2): 141-54.
- Ishida, T., N. Kobayashi, et al. (1995). "CD40 signaling-mediated induction of Bcl-XL, Cdk4, and Cdk6. Implication of their cooperation in selective B cell growth." *J Immunol* **155**(12): 5527-35.
- Itescu, S., P. Kwiatkowski, et al. (1998). "Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period." *Hum Immunol* **59**(5): 275-86.
- Itoh, M., T. Takahashi, et al. (1999). "Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance." *J Immunol* **162**(9): 5317-26.
- Iwakoshi, N. N., J. P. Mordes, et al. (2000). "Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner." *J Immunol* **164**(1): 512-21.
- Iwashima, M., B. A. Irving, et al. (1994). "Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases." *Science* **263**(5150): 1136-9.
- Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." *J Exp Med* **165**(2): 302-19.
- Ji, P., G. Xia, et al. (1999). "Induction of T-independent xenotolerance in a semi-discordant hamster-to-presentation, nude rat model." *Transplantation* **68**(1): 130-6.
- Jiang, S., S. Tugulea, et al. (1998). "Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro." *Hum Immunol* **59**(11): 690-9.
- Jones, N. D., A. Van Maurik, et al. (2000). "CD40-CD40 ligand-independent activation of CD8+ T cells can trigger allograft rejection." *J Immunol* **165**(2): 1111-8.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." *J Exp Med* **196**(2): 255-60.
- Judge, T. A., Z. Wu, et al. (1999). "The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival." *J Immunol* **162**(4): 1947-51.

- Kamano, C., P. A. Vagefi, et al. (2004). "Vascularized thymic lobe transplantation in miniature swine: thymopoiesis and tolerance induction across fully MHC-mismatched barriers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(11): 3827-32.
- Kano, M., H. Bashuda, et al. (1998). "A crucial role of host CD80 and CD86 in rat cardiac xenograft rejection in mice." *Transplantation* **65**(6): 837-43.
- Karim, M., G. Feng, et al. (2005). "CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation." *Blood* **105**(12): 4871-7.
- Karmann, K., C. C. Hughes, et al. (1995). "CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4342-6.
- Karmann, K., W. Min, et al. (1996). "Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1." *J Exp Med* **184**(1): 173-82.
- Katopodis, A. G., R. G. Warner, et al. (2002). "Removal of anti-Galalpha1,3Gal xenoantibodies with an injectable polymer." *J Clin Invest* **110**(12): 1869-77.
- Kawabe, T., T. Naka, et al. (1994). "The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation." *Immunity* **1**(3): 167-78.
- Kawai, T., D. Andrews, et al. (2000). "Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand." *Nat Med* **6**(2): 114.
- Kawai, T., A. B. Cosimi, et al. (1995). "Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys." *Transplantation* **59**(2): 256-62.
- Ke, B., X. D. Shen, et al. (2005). "The CD154-CD40 T-cell co-stimulation pathway in liver ischemia and reperfusion inflammatory responses." *Transplantation* **79**(9): 1078-83.
- Kellersmann, R., A. Kellersmann, et al. (2003). "Comparison of in vivo lymphocyte proliferation between allogeneic and xenogeneic heart transplantation in mice." *Microsurgery* **23**(5): 498-502.
- Kenyon, N. S., M. Chatzipetrou, et al. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8132-7.
- Kenyon, N. S., L. A. Fernandez, et al. (1999). "Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154." *Diabetes* **48**(7): 1473-81.
- Khattri, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." *Nat Immunol* **4**(4): 337-42.
- Kiener, P. A., P. Moran-Davis, et al. (1995). "Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes." *J Immunol* **155**(10): 4917-25.
- Kingsley, C. I., M. Karim, et al. (2002). "CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses." *J Immunol* **168**(3): 1080-6.
- Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." *Nat Med* **5**(6): 686-93.
- Kirk, A. D., D. M. Harlan, et al. (1997). "CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(16): 8789-94.
- Klingenberg, R., F. Autschbach, et al. (2005). "Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8+ T cells in vitro." *Eur J Immunol* **35**(6): 1712-21.
- Koenen, H. J., E. Fasse, et al. (2005). "CD27/CFSE-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory T cells." *J Immunol* **174**(12): 7573-83.
- Koho, H., S. Paulie, et al. (1984). "Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence." *Cancer Immunol Immunother* **17**(3): 165-72.
- Kolber-Simonds, D., L. Lai, et al. (2004). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(19): 7335-40.
- Konieczny, B. T., Z. Dai, et al. (1998). "IFN-gamma is critical for long-term allograft survival induced by blocking the CD28 and CD40 ligand T cell costimulation pathways." *J Immunol* **160**(5): 2059-64.
- Kooyman, D. L., S. B. McClellan, et al. (1996). "Identification and characterization of a galactosyl peptide mimetic. Implications for use in removing xenoreactive anti-A Gal antibodies." *Transplantation* **61**(6): 851-5.
- Kopp, C. W., J. B. Siegel, et al. (1997). "Effect of porcine endothelial tissue factor pathway inhibitor on human coagulation factors." *Transplantation* **63**(5): 749-58.
- Koren, E., F. Milotic, et al. (1996). "Monoclonal antiidiotypic antibodies neutralize cytotoxic effects of anti-alphaGal antibodies." *Transplantation* **62**(6): 837-43.
- Koshiba, T., H. Kitade, et al. (2003). "Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection." *Transplantation* **76**(3): 588-96.

- Koyamada, N., T. Miyatake, et al. (1998). "Transient complement inhibition plus T-cell immunosuppression induces long-term survival of mouse-to-rat cardiac xenografts." *Transplantation* **65**(9): 1210-5.
- Kozlowski, T., F. L. Ierino, et al. (1998). "Depletion of anti-Gal(alpha)1-3Gal antibody in baboons by specific alpha-Gal immunoaffinity columns." *Xenotransplantation* **5**(2): 122-31.
- Kozlowski, T., A. Shimizu, et al. (1999). "Porcine kidney and heart transplantation in baboons undergoing a tolerance induction regimen and antibody adsorption." *Transplantation* **67**(1): 18-30.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002a). "Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion." *J Immunol* **169**(11): 6154-61.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002b). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." *Nat Med* **8**(3): 233-9.
- Kroshus, T. J., R. M. Bolman, 3rd, et al. (1996a). "Selective IgM depletion prolongs organ survival in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation." *Transplantation* **62**(1): 5-12.
- Kroshus, T. J., R. M. Bolman, III, et al. (1996b). "Expression of human CD59 in transgenic pig organs enhances organ survival in an ex vivo xenogeneic perfusion model." *Transplantation* **61**(10): 1513-21.
- Kroshus, T. J., S. A. Rollins, et al. (1995). "Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents acute cardiac tissue injury in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation." *Transplantation* **60**(11): 1194-202.
- Krummel, M. F. and J. P. Allison (1995). "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." *J Exp Med* **182**(2): 459-65.
- Krupnick, A. S., A. E. Gelman, et al. (2005). "Cutting edge: murine vascular endothelium activates and induces the generation of allogeneic CD4+25+Foxp3+ regulatory T cells." *J Immunol* **175**(10): 6265-70.
- Kukreja, A., G. Cost, et al. (2002). "Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes." *J Clin Invest* **109**(1): 131-40.
- Kurtz, J., T. Wekerle, et al. (2004). "Tolerance in mixed chimerism - a role for regulatory cells?" *Trends Immunol* **25**(10): 518-23.
- Kuwaki, K., C. Knosalla, et al. (2004). "Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human anti-human CD154 mAb-based regimen." *Am J Transplant* **4**(3): 363-72.
- Kuwaki, K., Y. L. Tseng, et al. (2005). "Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience." *Nat Med* **11**(1): 29-31.
- Lai, L., D. Kolber-Simonds, et al. (2002). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning." *Science* **295**(5557): 1089-92.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." *Nat Med* **6**(6): 686-8.
- Larsen, C. P., D. Z. Alexander, et al. (1996). "CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway." *Transplantation* **61**(1): 4-9.
- Larsen, C. P., E. T. Elwood, et al. (1996). "Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways." *Nature* **381**(6581): 434-8.
- Larsen, R. D., C. A. Rivera-Marrero, et al. (1990). "Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1,4)-D-GlcNAc alpha(1,3)-galactosyltransferase cDNA." *J Biol Chem* **265**(12): 7055-61.
- Laumonier, T., P. J. Mohacsai, et al. (2004). "Endothelial cell protection by dextran sulfate: a novel strategy to prevent acute vascular rejection in xenotransplantation." *Am J Transplant* **4**(2): 181-7.
- Lechler, R. I. and J. R. Batchelor (1982). "Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient." *J Exp Med* **156**(6): 1835-41.
- Lee, B. P., E. Mansfield, et al. (2005). "Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival." *J Immunol* **174**(8): 4535-44.
- Lee, G. K., H. J. Park, et al. (2002). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." *Immunology* **107**(4): 452-60.
- Lee, K. M., E. Chuang, et al. (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." *Science* **282**(5397): 2263-6.
- Lee, L. A., H. A. Gritsch, et al. (1994). "Specific tolerance across a discordant xenogeneic transplantation barrier." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 10864-7.
- Lee, M. K. t., D. J. Moore, et al. (2004). "Promotion of allograft survival by CD4+CD25+ regulatory T cells: evidence for in vivo inhibition of effector cell proliferation." *J Immunol* **172**(11): 6539-44.
- Lee, R. S., M. J. Grusby, et al. (1994). "Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo." *J Exp Med* **179**(3): 865-72.
- Lee, R. S., K. Yamada, et al. (2001). "Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3276-81.
- Lee, R. S., K. Yamada, et al. (2000). "Blockade of CD28-B7, but not CD40-CD154, prevents costimulation of allogeneic porcine and xenogeneic human anti-porcine T cell responses." *J Immunol* **164**(6): 3434-44.

- Lepault, F. and M. C. Gagnerault (2000). "Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice." *J Immunol* **164**(1): 240-7.
- Leventhal, J. R., A. P. Dalmaso, et al. (1993). "Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement." *Transplantation* **55**(4): 857-65; discussion 865-6.
- Leventhal, J. R., R. John, et al. (1995). "Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoabsorption. Results of in vitro and in vivo studies." *Transplantation* **59**(2): 294-300.
- Leventhal, J. R., A. J. Matas, et al. (1993). "The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model." *Transplantation* **56**(1): 1-8.
- Lexer, G., D. K. Cooper, et al. (1987). "Cardiac transplantation using discordant xenografts in a nonhuman primate model." *Transplant Proc* **19**(1 Pt 2): 1153-4.
- Li, W., X. X. Zheng, et al. (2005). "CTLA4 engagement is required for induction of murine liver transplant spontaneous tolerance." *Am J Transplant* **5**(5): 978-86.
- Li, X. C., Y. Li, et al. (1999). "Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis." *J Immunol* **163**(5): 2500-7.
- Li, Y., E. E. Tredget, et al. (2004). "Cell surface expression of MHC class I antigen is suppressed in indoleamine 2,3-dioxygenase genetically modified keratinocytes: implications in allogeneic skin substitute engraftment." *Hum Immunol* **65**(2): 114-23.
- Liang, X., Z. Chen, et al. (2006). "Regulatory dendritic cells modulate immune responses via induction of T-cell apoptotic death." *Microsurgery* **26**(1): 21-4.
- Liblau, R. S., C. I. Pearson, et al. (1994). "High-dose soluble antigen: peripheral T-cell proliferation or apoptosis." *Immunol Rev* **142**: 193-208.
- Lin, S. S., M. J. Hanaway, et al. (2000). "The role of anti-Galalpha1-3Gal antibodies in acute vascular rejection and accommodation of xenografts." *Transplantation* **70**(12): 1667-74.
- Lin, S. S., B. C. Weidner, et al. (1998). "The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants." *J Clin Invest* **101**(8): 1745-56.
- Lin, Y., J. Goebels, et al. (1998). "Induction of specific transplantation tolerance across xenogeneic barriers in the T-independent immune compartment." *Nat Med* **4**(2): 173-80.
- Lin, Y., M. P. Soares, et al. (1999a). "Rejection of cardiac xenografts by CD4+ or CD8+ T cells." *J Immunol* **162**(2): 1206-14.
- Lin, Y., M. P. Soares, et al. (1999b). "Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts." *J Immunol* **163**(5): 2850-7.
- Lin, Y., M. Vandeputte, et al. (1998a). "Accommodation and T-independent B cell tolerance in rats with long term surviving hamster heart xenografts." *J Immunol* **160**(1): 369-75.
- Lin, Y., M. Vandeputte, et al. (1998b). "Suppression of T-independent IgM xenoantibody formation by leflunomide during xenografting of hamster hearts in rats." *Transplantation* **65**(3): 332-9.
- Linsley, P. S., J. Bradshaw, et al. (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." *Immunity* **4**(6): 535-43.
- Liston, A., S. Lesage, et al. (2003). "Aire regulates negative selection of organ-specific T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 350-4.
- Liu, R., A. La Cava, et al. (2005). "Cooperation of Invariant NKT Cells and CD4+CD25+ T Regulatory Cells in the Prevention of Autoimmune Myasthenia." *J Immunol* **175**(12): 7898-7904.
- Lodge, P. A. and C. E. Haisch (1993). "T cell subset responses to allogeneic endothelium. Proliferation of CD8+ but not CD4+ lymphocytes." *Transplantation* **56**(3): 656-61.
- Loetscher, P., M. Seitz, et al. (1994). "Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes." *Faseb J* **8**(13): 1055-60.
- Loss, M., B. Vangerow, et al. (2000). "Acute vascular rejection is associated with systemic complement activation in a pig-to-primate kidney xenograft model." *Xenotransplantation* **7**(3): 186-96.
- Louis, S., C. Braudeau, et al. (2006). "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." *Transplantation* **81**(3): 398-407.
- Loza, M. J., L. S. Metelitsa, et al. (2002). "NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production." *Eur J Immunol* **32**(12): 3453-62.
- Ludewig, B., V. Henn, et al. (1996). "Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells." *Eur J Immunol* **26**(12): 3137-43.
- Luo, Z., M. Gotoh, et al. (2000). "Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts." *Transplantation* **69**(10): 2144-8.
- Macchiarini, P., R. Oriol, et al. (1998). "Evidence of human non-alpha-galactosyl antibodies involved in the hyperacute rejection of pig lungs and their removal by pig organ perfusion." *J Thorac Cardiovasc Surg* **116**(5): 831-43.
- Macian, F., F. Garcia-Cozar, et al. (2002). "Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance." *Cell* **109**(6): 719-31.

