

Thèse de Doctorat

Simon VILLE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : **UMR1064**

Soutenue le *19/10/2015*

Thèse N° : 35

Modulation de la triade de costimulation CD28 / CD80-86 / CTLA-4 en transplantation rénale.

JURY

Rapporteurs : **Antoine DURRBACH**, Professeur, Praticien Hospitalier, GHU Paris-Sud - Hôpital de Bicêtre
Lionel ROSTAING, Professeur, Praticien Hospitalier, CHU de Toulouse, Hôpital Rangueil

Examineurs : **Agnes AZIMZADEH**, PhD, Associate Professor, University of Maryland School of medicine

Directeur de Thèse : **Gilles BLANCHO**, Professeur, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

Co-directeur de Thèse : **Bernard VANHOVE**, Directeur de Recherche INSERM, Université de Nantes

REMERCIEMENT.....	3
TABLE DES MATIERES.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	7
1 Aperçu de l’immunologie de la transplantation.....	7
1.1 Particularité de la réponse allo-immune.....	7
1.1.1. Quels sont les antigènes reconnus ? : La découverte du CMH et du HLA.....	7
1.1.2. L’autre fonction du CMH : La restriction au CMH.....	8
1.1.3. Pourquoi le CMH est-il si polymorphe ou pourquoi une greffe est-elle toujours allogénique ?.....	11
1.1.4. Pourquoi la réponse allo-immune est-elle si puissante : la reconnaissance directe.....	11
1.2 L’initiation de la réponse allo-immune.....	15
1.2.1. Activation de l’immunité innée, ou comment le processus de transplantation optimise la réponse allo-immune.....	15
1.2.2. Où se situe le rendez-vous entre les lymphocytes T et les allo-antigènes ?.....	16
1.2.3. La reconnaissance spécifique via le TCR conduit à plusieurs signaux.....	16
1.2.4. Le second signal : non spécifique mais instructif et nécessaire.....	17
1.2.5. Les différentes composantes du rejet.....	20
1.3 Les mécanismes de destruction du greffon : le rejet.....	20
1.3.1. Le rejet cellulaire.....	20
1.3.2. Le rejet humoral.....	22
2 La Triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4.....	27
2.1 Modèle classique.....	27
2.2 Nouveaux acteurs de la balance CD28 / CTLA-4.....	30
2.3 Dynamique de la Synapse Immunologique, et triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4.....	32
2.4 Fonction de CD28 au-delà du modèle classique.....	34
2.3.1. CD28 et la réponse mémoire.....	34
2.3.2. CD28 et lymphocytes T régulateurs.....	37
2.5 Fonction de CTLA-4.....	39
2.4.1. Les Fonctions extrinsèques de CTLA-4.....	40
2.4.2. Fonctions intrinsèques de CTLA-4.....	44
3 Le blocage de CD80-86 par le CTLA4-Ig.....	46
3.1 Développement expérimental et préclinique.....	47
3.2 Données cliniques.....	48
3.2.1. BENEFIT et BENEFIT EXT.....	48
3.2.2. Autres essais cliniques.....	49
3.3 Mécanismes de la résistance au blocage de la costimulation par le CTLA4-Ig.....	51
3.3.1. Les lymphocytes T régulateurs.....	51
3.3.2. L’immunité hétérologue.....	52
4 Le blocage sélectif de CD28.....	58
4.1 les Anticorps anti-CD28 divalents.....	58
4.1.1. Les anti-CD28 super-agonistes.....	58

4.1.2.	Les anti-CD28 conventionnels.....	58
4.2	Les anti-CD28 monovalents	61
4.2.1.	Le sc28AT	61
4.2.2.	Le FR104.....	62
4.2.3.	Le CD28 dAb.....	63
RESULTATS.....		66
Partie 1 – Article 1		66
4.3	Objectifs et présentation du travail	66
4.4	Discussion des résultats	82
5	Partie 2 – Article 2	85
5.1	Objectifs et présentation du travail	85
5.2	Discussion des résultats	116
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		120
CONCLUSIONS.....		131
BIBLIOGRAPHIE.....		133
ANNEXE.....		150

REMERCIEMENTS

Je remercie mes deux directeurs de thèse Gilles BLANCHO et Bernard VANHOVE pour leur encadrement complémentaire, ainsi que tous les membres de l'équipe 3 de l'UMR1064 en particulier Nicolas POIRIER, et plus largement l'ensemble des membres de l'ITUN, sans lesquels ce travail n'aurait pas été possible.

Merci également au soutien essentiel d'Alice et à celui, bien qu'il fut tardif, de Bérénice.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity

BCR : B cell Receptor

CAN : Chronic Allograft Nephropathy

CD : Cellule Dendritique

CG : Centre Germinatif

CM : Cross Match

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CmH : Complexe mineur d'Histocompatibilité

CNI : Calcineurin inhibitors

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

Cs : Corticostéroïdes

CsA : Ciclosporine

CSSM : Cell Surface Signaling Molecule

CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4

DSA : Donor Specific Antibody

Fc : Fragment constant

GVHD : Graft Versus Host Disease

HLA : Human Leukocyte Antigen

IDO : Indoleamine 2,3 – DiOxygénase

Ig : Immunoglobuline

IFN γ : Interferon gamma

IL : Interleukin

LCMV : Virus de la chorio-méningite lymphocytaire

KO : Knock Out

MC : Micro-Cluster

MICA : MHC-class-I-polypeptide-related sequence A

MMF : Mycophenolate mofétil

NK : Natural Killer

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns

PPRs : Patterns Recognition Receptors

PTK : Protéine Tyrosine Kinase

PTLD : Post Transplantation Lymphoproliferative Disease

SAL : Serum Anti Lymphocytaire

SI : Synapse Immunologique

SMAC : Supra-Molecular Activation Complexe

TCR : T Cell Receptor

Tfh : T follicular helper

Th : T helper

TLRs : Toll Like Receptors

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

Treg : lymphocyte T régulateurs (n : naturels ; i : induits)

TSDR : Treg Specific Demethylation Region

WT : Wild Type (sauvage)

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Le chargement des peptides par les molécules de CMH de classe I et de classe II	10
Figure 2 : Les voies de reconnaissance par les lymphocytes T allogéniques	14
Figure 3 : L'activation du lymphocyte T, du signal 1 au signal 3.	19
Figure 4 : La voie classique du complément et le marquage par le C4d.	26
Figure 5 : Le rejet humoral un processus évolutif.	26
Figure 6 : Représentation classique de la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4.....	29
Figure 7 : « Quintet » de la costimulation prenant en compte les dernières données concernant l'interaction CD80 / PD-L1 et ICOS-L / CD28.	31
Figure 8 : Principales fonctions intrinsèques et extrinsèques de CTLA-4.	43
Figure 9 : Les différents types d'anticorps anti-CD28 divalents et leur mode de fonctionnement.	60
Figure 10 : les différents types de fragments monovalents antagonistes d'anticorps anti- CD28, concept de blocage sélectif / non-sélectif de la balance CD28/CD80-86/CTLA-4. ...	65
Figure 11 : La dépendance vis-à-vis de CD28 et la régulation médiée par CTLA-4 varient tout au long de la maturation des cellules T.	123
Figure 12 : Proposition d'explication de l'effet différentiel entre blocage sélectif et non sélectif de CD28.....	127
Figure 13 : Différentes phases de la réponse allo-immune et blocage de la costimulation..	130

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION.

1 APERÇU DE L'IMMUNOLOGIE DE LA TRANSPLANTATION

Dès 1924, un chirurgien réalisant des greffes de peau sur des enfants brûlés rapportait que les greffes ultérieures étaient rejetées plus rapidement que la première, laissant supposer une « sensibilisation » vis-à-vis du donneur sain (1). L'immunologie de la transplantation était née. Son étude allait permettre de décrypter le système immunitaire bien au-delà de la transplantation. L'objectif ultime de l'immunologiste de la transplantation est l'obtention d'une tolérance du receveur vis-à-vis du transplant, ce n'est aujourd'hui encore qu'une perspective car, même si ce n'est pas la fonction originelle du système immunitaire, la transplantation d'un organe allogénique (entre individus d'une même espèce mais génétiquement différents) va provoquer une puissante réaction qualifiée de réponse allo-immune, qui aboutit au rejet.