- Magee, J. C., B. H. Collins, et al. (1995). "Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation." *J Clin Invest* **96**(5): 2404-12.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, et al. (1999). "Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo." *J Leukoc Biol* **66**(2): 242-6.
- Manavalan, J. S., S. Kim-Schulze, et al. (2004). "Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity." *Int Immunol* **16**(8): 1055-68.
- Manavalan, J. S., P. C. Rossi, et al. (2003). "High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 245-58.
- Mandelbrot, D. A., A. J. McAdam, et al. (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." *J Exp Med* **189**(2): 435-40.
- Mandelbrot, D. A., M. A. Oosterwegel, et al. (2001). "B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4." *J Clin Invest* **107**(7): 881-7.
- Marengere, L. E., P. Waterhouse, et al. (1996). "Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4." *Science* **272**(5265): 1170-3.
- Martin, C., M. Plat, et al. (2005). "Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation." *Transgenic Res* **14**(4): 373-84.
- Martin, M., H. Schneider, et al. (2001). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function." *J Exp Med* **194**(11): 1675-81.
- Mazzei, G. J., M. D. Edgerton, et al. (1995). "Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active." *J Biol Chem* **270**(13): 7025-8.
- McAdam, A. J., A. N. Schweitzer, et al. (1998). "The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells." *Immunol Rev* **165**: 231-47.
- McCurry, K. R., D. L. Kooyman, et al. (1995). "Transgenic expression of human complement regulatory proteins in mice results in diminished complement deposition during organ xenoperfusion." *Transplantation* **59**(8): 1177-82.
- Medawar, P. B. (1961). "Immunological tolerance." *Nature* **189**: 14-7.
- Mellor, A. L., P. Chandler, et al. (2004). "Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase." *Int Immunol* **16**(10): 1391-401.
- Mendicino, M., M. Liu, et al. (2005). "Targeted deletion of Fgl-2/fibroleukin in the donor modulates immunologic response and acute vascular rejection in cardiac xenografts." *Circulation* **112**(2): 248-56.
- Miller, R. G. (1980). "An immunological suppressor cell inactivating cytotoxic T-lymphocyte precursor cells recognizing it." *Nature* **287**(5782): 544-6.
- Miyagawa, S., H. Hirose, et al. (1988). "The mechanism of discordant xenograft rejection." *Transplantation* **46**(6): 825-30.
- Miyagawa, S., H. Murakami, et al. (2001). "Remodeling of the major pig xenoantigen by N-acetylglucosaminyltransferase III in transgenic pig." *J Biol Chem* **276**(42): 39310-9.
- Miyamoto, K., S. Miyake, et al. (2001). "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells." *Nature* **413**(6855): 531-4.
- Miyatake, T., N. Koyamada, et al. (1998). "Survival of accommodated cardiac xenografts upon retransplantation into cyclosporine-treated recipients." *Transplantation* **65**(12): 1563-9.
- Moscoso, I., M. Hermida-Prieto, et al. (2005). "Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in pig-to-baboon xenotransplantation with sustained depletion of anti-alphagal antibodies." *Transplantation* **79**(7): 777-82.
- Moses, R. D., H. J. Winn, et al. (1992). "Evidence that multiple defects in cell-surface molecule interactions across species differences are responsible for diminished xenogeneic T cell responses." *Transplantation* **53**(1): 203-9.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-57.
- Mueller, N. J., K. Kuwaki, et al. (2004). "Reduction of consumptive coagulopathy using porcine cytomegalovirus-free cardiac porcine grafts in pig-to-primate xenotransplantation." *Transplantation* **78**(10): 1449-53.
- Munn, D. H., E. Shafizadeh, et al. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Muraoka, S. and R. G. Miller (1980). "Cells in bone marrow and in T cell colonies grown from bone marrow can suppress generation of cytotoxic T lymphocytes directed against their self antigens." *J Exp Med* **152**(1): 54-71.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." *Nat Rev Immunol* **2**(12): 933-44.

- Nagasaka, T., T. Kobayashi, et al. (1997). "alpha-Galactosyl oligosaccharides conjugated with polyethylene glycol as potential inhibitors of hyperacute rejection upon xenotransplantation." Biochem Biophys Res Commun **232**(3): 731-6.
- Nagatani, K., M. Dohi, et al. (2006). "Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma." J Immunol **176**(3): 1481-9.
- Nasr, I. W., Y. Wang, et al. (2005). "Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells." J Immunol **174**(10): 6161-8.
- Neethling, F. A., E. Koren, et al. (1994a). "Immunoabsorption of natural antibodies from human serum by affinity chromatography using specific carbohydrates protects pig cells from cytotoxic destruction." Transplant Proc **26**(3): 1378.
- Neethling, F. A., E. Koren, et al. (1994b). "Protection of pig kidney (PK15) cells from the cytotoxic effect of anti-pig antibodies by alpha-galactosyl oligosaccharides." Transplantation **57**(6): 959-63.
- Niimi, M., N. Shirasugi, et al. (2001). "Oral antigen induces allograft survival by linked suppression via the indirect pathway." Transplant Proc **33**(1-2): 81.
- Nikolic, B., H. Lei, et al. (1998). "Role of intrathymic rat class II+ cells in maintaining deletional tolerance in xenogeneic rat->mouse bone marrow chimeras." Transplantation **65**(9): 1216-24.
- Nishizuka, Y. and T. Sakakura (1969). "Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice." Science **166**(906): 753-5.
- Oh, S. I., I. W. Kim, et al. (2001). "Correlation of Fas and Fas ligand expression with rejection status of transplanted heart in human." Transplantation **71**(7): 906-9.
- Ohdan, H., Y. G. Yang, et al. (1999). "Mixed chimerism induced without lethal conditioning prevents T cell- and anti-Gal alpha 1,3Gal-mediated graft rejection." J Clin Invest **104**(3): 281-90.
- Ohdan, H., Y. G. Yang, et al. (2001). "T cell and B cell tolerance to GALalpha1,3GAL-expressing heart xenografts is achieved in alpha1,3-galactosyltransferase-deficient mice by nonmyeloablative induction of mixed chimerism." Transplantation **71**(11): 1532-42.
- Ono, K. and E. S. Lindsey (1969). "Improved technique of heart transplantation in rats." J Thorac Cardiovasc Surg **57**(2): 225-9.
- Onodera, K., H. D. Volk, et al. (1998). "Thymus requirement and antigen dependency in the "infectious" tolerance pathway in transplant recipients." J Immunol **160**(12): 5765-72.
- Oriol, R., Y. Ye, et al. (1993). "Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation." Transplantation **56**(6): 1433-42.
- Paliard, X., R. de Waal Malefijt, et al. (1988). "Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones." J Immunol **141**(3): 849-55.
- Palmetshofer, A., U. Galili, et al. (1998). "Alpha-galactosyl epitope-mediated activation of porcine aortic endothelial cells: type II activation." Transplantation **65**(7): 971-8.
- Palomar, R., M. Lopez-Hoyos, et al. (2005). "Impact of HLA antibodies on transplant glomerulopathy." Transplant Proc **37**(9): 3830-2.
- Paradis, K., G. Langford, et al. (1999). "Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group." Science **285**(5431): 1236-41.
- Pareti, F. I., M. Mazzucato, et al. (1992). "Interaction of porcine von Willebrand factor with the platelet glycoproteins Ib and IIb/IIIa complex." Br J Haematol **82**(1): 81-6.
- Parker, D. C., D. L. Greiner, et al. (1995). "Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9560-4.
- Parker, W., D. Bruno, et al. (1994). "Characterization and affinity isolation of xenoreactive human natural antibodies." J Immunol **153**(8): 3791-803.
- Phelps, C. J., C. Koike, et al. (2003). "Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs." Science **299**(5605): 411-4.
- Pioli, C., L. Gatta, et al. (1999). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) inhibits CD28-induced I kappa Balpha degradation and RelA activation." Eur J Immunol **29**(3): 856-63.
- Pirenne, J., H. Kitade, et al. (2005). "Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion." Transplantation **79**(3 Suppl): S25-7.
- Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, et al. (2003). "CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells." Blood **101**(1): 202-9.
- Platt, J. L., A. P. Dalmaso, et al. (1991). "The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells." Eur J Immunol **21**(11): 2887-90.
- Platt, J. L., R. J. Fischel, et al. (1991). "Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model." Transplantation **52**(2): 214-20.
- Platt, J. L., B. J. Lindman, et al. (1991). "The role of natural antibodies in the activation of xenogenic endothelial cells." Transplantation **52**(6): 1037-43.

- Platt, J. L., G. M. Vercellotti, et al. (1990a). "Transplantation of discordant xenografts: a review of progress." *Immunol Today* **11**(12): 450-6; discussion 456-7.
- Platt, J. L., G. M. Vercellotti, et al. (1990b). "Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection." *J Exp Med* **171**(4): 1363-8.
- Popma, S., W. Y. Szeto, et al. (2001). "The TCR repertoire of proliferating T cells is restricted by immunodominant antigens in the direct human anti-pig pathway." *J Heart Lung Transplant* **20**(2): 215.
- Popma, S. H., A. M. Krasinskas, et al. (2001). "Simultaneous blockade of B7-CD28 and CD40-CD40L costimulation eliminates the direct xenorestricted human anti-porcine T-cell response." *Transplant Proc* **33**(1-2): 767-9.
- Preston, E. H., H. Xu, et al. (2005). "IDEC-131 (anti-CD154), sirolimus and donor-specific transfusion facilitate operational tolerance in non-human primates." *Am J Transplant* **5**(5): 1032-41.
- Priatel, J. J., O. Utting, et al. (2001). "TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells." *J Immunol* **167**(11): 6188-94.
- Pruitt, S. K., W. M. Baldwin, 3rd, et al. (1993). "The effect of xenoreactive antibody and B cell depletion on hyperacute rejection of guinea pig-to-rat cardiac xenografts." *Transplantation* **56**(6): 1318-24.
- Pruitt, S. K., R. R. Bollinger, et al. (1997). "Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts." *Transplantation* **63**(6): 900-2.
- Pullen, S. S., H. G. Miller, et al. (1998). "CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization." *Biochemistry* **37**(34): 11836-45.
- Qin, L., K. D. Chavin, et al. (1996). "Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival." *J Immunol* **156**(6): 2316-23.
- Rahimi, S., Z. Qian, et al. (2004). "Non-complement- and complement-activating antibodies synergize to cause rejection of cardiac allografts." *Am J Transplant* **4**(3): 326-34.
- Raisanen-Sokolowski, A., P. L. Mottram, et al. (1997). "Heart transplants in interferon-gamma, interleukin 4, and interleukin 10 knockout mice. Recipient environment alters graft rejection." *J Clin Invest* **100**(10): 2449-56.
- Ranger, A. M., M. P. Das, et al. (1996). "B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells." *Int Immunol* **8**(10): 1549-60.
- Read, S., V. Malmstrom, et al. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* **192**(2): 295-302.
- Reemtsma, K., B. H. McCracken, et al. (1964). "Heterotransplantation of the Kidney: Two Clinical Experiences." *Science* **143**: 700-2.
- Reich-Zeliger, S., Y. Zhao, et al. (2000). "Anti-third party CD8+ CTLs as potent veto cells: coexpression of CD8 and FasL is a prerequisite." *Immunity* **13**(4): 507-15.
- Reiser, J. B., C. Darnault, et al. (2000). "Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule." *Nat Immunol* **1**(4): 291-7.
- Reisner, Y., H. Gur, et al. (2003). "Hematopoietic stem cell transplantation across major genetic barriers: tolerance induction by megadose CD34 cells and other veto cells." *Ann N Y Acad Sci* **996**: 72-9.
- Renshaw, B. R., W. C. Fanslow, 3rd, et al. (1994). "Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice." *J Exp Med* **180**(5): 1889-900.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, et al. (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* **393**(6684): 474-8.
- Rifle, G., C. Mousson, et al. (2005). "Donor-specific antibodies in allograft rejection: clinical and experimental data." *Transplantation* **79**(3 Suppl): S14-8.
- Robson, S. C., V. K. Young, et al. (1996). "Thrombin inhibition in an ex vivo model of porcine heart xenograft hyperacute rejection." *Transplantation* **61**(6): 862-8.
- Rochford, R., J. E. Riggs, et al. (2004). "Differential effects of CD28 costimulation upon cytokine production by CD4+ and CD8+ T cells." *Immunobiology* **209**(7): 513-22.
- Rogers, N. J., I. M. Jackson, et al. (2003). "Cross-species costimulation: relative contributions of CD80, CD86, and CD40." *Transplantation* **75**(12): 2068-76.
- Romano, E., F. A. Neethling, et al. (1999). "Intravenous synthetic alphaGal saccharides delay hyperacute rejection following pig-to-baboon heart transplantation." *Xenotransplantation* **6**(1): 36-42.
- Roos, A., M. Essers, et al. (2001). "Both IgG and IgM anti-pig antibodies induce complement activation and cytotoxicity." *Xenotransplantation* **8**(1): 3-14.
- Rouhani, F. J., F. J. Dor, et al. (2004). "Investigation of red blood cells from alpha1,3-galactosyltransferase-knockout pigs for human blood transfusion." *Transfusion* **44**(7): 1004-12.
- Saadi, S. and J. L. Platt (1995). "Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement." *J Exp Med* **181**(1): 21-31.
- Sablinski, T., D. W. Emery, et al. (1999). "Long-term discordant xenogeneic (porcine-to-primate) bone marrow engraftment in a monkey treated with porcine-specific growth factors." *Transplantation* **67**(7): 972-7.

- Sad, S., R. Marcotte, et al. (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." *Immunity* **2**(3): 271-9.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (2001). "Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance." *Immunol Rev* **182**: 18-32.
- Sakurai, K., J. P. Zou, et al. (2002). "Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **129**(1-2): 186-96.
- Salveti, A., S. Orevé, et al. (1998). "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." *Hum Gene Ther* **9**(5): 695-706.
- Sambhara, S. R. and R. G. Miller (1991). "Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the alpha 3 domain of class I MHC." *Science* **252**(5011): 1424-7.
- Sambhara, S. R. and R. G. Miller (1994). "Reduction of CTL antipeptide response mediated by CD8+ cells whose class I MHC can bind the peptide." *J Immunol* **152**(3): 1103-9.
- Saoudi, A., I. Bernard, et al. (1999). "Polarization toward the T-helper(Th)1 type immune response is not required for rat experimental autoimmune myasthenia gravis." *Transplant Proc* **31**(3): 1604-5.
- Sarantopoulos, S., L. Lu, et al. (2004). "Qa-1 restriction of CD8+ suppressor T cells." *J Clin Invest* **114**(9): 1218-21.
- Sato, K., J. Balla, et al. (2001). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants." *J Immunol* **166**(6): 4185-94.
- Sato, K., K. Takigami, et al. (1999). "Suppression of delayed xenograft rejection by specific depletion of elicited antibodies of the IgM isotype." *Transplantation* **68**(6): 844-54.
- Sawitzki, B., M. Lehmann, et al. (2001). "Regulatory tolerance-mediating T cells in transplantation tolerance." *Transplant Proc* **33**(3): 2092-3.
- Schaapherder, A. F., M. R. Daha, et al. (1994). "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera." *Transplantation* **57**(9): 1376-82.
- Schall, T. J., K. Bacon, et al. (1990). "Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES." *Nature* **347**(6294): 669-71.
- Scheipers, P. and H. Reiser (1998). "Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(17): 10083-8.
- Schmidt, J., K. Elflein, et al. (2003). "Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies." *J Neuroimmunol* **140**(1-2): 143-52.
- Schmoeckel, M., F. N. Bhatti, et al. (1998). "Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model." *Transplantation* **65**(12): 1570-7.
- Schmoeckel, M., G. Nollert, et al. (1996). "Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts." *Transplantation* **62**(6): 729-34.
- Schneider, H., K. V. Prasad, et al. (1995). "CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells." *J Exp Med* **181**(1): 351-5.
- Schroeder, C., J. S. Allan, et al. (2005). "Hyperacute rejection is attenuated in GalT knockout swine lungs perfused ex vivo with human blood." *Transplant Proc* **37**(1): 512-3.
- Sebille, F., S. Brouard, et al. (2003). "Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation." *Transplantation* **75**(2): 169-72.
- Sebille, F., M. Guillet, et al. (2001). "T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response." *Am J Transplant* **1**(1): 21-8.
- Seddon, B. and D. Mason (1999). "Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes." *J Exp Med* **189**(2): 279-88.
- Seebach, J. D., C. Comrack, et al. (1997). "HLA-Cw3 expression on porcine endothelial cells protects against xenogeneic cytotoxicity mediated by a subset of human NK cells." *J Immunol* **159**(7): 3655-61.
- Seino, K. I., K. Fukao, et al. (2001). "Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2577-81.
- Selvan, R. S., H. B. Kapadia, et al. (1998). "Complement-induced expression of chemokine genes in endothelium: regulation by IL-1-dependent and -independent mechanisms." *J Immunol* **161**(8): 4388-95.
- Semiletova, N. V., X. D. Shen, et al. (2005a). "Inhibition of chronic rejection by antibody induced vascular accommodation in fully allogeneic heart allografts." *Transplantation* **80**(11): 1535-40.