En effet le système immunitaire est capable de discriminer le soi du non soi, et c'est la reconnaissance d'antigènes du non soi qui va déclencher l'activation de la réponse immune. Mais pourquoi au sein d'une même espèce un individu donné va reconnaître comme étrangères les cellules d'un autre individu ? La réponse à cette question constitue la clé de compréhension des particularités de l'immunologie de la transplantation.

Après cette première étape de reconnaissance, la réponse allo immune va se déployer progressivement pour aboutir à la mise en place de mécanismes effecteurs menant au rejet du greffon. La vision de ce dernier a considérablement évolué parallèlement au progrès de sa prise en charge.

1.1 PARTICULARITE DE LA REPOSE ALLO IMMUNE.

1.1.1. QUELS SONT LES ANTIGENES RECONNUS ? : LA DECOUVERTE DU CMH ET DU HLA

La clé permettant d'appréhender au mieux la réponse allo immune est de déterminer quels sont les antigènes reconnus par le système immunitaire comme étranger dans ce contexte

si particulier et non physiologique. Cette question a été en grande partie élucidée par George Snell et Peter Medawar en 1950, lorsqu'ils établirent les règles de base de l'immunologie de la transplantation à partir de greffe de peau entre des lignées de souris « inbred » c'est-à-dire homozygote pour l'ensemble du génome. Lorsque l'on réalise une greffe de peau entre deux individus d'une même lignée (greffe syngénique), on n'observe pas de rejet. A l'inverse la greffe de peau d'un donneur A à un receveur B (greffe allogénique) est toujours rejetée. Les souris issues d'un accouplement entre deux lignées (A x B) ne rejettent pas la peau issue de leur parent (A ou B), l'inverse étant faux.

La conclusion de ces expériences était qu'au sein d'une même espèce, il existe des gènes polymorphes c'est à dire différents d'un individu à l'autre, chaque variant étant un allèle, qui sont hérités des parents, exprimés dans les tissus de façon codominante et dont les produits constituent les antigènes reconnus responsables du rejet de greffe.

Par la suite il était montré que ces gènes, codant pour ces antigènes tissulaires spécifiques d'un individu, se situaient sur des locus particuliers qui étaient par la suite nommé complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Chez l'homme, c'est Jean Dausset (Prix Nobel 1981) qui le premier identifia ces antigènes via la mise en évidence d'anticorps dirigés contre les leucocytes et apparus à la suite de transfusion ou de grossesses. Ils furent appelés Human Leukocyte Antigens (HLA).

1.1.2. L'AUTRE FONCTION DU CMH : LA RESTRICTION AU CMH.

Pendant presque 20 ans le seul rôle documenté pour le CMH était le rejet de greffe. De tels gènes auraient-ils été conservés à travers l'évolution uniquement à des fins de discrimination entre individus ?

C'est en 1975 que le véritable rôle du CMH fut découvert, il réside dans la présentation des antigènes sous forme de peptides aux lymphocytes T qui reconnaissent l'association CMH/peptide via leur récepteur (T Cell Receptor, TCR). Le CMH est donc au centre de la réponse immunitaire spécifique, adaptative.

En effet le CMH se compose de deux types de gènes, les classes I, comprenant les locus HLA A, B, C et les classes II, comprenant les locus HLA DR, DQ et DP, qui codent pour les

molécules du même nom. L'ensemble des allèles présents sur un chromosome est appelé haplotype.

Les molécules de classe I sont présentes sur toutes les cellules, à l'exception des globules rouges, elles présentent des peptides cytosoliques issus de la dégradation par le protéasome de protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique par la cellule. Elles sont reconnues majoritairement par les lymphocytes T CD8.