- Semiletova, N. V., X. D. Shen, et al. (2005b). "Donor MHC class I peptides in conjunction with self-epitopes induce donor-specific tolerance in a dose-dependent manner but unable to abrogate chronic rejection." *Transplant Proc* **37**(4): 1937-9.
- Serra, P., A. Amrani, et al. (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." *Immunity* **19**(6): 877-89.
- Seveno, C., M. Fellous, et al. (2005). "[On the acceptability of xenografts]." *Med Sci (Paris)* **21**(3): 302-8.
- Sharabi, Y., I. Aksentijevich, et al. (1990). "Specific tolerance induction across a xenogeneic barrier: production of mixed rat/mouse lymphohematopoietic chimeras using a nonlethal preparative regimen." *J Exp Med* **172**(1): 195-202.
- Sharma, A., J. Okabe, et al. (1996). "Reduction in the level of Gal(alpha1,3)Gal in transgenic mice and pigs by the expression of an alpha(1,2)fucosyltransferase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(14): 7190-5.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 389-400.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* **3**(2): 135-42.
- Shimizu, K., U. Schonbeck, et al. (2000). "Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis." *J Immunol* **165**(6): 3506-18.
- Shiratori, T., S. Miyatake, et al. (1997). "Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2." *Immunity* **6**(5): 583-9.
- Sho, M., S. E. Sandner, et al. (2002). "New insights into the interactions between T-cell costimulatory blockade and conventional immunosuppressive drugs." *Ann Surg* **236**(5): 667-75.
- Simon, P. M., F. A. Neethling, et al. (1998). "Intravenous infusion of Galalpha1-3Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine heart xenografts." *Transplantation* **65**(3): 346-53.
- Sindhi, R., J. S. Manavalan, et al. (2005). "Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8+CD28- T-suppressor cells." *Hum Immunol* **66**(3): 252-7.
- Singh, N. P., L. Guo, et al. (2004). "Blockade of indirect recognition mediated by CD4+ T cells leads to prolonged cardiac xenograft survival." *Xenotransplantation* **11**(1): 33-42.
- Sloan-Lancaster, J., T. H. Steinberg, et al. (1996). "Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands." *J Exp Med* **184**(4): 1525-30.
- Smith, K. M., D. C. Olson, et al. (1997). "Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance." *Int Immunol* **9**(9): 1355-65.
- Soares, M. P., Y. Lin, et al. (1998). "Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival." *Nat Med* **4**(9): 1073-7.
- Somerville, C. A., A. G. Kyriazis, et al. (1994). "Functional expression of human CD59 in transgenic mice." *Transplantation* **58**(12): 1430-5.
- Sonoda, K. H., D. E. Faunce, et al. (2001). "NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance." *J Immunol* **166**(1): 42-50.
- Spitzer, T. R., F. Delmonico, et al. (1999). "Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism." *Transplantation* **68**(4): 480-4.
- Stamper, C. C., Y. Zhang, et al. (2001). "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses." *Nature* **410**(6828): 608-11.
- Stassen, M., S. Fondel, et al. (2004). "Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells." *Eur J Immunol* **34**(5): 1303-11.
- Stephens, L. A. and D. Mason (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." *J Immunol* **165**(6): 3105-10.
- Storck, M., D. Abendroth, et al. (1997). "Morphology of hDAF (CD55) transgenic pig kidneys following ex-vivo hemoperfusion with human blood." *Transplantation* **63**(2): 304-10.
- Stout, R. D., J. Suttles, et al. (1996). "Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice." *J Immunol* **156**(1): 8-11.
- Suciu-Foca, N., J. S. Manavalan, et al. (2003). "Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 235-44.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Sutton, V. R., J. E. Davis, et al. (2000). "Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation." *J Exp Med* **192**(10): 1403-14.

- Swain, S. L., A. D. Weinberg, et al. (1990). "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." *J Immunol* **145**(11): 3796-806.
- Szanya, V., J. Ermann, et al. (2002). "The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7." *J Immunol* **169**(5): 2461-5.
- Szot, G. L., P. Zhou, et al. (2001). "Different mechanisms of cardiac allograft rejection in wildtype and CD28-deficient mice." *Am J Transplant* **1**(1): 38-46.
- Szot, G. L., P. Zhou, et al. (2000). "Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival." *Transplantation* **69**(5): 904-9.
- Tacke, M., G. J. Clark, et al. (1995). "Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester." *J Immunol* **154**(10): 5121-7.
- Tadaki, D. K., N. Craighead, et al. (2000). "Costimulatory molecules are active in the human xenoreactive T-cell response but not in natural killer-mediated cytotoxicity." *Transplantation* **70**(1): 162-7.
- Tai, X., M. Cowan, et al. (2005). "CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2." *Nat Immunol* **6**(2): 152-62.
- Takahagi, Y., T. Fujimura, et al. (2005). "Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III." *Mol Reprod Dev* **71**(3): 331-8.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, et al. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." *Int Immunol* **10**(12): 1969-80.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." *J Exp Med* **192**(2): 303-10.
- Talmage, D. W., G. Dart, et al. (1976). "Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection." *Science* **191**(4225): 385-8.
- Tam, Y. K., J. A. Martinson, et al. (2003). "Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy." *Cytotherapy* **5**(3): 259-72.
- Tanemura, M., S. Miyagawa, et al. (1998). "Reduction of the major swine xenoantigen, the alpha-galactosyl epitope by transfection of the alpha2,3-sialyltransferase gene." *J Biol Chem* **273**(26): 16421-5.
- Tanemura, M., D. Yin, et al. (2000). "Differential immune responses to alpha-gal epitopes on xenografts and allografts: implications for accommodation in xenotransplantation." *J Clin Invest* **105**(3): 301-10.
- Tang, Q., E. K. Boden, et al. (2004). "Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function." *Eur J Immunol* **34**(11): 2996-3005.
- Tang, Q., K. J. Henriksen, et al. (2003). "Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **171**(7): 3348-52.
- Taniguchi, S., F. A. Neethling, et al. (1996). "In vivo immunoadsorption of antipig antibodies in baboons using a specific Gal(alpha)1-3Gal column." *Transplantation* **62**(10): 1379-84.
- Taylor, M. W. and G. S. Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." *Faseb J* **5**(11): 2516-22.
- Taylor, P. A., C. J. Lees, et al. (2002). "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality." *Blood* **99**(10): 3493-9.
- Taylor, P. A., R. J. Noelle, et al. (2001). "CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade." *J Exp Med* **193**(11): 1311-8.
- Teague, R. M., B. D. Sather, et al. (2006). "Interleukin-15 rescues tolerant CD8(+) T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors." *Nat Med*.
- Tellides, G., D. A. Tereb, et al. (2000). "Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes." *Nature* **403**(6766): 207-11.
- Teranishi, K., B. Gollackner, et al. (2002). "Depletion of anti-gal antibodies in baboons by intravenous therapy with bovine serum albumin conjugated to gal oligosaccharides." *Transplantation* **73**(1): 129-39.
- Terness, P., T. M. Bauer, et al. (2002). "Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites." *J Exp Med* **196**(4): 447-57.
- Thiel, M. A., J. U. Steiger, et al. (2005). "Local or short-term systemic costimulatory molecule blockade prolongs rat corneal allograft survival." *Clin Experiment Ophthalmol* **33**(2): 176-80.
- Thomas, J. M., F. M. Carver, et al. (1991). "Kidney allograft tolerance in primates without chronic immunosuppression--the role of veto cells." *Transplantation* **51**(1): 198-207.
- Thompson, C. B., T. Lindsten, et al. (1989). "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(4): 1333-7.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* **188**(2): 287-96.

- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol* **164**(1): 183-90.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* **3**(5): 541-7.
- Trapani, J. A., J. Davis, et al. (2000). "Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo." *Curr Opin Immunol* **12**(3): 323-9.
- Tseng, Y. L., F. J. Dor, et al. (2004). "Bone marrow transplantation from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons." *Xenotransplantation* **11**(4): 361-70.
- Valujskikh, A., O. Lantz, et al. (2002). "Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway." *Nat Immunol* **3**(9): 844-51.
- van den Berg, C. W., C. Rix, et al. (2000). "Role and regulation of pig CD59 and membrane cofactor protein/CD46 expressed on pig aortic endothelial cells." *Transplantation* **70**(4): 667-73.
- van den Brink, M. R., L. E. Hunt, et al. (1990). "In vivo treatment with monoclonal antibody 3.2.3 selectively eliminates natural killer cells in rats." *J Exp Med* **171**(1): 197-210.
- van Denderen, B. J., M. J. Pearse, et al. (1996). "Decay-accelerating factor transgenic mouse hearts are protected from human complement-mediated attack." *Transplant Proc* **28**(2): 583-4.
- van Denderen, B. J., E. Salvaris, et al. (1997). "Combination of decay-accelerating factor expression and alpha1,3-galactosyltransferase knockout affords added protection from human complement-mediated injury." *Transplantation* **64**(6): 882-8.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (1997). "Functional role of CD40 and its ligand." *Int Arch Allergy Immunol* **113**(4): 393-9.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." *J Leukoc Biol* **67**(1): 2-17.
- van Rooijen, N., A. Sanders, et al. (1996). "Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine." *J Immunol Methods* **193**(1): 93-9.
- van Wissen, M., M. Snoek, et al. (2002). "IFN-gamma amplifies IL-6 and IL-8 responses by airway epithelial-like cells via indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Immunol* **169**(12): 7039-44.
- VanBuskirk, A. M., W. J. Burlingham, et al. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." *J Clin Invest* **106**(1): 145-55.
- Vandenbergh, P., J. Delabie, et al. (1993). "In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study." *Int Immunol* **5**(3): 317-21.
- Vangerow, B., J. M. Hecker, et al. (2001). "C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys." *Xenotransplantation* **8**(4): 266-72.
- Vanhove, B. and F. H. Bach (1993). "Human xenoreactive natural antibodies--avidity and targets on porcine endothelial cells." *Transplantation* **56**(5): 1251-3.
- Vanhove, B., B. Charreau, et al. (1998). "Intracellular expression in pig cells of anti-alpha1,3galactosyltransferase single-chain Fv antibodies reduces Gal alpha1,3Gal expression and inhibits cytotoxicity mediated by anti-Gal xenoantibodies." *Transplantation* **66**(11): 1477-85.
- Vanhove B, d. M. R., Lipp J, Bach FH (1994). "Human xenoreactive natural antibodies of the IgM isotype activate pig endothelial cells." *Xenotransplantation* **1**: 17-23.
- Vanhove, B., G. Laflamme, et al. (2003). "Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody." *Blood* **102**(2): 564-70.
- Vella, A. T., T. Mitchell, et al. (1997). "CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo." *J Immunol* **158**(10): 4714-20.
- Vendetti, S., J. G. Chai, et al. (2000). "Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells." *J Immunol* **165**(3): 1175-81.
- Venuprasad, K., P. Parab, et al. (2001). "Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression." *Eur J Immunol* **31**(5): 1536-43.
- Vercellotti, G. M., J. L. Platt, et al. (1991). "Neutrophil adhesion to xenogeneic endothelium via iC3b." *J Immunol* **146**(2): 730-4.
- Vetr, H. and J. Lipp (1996). "Tumor necrosis factor-induced expression of porcine glycoproteins gp65 and gp100 recognized by human xenoreactive natural antibodies." *Transplantation* **62**(3): 396-402.
- Vieira, P. L., J. R. Christensen, et al. (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol* **172**(10): 5986-93.
- Vincent, M. S., J. E. Gumperz, et al. (2003). "Understanding the function of CD1-restricted T cells." *Nat Immunol* **4**(6): 517-23.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." *Science* **273**(5271): 104-6.
- Viola, A., S. Schroeder, et al. (1999). "T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains." *Science* **283**(5402): 680-2.

- Vogel, C. W., D. C. Fritzing, et al. (2004). "Recombinant cobra venom factor." *Mol Immunol* **41**(2-3): 191-9.
- Wakkach, A., N. Fournier, et al. (2003). "Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo." *Immunity* **18**(5): 605-17.
- Waldmann, H., S. P. Cobbold, et al. (2001). "Therapeutic aspects of tolerance." *Curr Opin Pharmacol* **1**(4): 392-7.
- Walsh, P. T., D. K. Taylor, et al. (2004). "Tregs and transplantation tolerance." *J Clin Invest* **114**(10): 1398-403.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, et al. (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* **1**(5): 405-13.
- Wang, G. Q., E. Wieckowski, et al. (2001). "Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells." *J Exp Med* **194**(9): 1325-37.
- Wang, H., K. A. Hosiawa, et al. (2003). "Treatment with a short course of LF 15-0195 and continuous cyclosporin A attenuates acute xenograft rejection in a rat-to-mouse cardiac transplantation model." *Xenotransplantation* **10**(4): 325-36.
- Wasowska, B. A., Z. Qian, et al. (2001). "Passive transfer of alloantibodies restores acute cardiac rejection in IgKO mice." *Transplantation* **71**(6): 727-36.
- Watanabe, T., T. Miyatake, et al. (2004). "Adenovirus-mediated CTLA4 immunoglobulin G gene therapy in cardiac xenotransplantation." *Transplant Proc* **36**(8): 2478-9.
- Waterworth, P. D., E. Cozzi, et al. (1997). "Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy." *Transplant Proc* **29**(1-2): 899-900.
- Waterworth, P. D., J. Dunning, et al. (1998). "Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation." *J Heart Lung Transplant* **17**(12): 1201-7.
- Weisman, H. F., T. Bartow, et al. (1990). "Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium." *Trans Assoc Am Physicians* **103**: 64-72.
- Welsh, K. I., J. R. Batchelor, et al. (1979). "Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. II. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys from AS primary recipients into (AS X WF)F1 secondary hosts." *J Exp Med* **150**(3): 465-70.
- Wever, P. C., J. G. Boonstra, et al. (1998). "Mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity in acute renal allograft rejection." *Transplantation* **66**(2): 259-64.
- Wilson, S. B. and T. L. Delovitch (2003). "Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumour immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(3): 211-22.
- Wing, K., A. Ekmark, et al. (2002). "Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood." *Immunology* **106**(2): 190-9.
- Winkler, M. E., M. Winkler, et al. (2005). "Analysis of pig-to-human porcine endogenous retrovirus transmission in a triple-species kidney xenotransplantation model." *Transpl Int* **17**(12): 848-58.
- Wise, M. P., F. Bemelman, et al. (1998). "Linked suppression of skin graft rejection can operate through indirect recognition." *J Immunol* **161**(11): 5813-6.
- Woerly, G., N. Roger, et al. (1999). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." *J Exp Med* **190**(4): 487-95.
- Wu, A., N. F. Esnaola, et al. (1999). "Xenogeneic thymic transplantation in a pig-to-nonhuman primate model." *Transplant Proc* **31**(1-2): 957.
- Wu, G., S. Pfeiffer, et al. (2005). "Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft." *Xenotransplantation* **12**(3): 197-208.
- Wu, G. D., G. Fujii, et al. (1999). "Failure of anti-Forssman antibodies to induce rejection of mouse heart xenografts." *Xenotransplantation* **6**(2): 90-7.
- Wulfing, C. and M. M. Davis (1998). "A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation." *Science* **282**(5397): 2266-9.
- Xia, G., J. Goebels, et al. (2001). "Transplantation tolerance and autoimmunity after xenogeneic thymus transplantation." *J Immunol* **166**(3): 1843-54.
- Xia, G., P. Ji, et al. (2000). "Natural killer cell- and macrophage mediated discordant guinea pig-->rat xenograft rejection in the absence of complement, xenoantibody and T cell immunity." *Transplantation* **70**(1): 86-93.
- Xystrakis, E., A. S. Dejean, et al. (2004). "Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation." *Blood* **104**(10): 3294-301.
- Yamada, A., A. Chandraker, et al. (2001). "Recipient MHC class II expression is required to achieve long-term survival of murine cardiac allografts after costimulatory blockade." *J Immunol* **167**(10): 5522-6.
- Yamada, K., A. Shimizu, et al. (1999). "Thymic transplantation in miniature swine. I. Development and function of the "thymokidney"." *Transplantation* **68**(11): 1684-92.
- Yamada, K., K. Yazawa, et al. (2005). "Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue." *Nat Med* **11**(1): 32-4.

- Yamashita, K., T. Masunaga, et al. (2003). "Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40Ig plus CTLA4Ig gene therapies." *Transplantation* **76**(7): 1089-96.
- Yan, Y., E. Verbeken, et al. (2005). "Effects of a short course of leflunomide on T-independent B-lymphocyte xenoreactivity and on susceptibility of xenografts to acute or chronic rejection." *Transplantation* **79**(2): 135-41; discussion 133-4.
- Yang, Y. and J. M. Wilson (1996). "CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40." *Science* **273**(5283): 1862-4.
- Yang, Y. G., J. C. Wood, et al. (2004). "Mouse retrovirus mediates porcine endogenous retrovirus transmission into human cells in long-term human-porcine chimeric mice." *J Clin Invest* **114**(5): 695-700.
- Ye, Y., F. A. Neethling, et al. (1994). "Evidence that intravenously administered alpha-galactosyl carbohydrates reduce baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells (PK15) and transplanted pig hearts." *Transplantation* **58**(3): 330-7.
- Yellin, M. J., S. Winikoff, et al. (1995). "Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) up-regulation and IL-6 production and proliferation." *J Leukoc Biol* **58**(2): 209-16.
- Yin, D., L. Ma, et al. (2002). "CTLA-4Ig in combination with anti-CD40L prolongs xenograft survival and inhibits anti-gal ab production in GT-Ko mice." *Am J Transplant* **2**(1): 41-7.
- Young, K. J., B. DuTemple, et al. (2003). "Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells." *J Immunol* **171**(1): 134-41.
- Yu, P., L. Zhang, et al. (2005). "Long-term effects on HEK-293 cell line after co-culture with porcine endogenous retrovirus." *Transplant Proc* **37**(1): 496-9.
- Yu, Z. and V. A. Lennon (1999). "Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases." *N Engl J Med* **340**(3): 227-8.
- Zaidi, A., M. Schmoekel, et al. (1998). "Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors." *Transplantation* **65**(12): 1584-90.
- Zhai, Y., L. Meng, et al. (2003). "Activation of alloreactive CD8+ T cells operates via CD4-dependent and CD4-independent mechanisms and is CD154 blockade sensitive." *J Immunol* **170**(6): 3024-8.
- Zhang, L., P. Yu, et al. (2005). "Porcine endogenous retrovirus transmission from pig cell line to mouse tissues but not human cells in nude mice." *Transplant Proc* **37**(1): 493-5.
- Zhang, X., S. Sun, et al. (1998). "Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15." *Immunity* **8**(5): 591-9.
- Zhang, Y. and J. P. Allison (1997). "Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(17): 9273-8.
- Zhang, Z. X., L. Yang, et al. (2000). "Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression." *Nat Med* **6**(7): 782-9.
- Zhao, Y., J. I. Rodriguez-Barbosa, et al. (2000). "The induction of specific pig skin graft tolerance by grafting with neonatal pig thymus in thymectomized mice." *Transplantation* **69**(7): 1447-51.
- Zheng, X. X., T. G. Markees, et al. (1999). "CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment." *J Immunol* **162**(8): 4983-90.
- Zhong, R., Y. Luo, et al. (2003). "Improvement in human decay accelerating factor transgenic porcine kidney xenograft rejection with intravenous administration of gas914, a polymeric form of alphaGAL." *Transplantation* **75**(1): 10-9.

Annexes

Annexe 1

Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR⁻ Class II⁻ B7⁺ Regulatory Cells

Fabienne Haspot, Céline Séveno, Anne-Sophie Dugast, Flora Coulon, Karine Renaudin, Claire Usal, Marcelo Hill, Ignacio Anegón, Michèle Heslan, Régis Josien, Sophie Brouard, Jean-Paul Souillou and Bernard Vanhove*

ITERT-INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France

*Corresponding author: Dr. Bernard Vanhove, Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

B7/CTLA-4 interactions negatively regulate T-cell responses and are necessary for transplant tolerance induction. Tolerance induction may therefore be facilitated by selectively inhibiting the B7/CD28 pathway without blocking that of B7/CTLA-4. In this study, we selectively inhibited CD28/B7 interactions using a monoclonal antibody modulating CD28 in a rat model of acute kidney graft rejection. A short-term treatment abrogated both acute and chronic rejection. Tolerant recipients presented few alloantibodies against donor MHC class II molecules, whereas untreated rejecting controls developed anti-MHC class I and II alloantibodies. PBMC from tolerant animals were unable to proliferate against donor cells but could proliferate against third-party cells. The depletion of B7⁺, non-T cells fully restored this reactivity whereas purified T cells were fully reactive. Also, NK cells depletion restored PBMC reactivity in 60% of tolerant recipients. Conversely, NK cells from tolerant recipients dose-dependently inhibited alloreactivity. PBMC anti-donor reactivity could be partially restored *in vitro* by blocking indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and iNOS. *In vivo*, pharmacologic inhibition of these enzymes led to the rejection of the otherwise tolerated transplants. This study demonstrates that an initial selective blockade of CD28 generates B7⁺ non-T regulatory cells and a kidney transplant tolerance sustained by the activity of IDO and iNOS.

Key Words: Kidney graft, tolerance, costimulation blockade, CD28

Received 5 January 2005, revised 27 April 2005 and accepted for publication 17 May 2005

Introduction

Costimulation is required for effector or regulatory T lymphocytes to respond optimally following the engagement of their T-cell receptor (TCR). Costimulation blockade has been widely investigated as an approach to control T-cell reactivity in autoimmunity and transplantation. CD28 is one of the best-characterized costimulatory molecules. It is expressed on T cells, NK cells, neutrophils (1) and eosinophils (2), and binds to B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on antigen presenting cells (APC). CD28 costimulation leads to high-level interleukin-2 (IL-2) production, provides an essential survival signal for T cells and regulates T-cell cycle entry and progression through the G1 phase in an IL-2-independent manner (3). In human NK cells, CD28 has been described as a putative positive signal for cytotoxicity, acting in a B7-CD28-dependant manner (4). CTLA-4 (CD152) is another ligand of B7 that, when engaged on resting T cells, despite being expressed at low levels, transmits a signal to block transition from G0 to G1 (5). Recent analyses suggest that CTLA-4 out-competes CD28 for binding to B7-1 (6). CTLA-4/B7-1 interactions result in an IFN- γ -dependent up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a tryptophan catabolizing enzyme with immunosuppressive activity (7), in B7-positive APC. Such CTLA-4/B7 molecular interactions have been shown to sustain transplant tolerance in mice (8). Therefore, allowing CTLA-4/B7 interactions to proceed in the absence of CD28 costimulation may combine the effect of a lack of costimulation with a cell growth arrest or a clonal deletion, depending on whether blockade is applied to resting or activated T cells (9). *In vivo*, experimental data have demonstrated that CD28 masking or internalization prolongs allograft survival (10,11) and reverses the induction of autoimmunity (12,13). Also, targeting CD28, but not B7, can reverse an ongoing GVHD (14), suggesting an immunosuppressive role for preserved CTLA-4/B7 interactions.

Recently, the possibility of targeting CD28 as a therapeutic approach has been highlighted by several findings: in addition to the antagonistic effect of Fab fragments or modulating antibodies in rodents, monovalent recombinant (15) or 'silenced,' non-mitogenic antibodies (16) have been produced and might become available for use in humans. Moreover, over-stimulation of CD28 with agonistic antibodies has been reported to result, paradoxically, in the

Haspot et al.

depletion of peripheral alloreactive (17) or autoreactive T cells (18).

Because the selective inhibition of CD28 is expected to maintain the immunosuppressive CTLA-4/B7 interactions that have been implicated in the development of regulatory T cells (8), we investigated the effect of selective CD28 blockade on allograft rejection and/or tolerance. Several anti-rat CD28 Ab have been described, one of which (clone JJ319) induces CD28 internalization *in vivo* (19). While this Ab, after receptor engagement, may transiently activate T cells during the modulation process, its effect appears to be equivalent to a functional CD28 blockade in that it inhibits the alloreactive response of T cells stimulated by allogenic APC without causing T-cell depletion (10). Although this Ab prevents allograft vasculopathy in the F344-to-LEW rat kidney allotransplantation model of chronic rejection (11), it has been shown to delay heart allograft rejection without tolerance induction (10). In this article, we show that administration of anti-CD28 JJ319 antibody results in a state of functional tolerance without chronic rejection in a model of acute kidney graft rejection. Such tolerant recipients possess regulatory non-T cells in their blood, which control alloreactivity in part through the action of IDO.

Materials and Methods

Animals and transplantations

Eight-week old LEW.1A (RT1^a) and LEW.1W (RT1^u) male rats were purchased from Janvier (Savigny/Orges, France). Kidney allografts were performed as previously described (20): one native LEW.1A kidney was replaced by the LEW.1W allograft and a contralateral nephrectomy was performed 7 days later, after which time the recipient survival depended on the proper functioning of the allograft.

Antibodies, reagents and treatments

The JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). The mouse anti-rat mAbs OX6 (class II), OX33 (CD45RA), OX76 (RT1a type), ED-1 (macrophages), R7-3 (TCR β), 3.2.3 (NKRP1), OX8 (CD8), OX42 (CD11b/c), OX81 (IL-4) and 3G8 (irrelevant Ig) were produced in our laboratory from hybridomas obtained from the ECACC (Salisbury, UK). The rat CD6 (OX52), His24 (CD45), 3H5 (CD80) and 24F (CD86) antibodies were from BD Bioscience (Le Pont de Claix, France), and the anti-IgG2a, IgG2b, IgG2c and IgG1 were from Technopharm (Paris, France). The FITC-conjugated donkey anti-mouse IgG (H+L), FITC-conjugated goat anti-rat IgM μ chain and phycoerythrin-conjugated streptavidin were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The biotin-conjugated horse anti-mouse IgG and the horseradish peroxidase streptavidin were from Vector Laboratories (Abcys, Paris, France). The neutralizing rabbit Ab anti-rat IL-10 and normal rabbit IgG (both provided by J. Khalife, Institut Pasteur, Lille, France) were used at 10 μ g/mL. The neutralizing anti-INF- γ DB-1 MoAb (Serotec, Cergy Saint-Christophe, France) was used at a final concentration of 20 μ g/mL. Human rIL-2 was used at 100 U/mL. The 1-Methyl-DL-tryptophan (1-MT; Sigma) was used at 1 mg/mL. iNOS specific inhibitor aminoguanidine was injected *i/p* twice daily at 100 mg/injection during 17 days. IDO specific inhibitor, 1-MT was also administered twice daily by oral gavages at 50 mg/dose during 15 days.

Mixed leukocyte reactions

Mixed leukocyte reactions (MLRs) were performed as previously described (21), except that 5 mM N⁶-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; Sigma) was added to the medium. Spleen dendritic cells, used as APC, were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz gradient as previously reported (22). T cells were purified by warm nylon wool adherence followed by depletion of OX6 (MHC II) and 3.2.3 (CD161) positive cells with magnetic beads (Dyna, Compiègne, France). Proliferations were measured after 5 days. Cell depletions or enrichments (OX42, OX6, OX8, IgM, His24, B7 and 3.2.3) were performed with magnetic beads, or by FACS sorting (Aria cell sorter, Beckton Dickinson, Aalst, Belgium). Coculture assays were performed with 10⁵ responding LEW.1A T cells stimulated with 10⁵ LEW.1W APCs, to which were added different amount of purified NK (3.2.3⁺) cells.

Alloantibody detection

Alloantibodies were analyzed by flow cytometry, by incubating splenocytes with diluted (1/20) sera, as described (23). Alloreactivity was analyzed following separate gating on OX33⁺ cells (class I and II positive B cells) and on OX33⁻ cells (class I positive cells).

Immunizations against SRBC

At 100 days post-transplantation, tolerant animals received an *i.v.* injection of 10⁹ SRBC in 800 μ L sterile PBS. Serum levels of anti-SRBC Abs were determined 17 days later by flow cytometry.

Immunostaining

Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA, USA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5 μ m sections and fixed in acetone. Endogenous biotin activity was blocked using the Dako biotin blocking system (Dako, Trappes, France). Sections were then labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique, as described (24). Control sections were performed by replacing the primary mAb with dilution buffer. Alloantibody deposition was assessed by immuno-fluorescence following staining with a FITC-conjugated mouse anti-rat IgM or IgG (Jackson). Tissue sections were mounted using anti-fading mounting medium (Dako). Naïve kidneys were used as negative control.

Histopathology

Histopathological evaluation of kidney allograft samples was performed on formalin-fixed paraffin sections stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, Masson trichrome and Methenamin-Silver. Histological lesions were classified and scored by a pathologist (K.R.) blinded to the study.

Apoptosis analysis

ApoStat (R&D Systems, Lille, France) reagent was added to the cells according to the manufacturer's instructions. Unstimulated cells and cells in serum-free medium were used as negative and positive controls, respectively. The cells were harvested, washed, labeled with biotinylated R7.3 Ab and revealed with PerCP-Cy5-5-conjugated streptavidin (BD Bioscience). Analysis was performed by flow cytometry after gating on R7.3-positive T cells. Dead cells were excluded from acquisition by staining with the TO-PRO-3 reagent (Molecular Probes, Brussels, Belgium).