Les molécules de classe II sont présentes sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) à savoir les cellules dendritiques (CD), les macrophages et les lymphocytes B, elles présentent des peptides issus de l'environnement extracellulaire après internalisation et dégradation dans des lysosomes. Elles sont reconnues majoritairement par les lymphocytes T CD4.

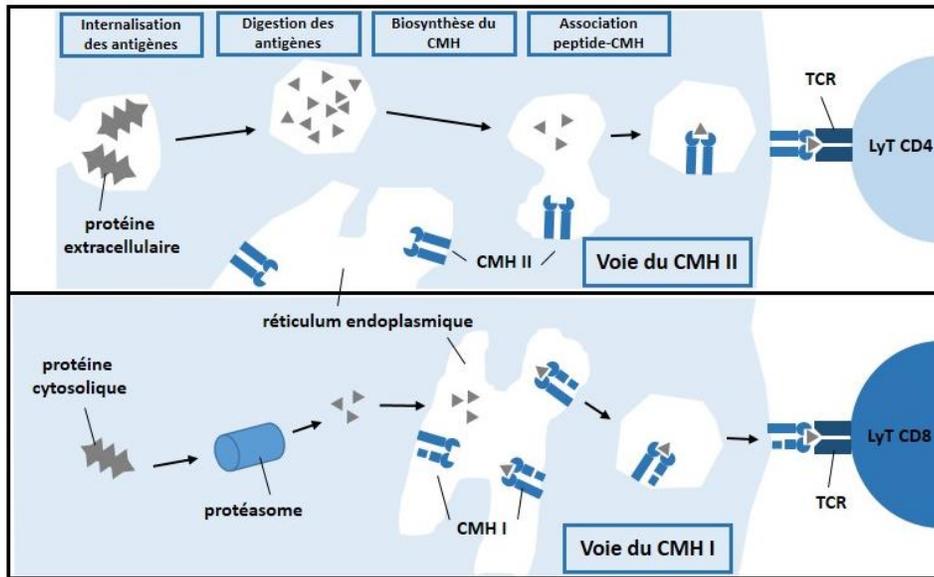


Figure 1 : Le chargement des peptides par les molécules de CMH de classe I et de classe II

1.1.3. POURQUOI LE CMH EST-IL SI POLYMORPHE OU POURQUOI UNE GREFFE EST-ELLE TOUJOURS ALLOGENIQUE ?

Le CMH est le système génique le plus polymorphe du génome, la nomenclature HLA l'illustre bien. Initialement, elle était basée sur la réactivité d'allo-sérum décrivant ainsi des antigènes. En se limitant aux produits des locus HLA-A, -B et -DR les plus relevant en transplantation il y a 88 antigènes différents. Avec l'émergence de la biologie moléculaire une nouvelle nomenclature allélique a été établie, à ce jour plus de 1000 allèles ont été identifiés et cette classification est en évolution permanente. Ainsi la probabilité que deux individus de la même espèce aient le même assortiment de molécules HLA est très faible, ce qui constitue une des limites immunologiques à la transplantation.

Mais pourquoi les gènes du CMH sont-ils aussi polymorphes ? Une des pierres angulaires de la réponse immunitaire adaptative est l'extraordinaire diversité du répertoire T (environ 10^9 TCR différents possibles) qui permet la reconnaissance spécifique d'une multitude d'antigènes. Cette diversité est le fait d'une combinaison de réarrangement des nombreux gènes des régions variables du TCR et pas le fait d'un polymorphisme. Le système immunitaire de chaque individu est donc capable de reconnaître virtuellement tous les antigènes peptidiques des différents pathogènes.