Statistical analyses

Statistical significance was evaluated using a Kruskal-Wallis test for the comparison of three groups or more, or a Mann-Whitney test for the comparison of two groups. Graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log rank test.

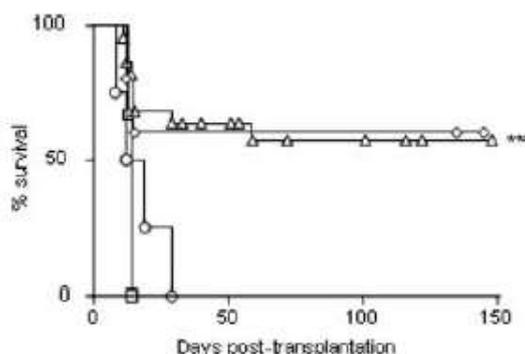


Figure 1: Administration of anti-CD28 Ab promotes kidney allograft survival. LEW.1A rats received a LEW.1W kidney allograft and the second, contralateral, kidney of the recipient was removed 7 days later. Recipients received the following treatments: 4 mg/kg/day of anti-CD28 Ab from day 0 to day 7 (Δ ; n = 21); 4 mg/kg/day of anti-CD28 Ab from day 1 to day 2 (\square ; n = 3); 4 mg/kg/day of control IgG from day 0 to day 7 (\circ ; n = 3). Syngenic grafts were also performed, in which case no treatment was given (\diamond ; n = 5). **p < 0.01.

Results

Administration of the JJ319 Ab promotes long-term acceptance of kidney allografts without chronic rejection

The JJ319 modulating anti-rat CD28 mAb was administered to LEW.1A rat recipients of life-sustaining kidney grafts from fully mismatched LEW.1W donors immediately after transplantation. Treatment with JJ319 for 8 days internalized CD28 on T lymphocytes for 14 days (data not shown). Sixty percent of the recipients receiving anti-CD28 from day 0 to day 7 survived long-term (Figure 1), which was similar to the proportion of long-term survivors who had received syngenic kidney grafts. The substantial fraction of graft failure in this model was found to be mostly related to an early obstacle to urine drainage. Control-treated recipients and recipients receiving low doses of JJ319 rejected between days 14 and 21 post-transplantation, (i.e. 7–14 days after the contralateral nephrectomy). One hundred days after transplantation, urea and creatinine levels were stable and almost equivalent in the sera of long-term survivors treated with anti-CD28 antibodies (11.7 ± 3.2 mmol/L urea and 51 ± 12.6 μ mol/L creatinine; n = 5) and in the sera of syngenic graft recipients analyzed in parallel (8 ± 0.4 mmol/L urea and 34 ± 0 μ mol/L creatinine; n = 3).

Anti-CD28-treated recipients surviving long-term had no histological signs of chronic rejection (i.e. no allograft glomerulopathy and no vascular fibrous intimal thickening) at 250 days post-transplantation. The five tolerated allografts analyzed presented a mild grade 1 non-specific chronic nephropathy with foci of interstitial fibrosis and inflammation representing less than 25% of the cortical

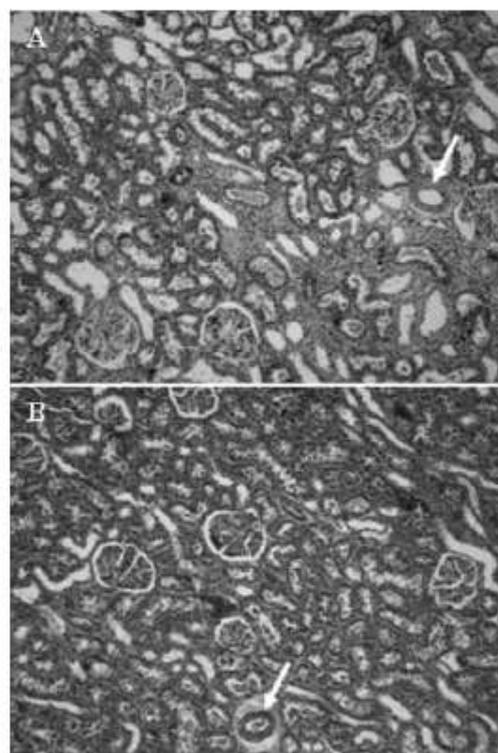


Figure 2: Histological examination of kidney grafts. Histological findings in tolerated allografts and syngenic grafts are shown. (A) Anti-CD28-treated recipients surviving long-term showed mild interstitial fibrosis and tubular atrophy with foci of moderate mononuclear cell infiltrate and no glomerular or vascular lesions. (B) Syngenic grafts showed minor histological injury (magnification $\times 200$). Arrows: blood vessels.

area, and slight tubular atrophy (Figure 2). They exhibited no allograft glomerulopathy and no vascular fibrous intimal thickening. Syngenic grafts showed minor histological injury. Control-rejecting animals developed severe grade III acute rejection (data not shown). As a matter of comparison, lesions of chronic rejection were observed when long-term kidney allograft survival was induced by treatment with cyclosporin A for 4 days post-transplantation as described (25). In the same rat strain combination, induction of long-term heart or kidney allograft survival by donor-specific transfusions or CD40 pathway costimulation blockade have also been associated with chronic rejection (R. Josien and K. Renaudin, University Hospital, Nantes, July 2004, personal communication), (23).

Leukocyte infiltration of long-surviving grafts

To assess the mechanisms by which the selective blockade of the CD28-B7 pathway promoted graft survival and prevented chronic rejection lesions, leukocyte subsets were measured in tolerated kidney grafts at day 100 post-transplantation. This analysis revealed a pattern

Table 1: Immunohistological analysis of tolerated kidney allografts 100 days after transplantation

	Days post-transplantation	OX33	OX76	ED1	R7.3	OX39
Allogenic	>100	F+/D-	F++/D++	F++/D++	F++/D++	F-/D++
Syngenic	>100	F-/D-	ND	F-/D+	F-/D+	F-/D+

Analysis of B cells (OX33), class II+ cells (OX76), macrophages (ED1), T cells (R7.3) and CD25+ cells (OX39) was performed in allografts (n = 5) and syngenic grafts (n = 3). The level of infiltration is reported as follows: -: no infiltration; +: slightly infiltrated; ++ infiltrated; +++ highly infiltrated. F: focal infiltrate. D: diffuse infiltrate, ND: not defined.

different to that observed in syngenic grafts where rare and diffuse infiltration occurred. Tolerated kidneys exhibited more mononuclear cells that were focally distributed in the parenchyma and around some glomeruli and were comprised of class II-positive macrophages and T cells, with few B cells. Interestingly, most T-cells infiltrating allografts were CD25+, whereas this was rarely observed in syngenic grafts (Table 1).

Skewed alloantibody responses in tolerant animals

In order to examine the effect of the selective and initial CD28 blockade on alloantibody responses, we analyzed serum levels of alloantibodies in tolerant recipients 100 days post-transplantation and compared them with those of rejecting, untreated recipients maintained without contralateral nephrectomy for 100 days. Tolerant recipients showed significant levels of alloantibodies dominantly directed to donor MHC class II molecules and of the non-complement-fixing IgG1 isotype. Very few anti-donor MHC class I alloantibodies were detectable (Figure 3A). In contrast, rejecting recipients had high levels of Abs directed against donor MHC class I and II molecules, as well as Abs of the IgG1 and IgG2b isotypes (Figure 3B). In spite of the presence of alloantibodies in the sera of tolerant animals, only a few deposits of IgG, restricted to some glomeruli, could be found in the graft. No IgG or IgM deposition was present on vessel walls. Complement deposition (C5b9) was visible on some glomeruli, but was also detected in syngenic grafts. Such moderate complement deposition was absent in non-transplanted, normal kidneys, suggesting that it was induced by the transplantation itself and not by immunological factors (Table 2).

Non-T-cell-dependant inhibition of alloreactivity in tolerant recipients

One hundred days after transplantation, the blood leukocytes from tolerant recipients failed to proliferate against donor APC. This unresponsiveness was donor-specific since the leukocytes proliferated normally when stimulated with third party Brown Norway (RT1ⁿ) rat APC. In contrast, T cells purified from these leukocytes proliferated normally after stimulation by donor and third-party cells. Similarly, unfractionated nucleated spleen cells from LS recipients displayed a 70% reduction in proliferative capacity in response to donor APC compared to naïve spleen cells but proliferated normally to third-party stim-

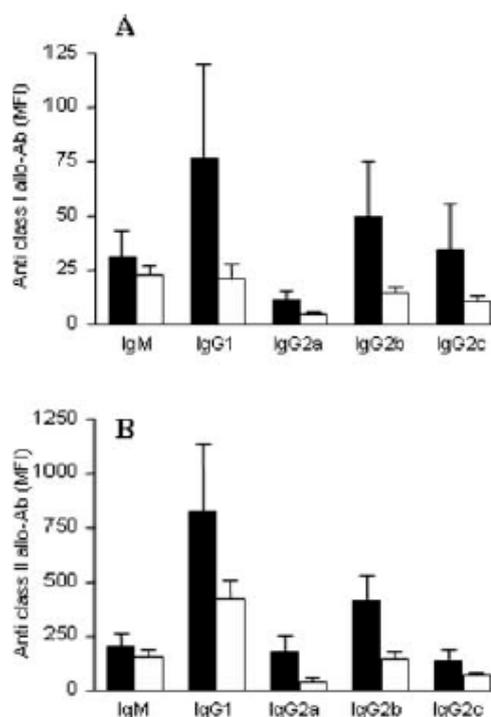


Figure 3: Alloantibody responses in tolerant animals. Sera (dilution 1/20) from tolerant (n = 8; white bar) and rejecting recipients (n = 3; black bar) were analyzed 100 days after transplantation. Reactivity against class I (A) and class I/II (B) was evaluated by flow cytometry using donor-type splenocytes as targets and expressed as mean \pm SEM. MFI: mean fluorescence intensity.

ulation. Again, the proliferation of purified T cells from the spleen of LS recipients was similar to that of T cells from naïve rats. Finally, the lymph node cells from LS recipients proliferated normally to donor and third-party stimulation (Figure 4).

In order to identify the cell population within the blood leukocytes of tolerant recipients that was responsible for inhibiting T-cell proliferation, different cell subpopulations were depleted prior to the MLR assays. Neither the removal of >95% of CD11b/c⁺, CD8⁺ or IgM⁺ (as well as His24⁺, data not shown) nor class II⁺ cells significantly

Table 2: Alloantibodies and complement deposition in allografts (n = 5) and syngenic grafts (n = 3)

	Days post-transplantation	IgG		IgM		C5b9	
		Vessels	Glomeruli	Vessels	Glomeruli	Vessels	Glomeruli
Allogenic	>D100	-	+	-	+ and -	+ and -	+ and -
Syngenic	>D100	-	-	-	++	-	+
Naïve	N.R.	-	-	-	-	-	-

Graft biopsies were analyzed by immunofluorescence as described in the Materials and Methods section. Intensity of the staining was evaluated according to an arbitrary scale that was defined as follows: -: negative; + and -: positive and negative glomeruli or vessels on the same slide; +: weakly positive; ++ positive; +++ strongly positive. N.R.: not relevant.

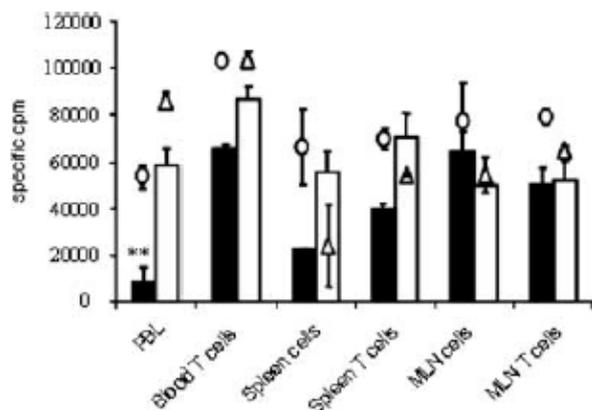


Figure 4: Proliferation of PBMC from tolerant recipients in MLR. Proliferation of tolerant (>100 days after transplantation) rat cells to donor LEW.1W APC (black bars) or third party LEW.BN APC (white bars) was compared to the proliferation of naïve LEW.1A rat cells to donor APC (o) and third party BN APC (Δ). The data shown are means of triplicates ± SEM from one experiment for each condition, representative of three experiments for the spleen and lymph nodes and of at least six for the blood. **significant at $p < 0.01$.

restored the proliferation of tolerant leukocytes (Figure 5A). In order to maintain activated T cells that might express class II molecules in the cell cultures, depletion was also performed by FACS sorting of class II positive, non-T cells ($CD6^-$ class II $^+$). Again, proliferation was not restored. Furthermore, control naïve leukocytes depleted in parallel showed normal proliferation capacities (data not shown). However, interestingly, removal of non-T cells, B-7 positive cells ($CD6^-$ B7 $^+$ cells) completely restored the proliferation of blood leukocytes from tolerant rats (Figure 5A). In five additional experiments, depletion of 3.2.3-positive cells (NK and NKT) also restored the proliferation of leukocytes in three tolerant recipients whereas it failed to do so in two others (Figure 5B). Conversely, sorted ($3.2.3^+$) NK cells from tolerant recipients dose-dependently and completely inhibited alloreactivity in coculture MLR assays (Figure 5C).

Inhibition of IDO and cytokines in MLR

In order to identify the effector mechanism of the regulation observed *in vitro*, and since IDO has been shown to be a major effector molecule in tolerance controlled by B7/CTLA-4 interactions (26), we first inhibited IDO with 1-MT in MLR with tolerant cells. Addition of 1-MT increased proliferation sixfold ($p = 0.05$) to reach 40% of the level obtained with naïve leukocytes (Figure 6A). Addition of exogenous rIL-2 did not significantly restore proliferation and no additive effect with 1-MT could be revealed. In order to analyze whether cytokines shown to participate in regulatory mechanisms in other systems (27) were involved, neutralizing antibodies against IL-4 and IL-10 were added to the MLR but had no effect on T-cell proliferation. In contrast, anti- $INF-\gamma$ antibodies restored most of the proliferation in this assay (Figures 6B and C).

IDO and iNOS sustained the tolerance in vivo

Since IDO and iNOS played a role in the inhibition of T-cell alloreactivity *in vitro*, we investigated their role in the maintenance of tolerance *in vivo*. Three stable tolerant animals (>300 days after transplantation) were treated using the IDO-specific inhibitor, 1-MT and the iNOS-specific inhibitor, aminoguanidine. A short-term treatment (15 days for 1-MT and 17 days for aminoguanidine) led to rejection on days 11, 16 and 20 after treatment induction. In parallel, control rats receiving the same treatment remained healthy and had a normal kidney function at day 20 (i.e. 5.4 ± 0.4 mmol/L urea and 23 ± 2.6 μ mol/L, $n = 3$), indicating that this treatment was not nephrotoxic.

Apoptosis of alloantigen responding cells in MLR

Since up-regulation of IDO is known to enhance apoptosis of responding T cells, both through local tryptophan deprivation and by the action of tryptophan metabolites (28), we determined whether the observed IDO-dependent inhibition of tolerant T cells in MLR could be related to enhanced apoptosis. Twenty-four hours after initiation of an MLR, the percentage of tolerant T cells with activated caspases reached 45%, whereas this proportion was only 14% when T cells from naïve animals were assessed. Interestingly, when unstimulated PBMC from tolerant recipients were cultured in the same conditions, T-cell apoptosis was also

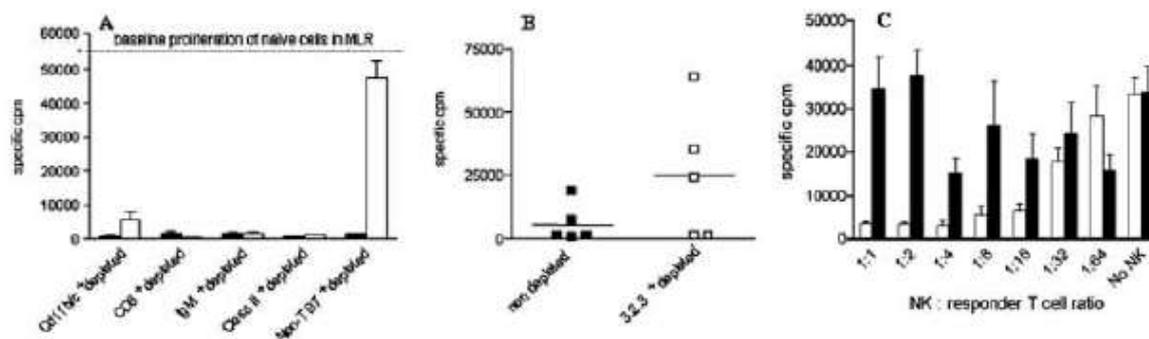


Figure 5: Identification of suppressive cells in MLR. (A) PBMC from naïve animals or from tolerant recipients were analyzed in MLR before (black bars) and after depletion (white bars) of OX42+ ($n = 3$), OX8+ ($n = 3$), IgM+ ($n = 3$), OX6+ ($n = 3$) or CD6-B7+ ($n = 3$) cells. The data presented are mean \pm SEM of the indicated number of independent experiments for each type of depletion. (B) The same analysis was performed after depletion of 3.2.3⁺ cells. Cell viability after depletion was confirmed by their ability to proliferate upon Con A stimulation. The results shown are from five individual experiments. Depletion was routinely greater than 96% and always above 90%. (C) NK (3.2.3⁺) cells purified from the blood of naïve animals or tolerant recipients were added to MLR assays in which responding LEW.1A T cells were stimulated by LEW.1W APCs. Proliferation was measured after 5 days. The data are mean \pm SEM of four independent blood sampling.

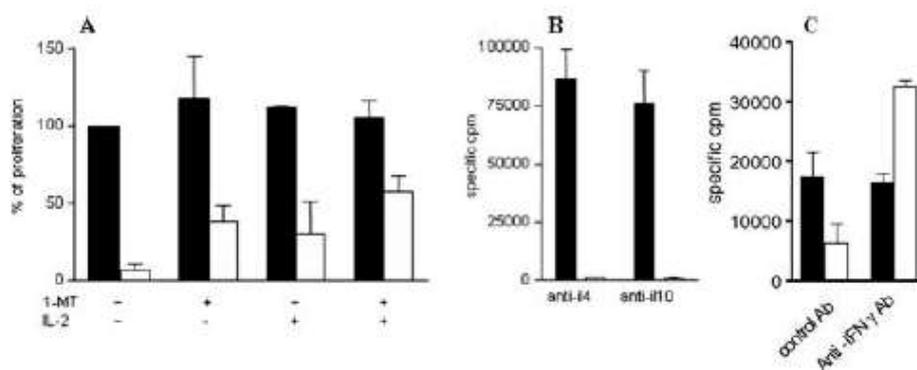


Figure 6: Implication of IDO and cytokines in the suppression of T cell proliferation. (A) 1-MT was added to MLR to assess the role of IDO. The percentage of proliferation was calculated for each independent experiment with 100% being the proliferation of naïve cells stimulated with LEW.1W APC. The data are presented as mean \pm SEM of five independent experiments for tolerant recipients (white bars) and of two independent experiments for naïve animals (black bar). (B) Neutralizing anti IL-4 and IL-10 antibodies were added to the MLR from tolerant (white bars) or naïve animals (black bar). The data are mean \pm SEM of triplicates, representative of four independent experiments. (C) Neutralizing anti-IFN- γ antibodies were added to the MLR from tolerant (white bars) or naïve animals (black bar). The data are mean \pm SEM of triplicates, representative of two independent experiments.

significantly higher than when naïve PBMC were assessed ($p = 0.02$; Figure 7).

Phenotype of PBMC from anti-CD28-treated tolerant rats

The percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD28⁺ cells among the PBMC from tolerant recipients were similar to those observed in naïve rats. However, the phenotype of CD3⁺ T cells analyzed by two-color immunofluorescence revealed more CD25⁺ T cells in tolerant recipients ($9\% \pm 6.2$; $n = 4$) than in naïve animals ($5\% \pm 2.4$; $n = 5$). Less CD62L⁺ T cells were found in tolerant animals ($36\% \pm 25$; $n = 4$) than in controls ($61\% \pm 34$; $n = 5$, Figure 8A). Similar findings were noted after gating on CD4⁺ and CD8⁺ cells

(data not shown). Since the depletion of CD11b/c⁺ cells from the MLR did not eliminate the suppressive activity, we analyzed the phenotype of CD11b/c⁻ cells by 2-color immunofluorescence. An up-regulation of B7-1 ($20\% \pm 9$; $n = 3$), and to a lesser extent, B7-2 ($27\% \pm 13$; $n = 4$), was observed, as compared with the same cells in naïve animals ($11\% \pm 4$; $n = 4$ and $20\% \pm 7$; $n = 5$ for B7-1 and B7-2, respectively) (Figure 8A). In the PBMC of naïve controls, the level of NKRP-1⁺ cells (NK and NKT) was $15\% \pm 2.2$, whereas it was $25.3\% \pm 4.6$ in tolerant allograft recipients ($n = 4$; $p < 0.05$). These abundant NKRP-1⁺ cells also displayed a significantly up-regulated B7-1 expression (80% vs. 50% in controls; $p < 0.05$). The same analysis, when gated on TCR⁺ cells, revealed a similar situation for

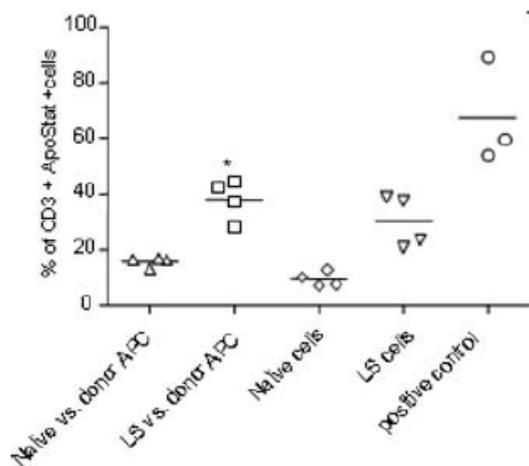


Figure 7: Analysis of apoptosis in MLR. PBMC from tolerant or naïve rats were stimulated by LEW.1W APC for 24 h. Unstimulated cells in culture medium and cells maintained in culture without serum were used as controls. Activated caspases were stained with the ApoStat-FITC reagent and T lymphocytes were analyzed by FACS after gating on CD3⁺ cells. LS, long surviving recipient. *significant at $p < 0.05$.

NKT cells (Figure 8B). Conversely, CD28 was found to be down-regulated on NKRP-1⁺ cells (8% vs. 20% in controls; Figure 8B).

Tolerant animals were not immunosuppressed

To determine whether the tolerant recipients were immunocompetent, they were injected with SRBC 100 days after transplantation and their specific immune response was analyzed. The IgG and IgM anti-SRBC (Figure 9) responses of these animals were at least as strong as those measured in controls and no evidence for any dominance of an Ig subclass was observed.

Discussion

In this study, we found that administration of an anti-CD28 mAb that induces receptor internalization also induced the survival of kidney allografts in a rat strain combination where controls underwent acute rejection. Despite the fact that tolerant allograft recipients displayed a detectable peripheral anti-donor alloantibody response, no histological signs of chronic rejection were detected, even several months after transplantation. There are several possible reasons for this. First, alloantibodies are mainly directed toward donor class II molecules, which are not expressed on resting endothelial cells, and might be harmless. Second, the dominant isotype of alloantibodies in these tolerant animals was IgG1, a non-complement-fixing Ab in rodents (29). Finally, only a moderate Ig, and no significant complement deposition was observed within the tolerated transplants (Table 2). These data are consistent with the idea that the alloantibody response in tolerant recipients

was not harmful and that chronic graft rejection in the rat might not be related to alloantibodies.

In tolerant recipients, anti-CD28 mAb treatment may regulate alloreactivity by three mechanisms: T-cell death, T-cell anergy or ignorance, and induction of regulatory cells. Our data favor a hypothesis implicating the second mechanism in the induction phase of tolerance and the third mechanism later in the maintenance phase. This is because: (i) alloreactivity is blocked *in vivo* during the anti-CD28 treatment (21), (ii) donor-reactive T cells could be found in the spleen and blood of tolerant recipients and therefore had not been deleted and (iii) the proliferation of donor-reactive T cells in MLR was inhibited in the presence of non-T cells. Given that IDO reactivity mediates the immunosuppressive effect of CTLA4-Ig on APC (7) or of CTLA-4⁺ regulatory T cells (26) after interaction with B7, we tested the role of IDO and B7⁺ cells in the control of proliferation of tolerant-derived donor-reactive T cells. Depletion of non-T B7⁺ cells from the blood unequivocally restored the anti-donor reactivity of T cells (Figure 5A). In MLR using naïve responding cells, the depletion of non-T B7⁺ cells did not increase the measured proliferation (data not shown), indicating that these cells do not act in the same way as the naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contributing to maintaining self-tolerance (30,31). Rather, our cells appeared to specifically inhibit primed alloreactive cells. Since the depletion of B cells, CD11b/c⁺, CD8⁺ or class II⁺ cells could not abrogate the suppression, we concluded that the cells responsible for the inhibition of donor-reactive T-cell proliferation were B7⁺ class II⁻ CD11b/c⁻ non-T non-B cells. The depletion of NKRP-1⁺ cells gave less clear-cut results since recovery of proliferation was obtained in only three out of five animals (Figure 5B). Moreover, the addition of purified NK cells in coculture MLR assays did inhibit the alloreactivity of T cells (Figure 5C). The FACS analysis of gated NKRP-1⁺ cells revealed a considerable up-regulation of B7-1 on these cells. However, B7 was also found to be up-regulated on other cell types that could also account for the suppressive effect described here (27, 32–36). Altogether, our data suggest that several cell types could act as suppressors in blood using a common mechanism driven by the engagement of B7 molecules and the up-regulation of IDO. The fact that anti-IFN- γ antibodies block the suppression *in vitro* (Figure 6C) is compatible with an involvement of IDO, since activation of IDO is dependant on the availability of IFN- γ (7). *In vivo* as well, the blockade of IDO resulted in tolerance inhibition and rejection, indicating that the IDO-dependant regulatory non-T cells in blood might support the tolerance state. Although devoid of histological signs of chronic rejection, the tolerated kidney grafts were infiltrated by activated macrophages and T cells (Table 1). Since graft-infiltrating cells in tolerated organs in the rat have been implicated in the local suppression of alloreactive T cells (37,38), such cells might also participate in graft acceptance here, with similar and/or different mechanisms from those we studied in the blood.

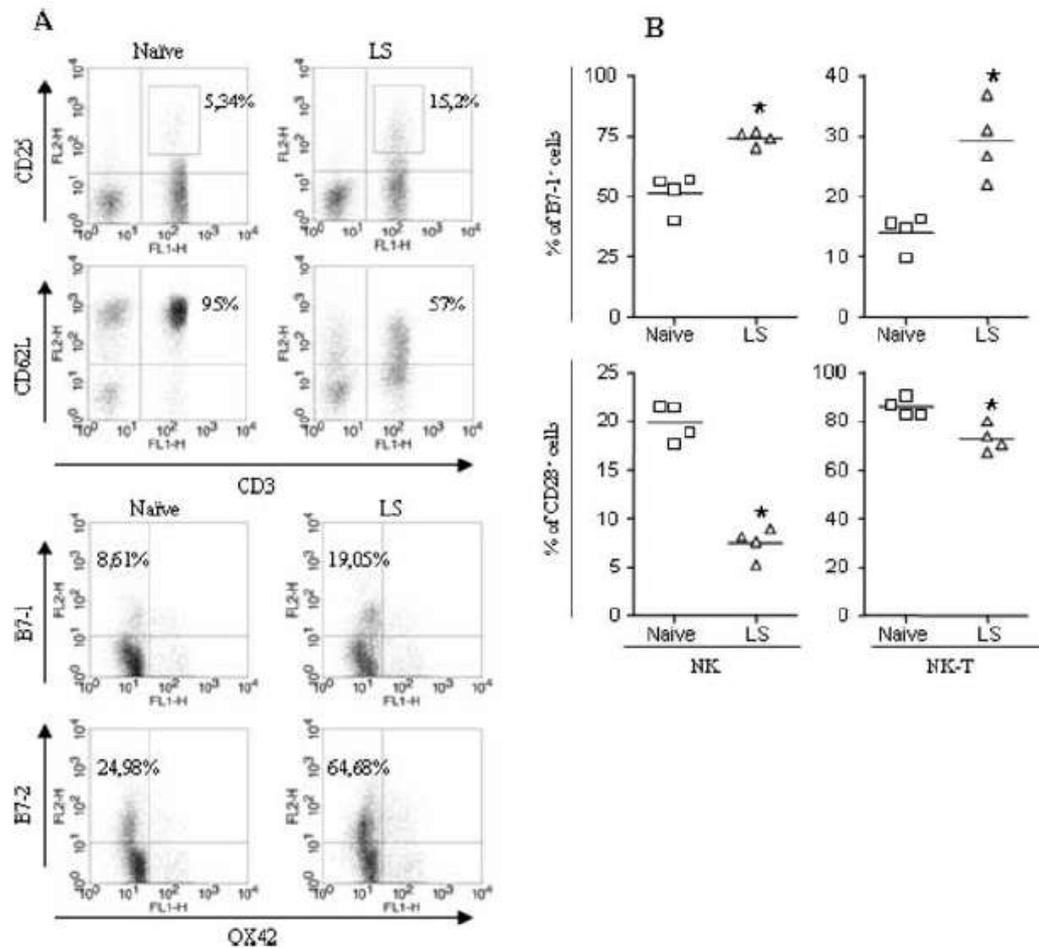


Figure 8: Phenotype of PBMC from tolerant recipients. (A) PBMC were analyzed by FACS 100 days after transplantation. The numbers within each window represent the percentage of CD25 or CD62L⁺ cells among the CD3⁺ cells (upper panel), and of B7-1⁺ or B7-2⁺ cells among the OX42⁺ cells (lower panel). One out of four experiments for tolerant cells and one out of five for naïve cells are illustrated. (B) NK and NKT cells were analyzed by double staining for B7-1 and CD28 expression (n = 4; *significant at p < 0.05). LS, long surviving recipient.