La limite de ce système est que chaque individu a une capacité de présentation des antigènes dépendante de son propre assortiment de molécule HLA. Par conséquent, au niveau individuel, il est possible de ne pouvoir présenter l'épitope dominant d'un micro-organisme donné et donc d'être démuné face à cette infection. Ainsi, c'est la pression de sélection exercée par les pathogènes qui est à l'origine du polymorphisme du CMH. Les espèces ont évolué afin qu'au niveau de la population, il y ait toujours des individus capables de répondre efficacement à un pathogène donné (2). Le polymorphisme du CMH est donc un atout indéniable pour l'espèce humaine, jusqu'à ce que les humains décident de réaliser des greffes.

1.1.4. POURQUOI LA REPONSE ALLO-IMMUNE EST-ELLE SI PUISSANTE : LA RECONNAISSANCE DIRECTE.

La réaction allo immune est unique de par son ampleur. En effet, il s'agit de la seule réponse primaire, sans exposition préalable à l'antigène, qui peut être observée in vitro. La première voie de présentation est la même que pour tout autre antigène microbien, à savoir l'association d'un peptide, issu de la dégradation d'une molécule de CMH allogénique du donneur, avec une molécule de CMH du receveur située sur une cellule présentatrice de l'antigène de ce dernier. Il y a donc une restriction au propre-CMH, c'est la présentation indirecte. Notons que des peptides issus de gènes polymorphes autres que le CMH peuvent être présentés et reconnus, il s'agit des antigènes mineurs d'histocompatibilités (CmH, Complexe mineur d'Histocompatibilité).

Néanmoins cela ne suffit pas à expliquer l'intensité de la réaction allo-immune. L'explication est que la réponse allo-immune est la seule qui n'est pas restreinte au CMH : certains TCR du receveur reconnaissent une molécule du CMH du donneur sans apprêtement : c'est la présentation directe(3–5) (cf **figure 2**). Les lymphocytes T du receveur ayant cette capacité de reconnaissance des cellules du donneur sont dits allo-réactifs. Bien que le CMH soit polymorphe, les variations tenues entre les différentes molécules HLA expliquent l'importance du répertoire allogénique direct : en moyenne 10% de l'ensemble des cellules T.

De plus lors de la reconnaissance directe, toutes les molécules de CMH d'une cellule présentatrice peuvent être reconnues, contrairement à la réponse indirecte où pour un TCR donné, seul 1% des complexes CMH/peptides sont spécifiques de ce clone T, cette théorie de la densité élevée des allo-antigènes pourrait expliquer l'intensité de la réponse.

Enfin, beaucoup de lymphocytes T allo réactifs sont des cellules mémoires issues de précédentes réponses antimicrobiennes, en particulier antivirales, qui croisent avec le CMH du donneur. Ces cellules répondent plus rapidement lors d'une restimulation, c'est l'immunité hétérologue dont la relevance clinique a bien été démontrée (6,7).

Au début de la greffe la voie directe est prépondérante. Puis les CPA du donneur disparaissent progressivement et ne restent que les cellules parenchymateuses et endothéliales du donneur qui sont des CPA "défectueuses". En revanche la voie indirecte sur les cellules présentatrices du receveur est disponible aussi longtemps que le greffon reste en place, elle devient donc prépondérante à long terme.

Notons que la présentation semi-directe est un troisième mode de présentation, c'est la capture par un CPA du receveur d'une molécule de CMH du donneur qui est présentée intacte, le poids de ce phénomène dans la cadre de la réponse allo-immune demeure à être élucidé.

L'obstacle immunologique à la transplantation s'explique donc par le fait que le produit du locus le plus polymorphe du génome, soit l'élément reconnu par le TCR, dont les variations d'un individu à l'autre sont suffisamment minces pour induire le système immunitaire en erreur via la reconnaissance directe.