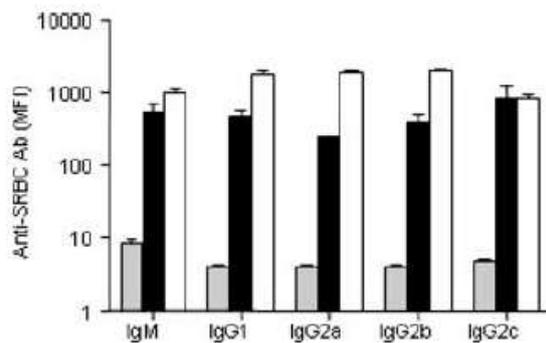


Figure 9: Ab responses after immunization with SRBC. Tolerant recipients (white bars) and naïve rats (black bars) were immunized with i.v. injection of SRBC. Ab responses were assessed 17 days later by flow cytometry. Shaded bars: background signal. The data are means of triplicates \pm SEM and representative of two animals in each group.

In mixed lymphocyte reactions, we found the suppression driven by non-T class II⁻ B7⁺ regulatory cells to be donor specific (Figure 4). One possible explanation is that anti-donor, primed T cells interact with these non-T regulatory cells in a non-cognate manner. Because the regulation is B7⁻ and IDO-dependant, this interaction is likely to occur through the interaction of CTLA-4 up-regulated on primed alloreactive T cells with CD80 on regulatory cells. This interaction may not be effective with unprimed T cells (third party APC) that express low membrane levels of CTLA-4. On the basis of our observation that anti-RT1A^U (donor type) T cells from naïve rats proliferated in mixed lymphocyte reactions, whereas anti-RT1A^U cells from tolerant recipients underwent more apoptosis in the presence of regulatory cells (Figure 6), it is possible that CTLA-4/B7 interactions controlled anti-donor reactivity by inducing apoptosis. This would be in accordance with the description that signals transmitted through

CTLA-4 in activated T cells result in Fas-independent cell death (9).

In conclusion, in anti-CD28-induced kidney allograft tolerance in the rat, we show that the anti-donor response is controlled by non-cognate, B7-dependant, non-T cells and by the activity of IDO. These data, together with other recent reports of the use of anti-CD28 agents in transplantation (17) and autoimmunity (18), strongly suggest that these therapeutic agents might be useful in the clinic.

Acknowledgments

We are grateful to H. Smith, E. Merieau and B. Martinet for animal care. This work was supported in part by the 'Progreffe' foundation and by the 'Vaincre La Mucoviscidose' association. F.H. has a fellowship from the INSERM/Région Pays de la Loire.

References

- Venuprasad K, Parab P, Prasad DV et al. Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1536–1543.
- Woerly G, Roger N, Loiseau S, Dombrowicz D, Capron A, Capron M. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 1999; 190: 487–495.
- Boonen GJ, van Dijk AM, Verdonck LF, van Lier RA, Rijksen G, Medema RH. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999; 29: 789–798.
- Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU et al. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 1999; 163: 62–70.
- Blair PJ, Riley JL, Levine BL et al. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 1998; 160: 12–15.
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 2002; 17: 201–210.
- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002; 3: 1097–1101.
- Tsai MK, Ho HN, Chien HF, Ou-Yang P, Lee CJ, Lee PH. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 2004; 77: 48–54.
- Scheipers P, Reiser H. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10083–10088.
- Dengler TJ, Szabo G, Sido B et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 1999; 67: 392–398.
- Dong VM, Yuan X, Coito AJ, Waaga AM, Sayegh MH, Chandraker A. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73: 1310–1317.
- Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 1999; 163: 1704–1710.
- Silver PB, Hathcock KS, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol* 2000; 165: 5041–5047.
- Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2000; 164: 4564–4568.
- Vanhove B, Laflamme G, Coulon F et al. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 2003; 102: 564–570.
- Tso JJ, Hinton P, Vasquez M et al., inventors; Silenced anti-CD28 antibodies and use thereof. Patent US 2004/0116675 A1 Jun. 17, 2004.
- Yu XZ, Albert MH, Martin PJ, Anasetti C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* 2004; 113: 1624–1630.
- Schmidt J, Elflein K, Stienekemeier M et al. Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J Neuroimmunol* 2003; 140: 143–152.
- Tacke M, Hanke G, Hanke T, Hunig T. CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol* 1997; 27: 239–247.
- Souillou JP, Carpenter CB, d'Apice AJ, Strom TB. The role of non-classical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 1976; 143: 405–421.
- Haspot F, Villemain F, Laflamme G et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228–2234.
- Voisine C, Hubert FX, Trinite B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169: 2284–2291.
- Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 2002; 168: 1600–1609.
- Sébille F, Guillet M, Brouard S et al. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *American Journal of Transplantation* 2001; 1: 21–28.
- Vogt P, Hiller WF, Steiniger B, Klempnauer J. Differential response of kidney and pancreas rejection to cyclosporine immunosuppression. *Transplantation* 1992; 53: 1269–1272.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206–1212.
- Guillot C, Menoret S, Guillonnet C et al. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003; 101: 3325–3333.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 1069–1077.
- Bruggemann M, Teale C, Clark M, Bindon C, Waldmann H. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1,

- gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J Immunol* 1989; 142: 3145–3150.
30. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151–1164.
 31. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199–210.
 32. Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127: 1917–1927.
 33. Seino KI, Fukao K, Muramoto K et al. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2577–2581.
 34. Hudrisier D, Feau S, Bonnet V, Romagnoli P, van Meerwijk JP. In vivo maintenance of T-lymphocyte unresponsiveness induced by thymic medullary epithelium requires antigen presentation by radioresistant cells. *Immunology* 2003; 108: 24–31.
 35. Jin Y, Fuller L, Carreno M et al. Functional and phenotypic properties of peripheral T cells anergized by autologous CD3(+) depleted bone marrow cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 567–575.
 36. Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 2002; 99: 1465–1473.
 37. Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 2003; 171: 204–211.
 38. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene Ther* 2004; 11: 701–710.

Annexe 2



MEDICINE SCIENCES 2005 ; 27 : 302-8

> La pénurie d'organes disponibles est responsable d'un nombre croissant de décès de patients en attente de greffe. Dans ces conditions, des solutions alternatives sont envisagées, notamment l'utilisation d'organes porcins. Les xéno-greffes sont cependant soumises à différents types de rejet (hyperaigu, vasculaire aigu et cellulaire) dont les mécanismes commencent à être mieux connus. Les stratégies visant à faire de la xénotransplantation une réalité clinique existent et, bien que le nombre de laboratoires engagés dans ce domaine soit encore modeste, des progrès substantiels ont été récemment obtenus. Elles incluent de nouvelles modifications génétiques des animaux donneurs combinées à la mise au point de traitements immunosuppresseurs adaptés à la situation clinique, ainsi que les tentatives d'induction d'une tolérance immunitaire et la gestion du risque sanitaire. L'acceptation des xéno-greffes par les receveurs potentiels et son impact sur la société sont également pris en considération. <

Les xéno-greffes finiront-elles par être acceptées ?

Céline Séveno, Michèle Fellous,
Joanna Ashton-Chess, Jean-Paul Souillou,
Bernard Vanhove



Compatibilité des organes porcins

Sa facilité d'élevage et la compatibilité physiologique de certains de ses organes avec les primates [5] font du porc un donneur possible

et surtout disponible. Chez le macaque, la greffe rénale porcine permet le maintien des électrolytes sériques (sodium, potassium, calcium, chlorure) et l'obtention de concentrations normales de créatinine et d'urée pendant plusieurs semaines [6, 5]. Cependant, une hypophosphorémie et une légère hypoalbuminémie sont observées. Les animaux développent, dans le cas d'une greffe de rein, une anémie nécessitant l'apport d'érythropoïétine recombinante humaine. Concernant la transplantation hépatique, peu de tentatives ont été réalisées à ce jour. Cependant, ce type de greffe a permis la survie de deux babouins pendant 4 et 8 jours respectivement, avec des concentrations normales de facteurs de coagulation et de fibrinogène, et une production normale de bile [7]. Dans le cadre particulier de la greffe de foie de primate réalisée chez l'homme [8], le taux d'albumine semblait cependant réglé par l'organe greffé lui-même et non par le rece-

C. Séveno, J. Ashton-Chess,
J.P. Souillou, B. Vanhove:
Institut de transplantation et de
recherche en transplantation
(ITER), Inserm U.643, CHU Hôtel
Dieu, 30, boulevard Jean Monnet,
44093 Nantes, France.
jps@nantes.inserm.fr
M. Fellous: UMR 8137, Centre de
recherche sens, éthique, société
(CERSES), 59-61, rue Pouchet,
75849 Paris Cedex 17, France.
michele.fellous@wanadoo.fr

La transplantation d'organes est devenue une thérapeutique permettant de sauver et d'améliorer la qualité de vie des patients. La pénurie d'organes est cependant un facteur limitant le développement des greffes. C'est pourquoi le recours à la xénotransplantation, greffe de cellules ou d'organes animaux, serait de nature à réduire cette pénurie, à condition de s'assurer qu'elle est sans risque pour le patient et pour la société. Dès 1963, avec l'apparition des premières molécules immunosuppressives, des xéno-greffes de rein, utilisant des organes de primate [1], ont été tentées en clinique, inaugurant une série d'essais incluant le cœur de babouin [2], les greffes d'îlots pancréatiques porcins [3] et, plus récemment, les cellules souches neurales porcines [4].

veur, indiquant que l'obtention de survies plus prolongées est nécessaire avant de conclure. Un certain nombre de cas nécessitant la restauration urgente des fonctions hépatiques (hépatite fulminante, agents hépatotoxiques, dysfonctionnement primaire) pourraient ainsi être traités par une xénogreffe en attendant qu'un greffon allogénique soit disponible.

Des études ont également montré que des greffes orthotopiques de cœur et de poumons permettaient la survie de primates tant que ces organes n'étaient pas rejetés [9-11]. Chez le macaque rendu diabétique par administration de streptozotocine, des îlots pancréatiques porcins injectés par voie intra-portale sont capables de restaurer la normoglycémie tant qu'un rejet de type cellulaire ne les détruit pas [12]. La greffe de neuroblastes fœtaux porcins a également été testée chez des patients parkinsoniens ou atteints de maladie de Huntington, dans un essai clinique de phase I. Un an après la transplantation, une amélioration modérée du score clinique d'évaluation avait été notée chez les patients parkinsoniens, mais pas chez ceux atteints de maladie de Huntington. L'autopsie d'un des patients a cependant révélé qu'un petit nombre de neurones xénogéniques avaient survécu plusieurs mois, suggérant qu'ils avaient été rejetés [4].

Dans tous les cas où une xénogreffe pourrait physiologiquement remplacer une fonction déficiente, la principale barrière à son utilisation chez l'homme sera probablement liée à une incompatibilité immunologique. Nombreux sont les chercheurs qui considèrent cependant que cet aspect pourra être résolu, tout d'abord par la modification de l'immunogénicité des tissus porcins par génie génétique (on a parlé d'«humanisation»), et ensuite par la mise au point de protocoles d'induction d'une tolérance immunitaire.

Quelle approche pour quel type de rejet ?

Expérimentalement, dans les combinaisons d'espèces où le receveur possède des anticorps dirigés contre le donneur, un rejet qualifié d'hyperaigu survient quelques minutes à quelques heures après la revascularisation du greffon. C'est le cas notamment des combinaisons porc/babouin et porc/homme. Ces combinaisons dans lesquelles des anticorps naturels xénogéniques (ANX) sont directement responsables du rejet sont appelées discordantes. La cible porcine des ANX chez les primates et chez l'homme est très majoritairement constituée par le motif disaccharidique Gal α 1-3Gal présent sur les protéines et les lipides à la surface des cellules du donneur, en particulier à la surface des cellules endothéliales (CE). Ces ANX, d'isotypes IgG et IgM, possèdent une affinité élevée et sont directement responsables du rejet hyperaigu [13]. La forte densité de l'épitope Gal α 1-3Gal permet aux anticorps de se fixer massivement à l'endothélium [14] et d'activer le complément. La fixation de celui-ci provoque une activation de type I de l'endothélium, qui consiste en une acquisition rapide d'un phénotype

procoagulant, sans activation de gènes ni synthèse de protéines. Cela aboutit à la dissociation des cellules endothéliales, entraînant une suffusion hémorragique et une thrombose des gros vaisseaux [15].

Afin de prévenir l'apparition du rejet hyperaigu, il est possible de dépléter les anticorps xénoréactifs par plasmaphérèse [16] ou immunoadsorption. Les inhibiteurs du complément tels que le facteur de venin de cobra [17], le CR1 soluble (*complement receptor 1*) [18] et le sulfate de dextran [19] prolongent également la survie du greffon. L'activité du complément sur l'endothélium est normalement contrôlée par des protéines régulatrices telles que le DAF (*decay accelerating factor*), le CD59 ou la MCP (*membrane cofactor protein*). Cependant, ces protéines interagissent de façon spécifique d'espèce avec leur cible. Ainsi, dans la combinaison porc/homme, le DAF porcine ne peut régler efficacement l'activation du complément humain [20]. Il a donc été envisagé de contrôler le rejet hyperaigu en utilisant des animaux transgéniques pour ces molécules régulatrices. Des porcs transgéniques pour le DAF [21] et/ou le CD59 [22] humains ont été produits et utilisés avec succès dans des modèles de greffe cardiaque [23], rénale [24] ou hépatique [7]. Néanmoins, en l'absence de tout traitement, la prolongation obtenue ne dépasse pas quelques jours, les organes étant rejetés par un mécanisme appelé rejet vasculaire aigu (AVR) ou rejet retardé. Il se caractérise par une activation de type II de l'endothélium, conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (interleukines 1 et 8) et de molécules d'adhérence comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et la sélectine E, ainsi qu'à la production d'un environnement procoagulant, notamment par perte de la thrombomoduline.

Lors de l'AVR, on observe de façon concomitante une forte augmentation du titre sérique des anticorps xénoréactifs IgM et IgG. Ces anticorps sont principalement dirigés contre l'épitope Gal α 1-3Gal, mais également contre d'autres épitopes porcins [25]. La fixation des IgG sur l'endothélium peut non seulement activer le complément, mais aussi induire l'activation des cellules NK (*natural killer*) via une interaction entre le fragment Fc des IgG et le Fc γ III de ces cellules [26]. À ce jour, les différents traitements visant à surmonter l'AVR ont eu une efficacité limitée : des combinaisons associant plusieurs immunosuppresseurs (ciclosporine A, corticostéroïdes, cyclophosphamide, mycophénolate, mofétil), de même que la déplétion des anticorps xénoréactifs par plasmaphérèse ou par injection de polymères Gal n'ont pas permis d'obtenir une survie supérieure à 3 mois, les animaux subissant un AVR ou mourant de complications infectieuses dues à l'immunosuppression [27].

Les porcs Gal-KO

Le rôle prédominant des anticorps xénoréactifs dans le rejet hyperaigu et l'AVR, ainsi que la difficulté existant à surmonter ces rejets ont conduit à l'idée, en 1993, que la suppression de

l'expression du motif Gal α 1-3Gal pourrait être une solution de choix au rejet humoral en xénotransplantation [28]. La technique du transfert de noyau, apparue en 1996, a permis de produire en 2001 les premiers porcs hétérozygotes pour une forme inactive de l' α 1,3-galactosyltransférase, l'enzyme responsable de la glycosylation Gal α 1-3Gal. L'année suivante, des porcs dont les deux allèles de l' α 1-3galactosyltransférase avaient été invalidés (porcs Gal-KO) ont vu le jour [29]. Les premiers résultats dans des modèles de greffes cardiaque et rénale sous traitement immunosuppresseur fort (mycophénolate mofétil, stéroïdes, splénectomie et/ou thymectomie) montrent une absence d'AVR et une survie plus longue, jusqu'à 100 jours [30]. Cependant, en fonction des traitements, des signes plus ou moins prononcés de microangiopathie thrombotique ont été observés dans la plupart des greffons [31, 32]. Cette microangiopathie évoque l'induction d'anticorps dirigés contre d'autres déterminants que le Gal α 1-3Gal. La transgénèse porcine pourrait contribuer à contrôler ce phénomène, en particulier en permettant l'expression d'inhibiteurs du facteur tissulaire et d'antithrombine [33, 34].

Enfin, le traitement immunosuppresseur utilisé a provoqué des effets secondaires importants, et les conséquences d'une éventuelle réduction de ce traitement sur la réponse immune du receveur ne sont pas connues. Les résultats préliminaires actuels ne suggèrent pas que les avancées concernant la modification du donneur puissent permettre cette réduction. La connaissance des cibles des anticorps non dirigés contre les motifs Gal α 1-3Gal et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le rejet cellulaire sont donc essentielles pour pouvoir adapter les traitements, voire induire une tolérance du receveur vis-à-vis de son greffon.

Rejet cellulaire

Le rejet cellulaire est le type de rejet le plus fréquemment observé dans les modèles expérimentaux d'allogreffe. Il implique une activation oligoclonale des lymphocytes T. En xénotransplantation, l'obtention récente des porcs Gal-KO n'a pas encore permis d'étudier en détails les caractéristiques du rejet cellulaire des organes porcins dans les modèles de primates. Néanmoins, des études menées dans la combinaison hamster/rat ont montré que l'activation lymphocytaire est polyclonale, et qu'elle survient plus rapidement qu'en allogreffe, suggérant une grande diversité des peptides présentés [35]. Deux hypothèses, mutuellement non exclusives, coexistent : l'activation lymphocytaire résulterait d'une interaction directe avec des cellules présentatrices d'antigène (CPA) du donneur, ou d'une interaction avec des CPA du receveur présentant des peptides xénogéniques (voie indirecte). Bien que la voie indirecte de présentation antigénique soit sans aucun doute impliquée, la voie directe de présentation des xéno-antigènes peut être très importante. En effet, la réactivité croisée du TCR

(récepteur des cellules T) humain avec les CMH (complexes majeurs d'histocompatibilité) porcins, démontrée *in vitro* [36], est sensiblement du même ordre qu'en allogreffe; elle peut être inhibée par des anticorps dirigés contre les molécules du CMH porcine et contre les corécepteurs CD4 et CD8 ou les molécules de costimulation, notamment CD28, CD2 ou LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen 1*) [37]. Il existe donc une compatibilité moléculaire suffisante entre les CPA porcines et les lymphocytes T humains pour créer une synapse immunologique efficace permettant au rejet par la voie directe de survenir. À ce titre, l'expression constitutive d'activateurs de la costimulation (CD86) et l'expression inductible d'antigènes d'histocompatibilité de classe II par les cellules endothéliales porcines en font une cible permanente pour les lymphocytes humains par la voie directe de présentation xéno-antigénique [36]. Cette situation constitue une différence majeure par rapport à l'allogreffe où l'endothélium (humain) n'exprime pas de façon constitutive les molécules activatrices de la costimulation, et suggère que des porcs dont les gènes codant pour les molécules du CMH de classe II et pour la molécule CD86 ont été invalidés pourraient offrir d'importants avantages.

Tolérance xénogénique

En allogreffe, les risques infectieux ainsi que l'augmentation de l'incidence des cancers dus à l'immunosuppression actuellement utilisée en clinique conduisent les chercheurs à mettre au point des protocoles d'induction de tolérance. On recherche soit une tolérance totale (la greffe est fonctionnelle en l'absence de tout traitement immunosuppresseur), soit l'utilisation d'une immunosuppression minimale. Cette problématique revêt un intérêt fondamental en xénotransplantation, dans la mesure où les traitements immunosuppresseurs actuellement requis sont incompatibles avec la clinique humaine. L'induction d'une tolérance à l'allogreffe chez les primates peut être obtenue par une greffe de moelle osseuse qui, grâce à la création d'un chimérisme hématopoïétique, permet la délétion des clones alloréactifs dans le thymus. L'induction d'un chimérisme hématopoïétique permet également la survie prolongée des xéngreffes concordantes (babouin sur macaque) [38], mais pas des xéngreffes discordantes (porc sur babouin) [39]. La délétion des cellules T xénoréactives recherchée par les expériences de greffe de moelle peut également être obtenue - de manière semble-t-il plus efficace - par une greffe de fragments thymiques du donneur (Figure 1) : ces fragments peuvent être placés sous la capsule rénale plusieurs semaines avant le prélèvement, afin de permettre la création d'un environnement thymique vascularisé. Le jour de la greffe, c'est alors un « thymus-rein » qui est greffé et permet la délétion des lymphocytes T xénoréactifs [40]. Cette opération est associée à un taux de survie plus important des xéngreffes discordantes [32].

Les stratégies d'immuno-intervention fonctionnent-elles en xéno transplantation ?

Les modifications par génie génétique des tissus porcins, l'adaptation de l'immunosuppression, ainsi que les protocoles d'induction de tolérance ont eu un impact certain sur la survie moyenne des xéno greffes chez les primates. À présent, des survies de l'ordre de 2 à 4 mois peuvent être obtenues (Tableau 1). D'après ces résultats, les voies immunologiques à privilégier pour une application clinique semblent donc être une combinaison de modifications génétiques du donneur (dont Gal-KO) associées à l'induction d'une tolérance et à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Les modifications génétiques pourraient inclure la production de porcs dont les gènes codant pour CD86 ou pour les antigènes

du CMH de classe II ont été invalidés, ou de porcs surexprimant des inhibiteurs de la coagulation.

Risque sanitaire

À la différence de l'allogreffe, et à condition de maintenir les animaux dans des conditions EOPS (exemptes d'organismes pathogènes spécifiques), il est possible d'éviter la transmission de la plupart des agents infectieux, dont le cytomégalovirus [41]. Cependant, un risque majeur concerne les virus endogènes intégrés dans le génome porcine : les PERV (*porcine endogenous retrovirus*) A, B et C. *In vitro*, les PERV peuvent infecter de façon productive des cellules humaines [42]. Cependant, plusieurs études menées chez des patients ayant brièvement été en contact avec des tissus porcins n'ont pas montré de signes d'infection [43-45], ce qui suggère que cette transmission ne se produit pas *in vivo*. Néanmoins, le risque infectieux pourrait augmenter

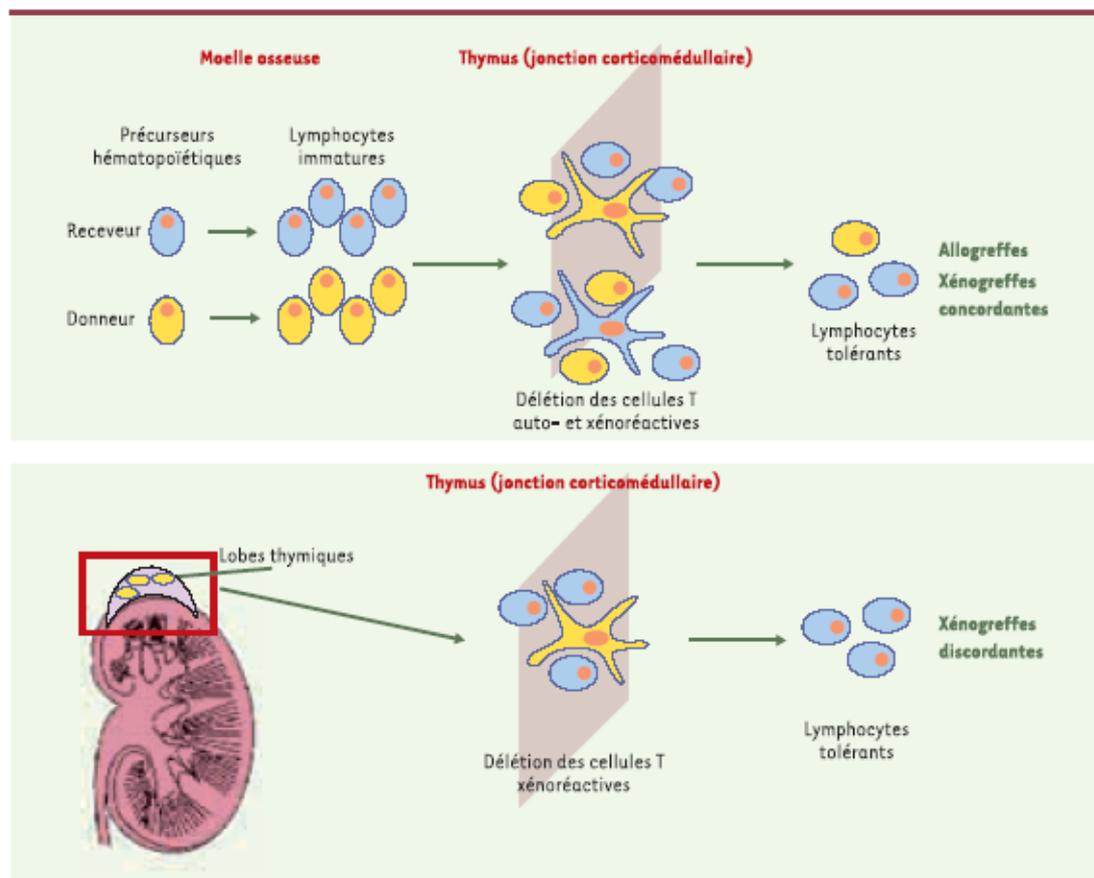


Figure 1. Chimérisme hématopoïétique et délétion thymique. Chez les primates, une greffe de moelle osseuse du donneur, préalablement à la greffe, peut induire un chimérisme hématopoïétique et la création d'un environnement thymique permettant la délétion des cellules T alloréactives et xénoréactives. La greffe de fragments de thymus porcine sous la capsule rénale avant la greffe permet la re-création d'un thymus porcine vascularisé, qui opère cette délétion thymique sans chimérisme hématopoïétique (le jour de la greffe, c'est alors un « thymus-rein » qui est greffé).

Annexe 3

Publications

Seveno C, Fellous M, Ashton-Chess J, Soulillou JP, Vanhove B. Les xéno greffes finiront-elles par se faire accepter ? *Med Sci (Paris)*. Mar;21(3):302-8. [Revue](#)

F. Haspot, **C. Séveno**, Haspot F, Seveno C, Dugast AS, Coulon F, Renaudin K, Usal C, Hill M, Anegon I, Heslan M, Josien R, Brouard S, Soulillou JP, Vanhove B. Anti-CD28 treatment induces allograft tolerance and TCR⁻ class II⁻ B7⁺ cells suppressing allogenic proliferative responses. *2005 Am J. Transpl*, 5 :2339

Guillonnet C, Aubry V, Renaudin K, **Seveno C**, Usal C, Tezuka K, Anegon I. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation*. 2005 80:546

Communications

C.Séveno et al

Endothelial cell activation in accommodated CTLA4-Ig-treated hamster heart xenografts after cyclosporin A withdrawal. **Seventh International Xenotransplantation Association Congress**, Göteborg, Sweden, september 10-14- 2005.

C.Séveno et al

Specific blockade of CD28/B7 and not CTLA4/B7 pathways induces B7⁺ regulatory cells acting through IDO activity **Basic Science Symposium** La Baule, France, June 19-22 2005 (poster commenté)

C. Séveno, et al.

Costimulation blockade delays the T cell mediated heart xenograft rejection in accommodated rats. **Seventh International Xenotransplantation Association Congress**, Glasgow, Scotland, september 30-october 04 2003. Transplantation Society. Travel Scholarship.

Prix

Prix Kerner de vulgarisation scientifique : Le CD28, une arme de précision dans la prévention des cancers associés à la greffe d'organe. Journée des Jeunes Chercheurs de l'ARC. Paris, France, 15 octobre 2005.

Posters

- **FOCIS 2004 18-23 juillet Montréal Canada**
- **XX International Congress of the Transplantation Society September 5-10 Vienna**
- **SFI 2004 Paris 20-23 Novembre**

C. Séveno, et al

Costimulation blockade independent rejection in accommodated rat recipients of hamster heart xenografts.

- **FOCIS 2004 18-23 juillet Montréal, Canada**
- **XX International Congress of the Transplantation Society September 5-10 Vienna**

C. Séveno, C. Guillonnet et al

CD40L and CD28 blockade induce regulatory mechanisms and inhibits chronic allograft rejection

- **Basic Science Symposium La Baule, France, June 19-22 2005**

C. Séveno, et al

Acute vascular rejection of accommodated, CTLA4-Ig-treated hamster heart xenografts after cyclosporin A withdrawal.

Etude de la pluralité des mécanismes régulateurs induits par le blocage de la costimulation en allo et xénotransplantation

De multiples voies de costimulation sont susceptibles d'influencer les réponses immunes en transplantation. Nous avons montré qu'un traitement d'induction associant un anticorps antiCD28 et la CSA génère des cellules régulatrices non-T contrôlant le rejet aigu mais pas le rejet chronique d'allogreffe cardiaque. En revanche, l'association antiCD28/CD40Ig abolit la vasculopathie et génère des cellules régulatrices d'un type différent.

En xénotransplantation, nous avons montré que le blocage de la costimulation est également immunosuppresseur. En particulier, la molécule CTLA4-Ig génère des cellules régulatrices différentes de celles obtenues en allotransplantation. Cependant, leur activité ne suffit pas à contrôler les réponses humorales qui, chez le rat, sont de type IgM T-indépendantes.

Ces études ont contribué à analyser les effets du blocage de la costimulation en transplantation, en particulier en ce qui concerne le caractère immunosuppresseur et inducteur de tolérance de certaines populations cellulaires dites régulatrices.

Mots Cles :Allogreffe, Xéno greffe, Costimulation, Cellules Régulatrices, Rat.

Study of the plurality of regulatory mechanisms induced by costimulation blockade in cardiac allo and xenotransplantation in the rat.

Several costimulation pathways influence the immune responses in transplantation. We have shown that an antiCD28 mAb associated with CSA can induce regulatory non-T cells that control acute but not chronic allograft rejection. In contrast, antiCD28 mAb associated with CD40Ig abolished the vasculopathy and generated a different type of regulatory cells.

In xenotransplantation, we observed that costimulation blockade is also immunosuppressive. Particularly, CTLA4-Ig can induce regulatory cells different from those obtained in allotransplantation. However, these cells can not control IgM T-independent humoral responses.

These studies contributed to the characterization of the effect of costimulation blockade. In particular, we analyzed the immunosuppressive and tolerogenic properties of regulatory cells.

Key words: Allograft, Xenograft, Costimulation, Regulatory cells, Rat.

Céline SEVENO
INSERM U643
30 bd Jean Monnet
44093 NANTES cedex