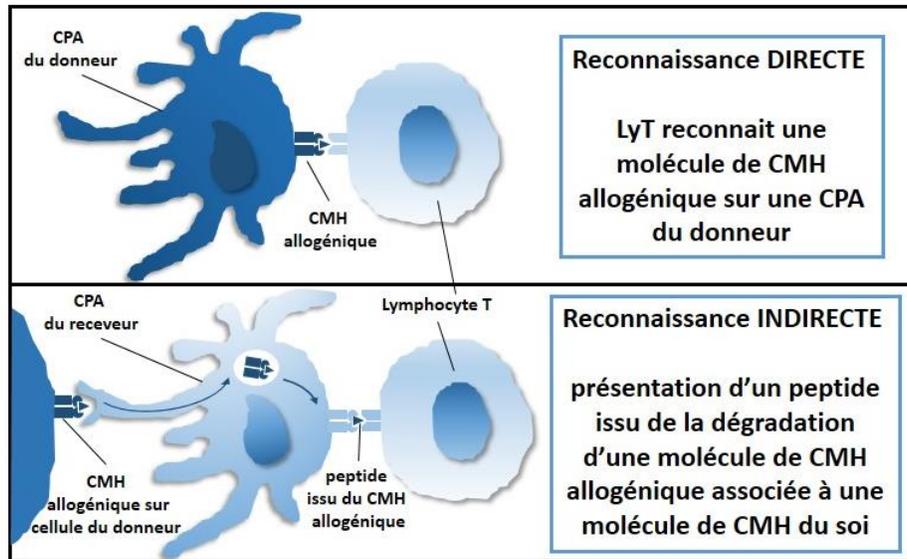


Figure 2 : les voies de reconnaissance par les lymphocytes T allogénique

1.2 L'INITIATION DE LA REPONSE ALLO IMMUNE.

1.2.1. ACTIVATION DE L'IMMUNITE INNEE, OU COMMENT LE PROCESSUS DE TRANSPLANTATION OPTIMISE LA REPONSE ALLO-IMMUNE.

L'immunité innée contrairement à l'adaptative ne reconnaît pas des antigènes de façon spécifique, mais des motifs partagés par de nombreux micro-organismes, les motifs moléculaires associés à des pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns : PAMPs). Ils sont reconnus par des récepteurs spécifiques de ces motifs (Patterns Recognition Receptors : PRRs) comme la famille des Toll Like Receptors (TLRs), présent sur les cellules de l'immunité innée dont les CPA, principales CPA.

Initialement les immunologistes de la transplantation se sont plus consacrés à la réponse spécifique, pensant que l'immunité innée n'intervient pas dans la réponse allo immune dont on a exposé la spécificité ci-dessus, et qui n'implique pas de pathogène.

Néanmoins deux données doivent être prises en compte. Premièrement comme l'avait imaginé Matzinger dans son « Danger Model »(8), les agents infectieux ne sont pas les seuls à pouvoir activer l'immunité innée, les tissus agressés et donc endommagés libèrent des damages associated molecular patterns (DAMPs) reconnus par les PRRs. Or, lors du processus de transplantation le greffon va subir de nombreuses agressions : avant le prélèvement lors de la mort encéphalique ou pire de l'arrêt cardiaque, lors du conditionnement via l'ischémie froide et lors de la chirurgie via l'ischémie chaude et surtout la reperfusion (9,10).

Deuxièmement, l'immunité innée et adaptative ne sont pas indépendantes l'une de l'autre, elles sont au contraire étroitement liées. L'activation non spécifique, via les TLRs principalement, va induire un environnement propice et initiateur de la réponse immunitaire adaptative. Cela passe par la maturation des CPA en particulier les CPA qui vont optimiser leur capacité de présentation de façon quantitative mais surtout qualitative via l'expression de molécules de costimulation qui constitue le second signal, essentiel à l'activation des lymphocytes. D'autre part, le greffon va être perçu comme une zone d'inflammation via la présence de cytokines pro inflammatoires : interleukine 1 (IL-1), IL-6, interféron de type I, chimiokines (cytokines chemo attractantes) et l'activation des cellules endothéliales va induire

l'expression de molécules d'adhésion (sélectines et intégrines) qui vont telle des herbes, arrêter les leucocytes permettant leur recrutement au sein du greffon (11).

Ainsi, du fait même de la procédure clinique de transplantation et avant même sa mise en contact avec le système immunitaire du receveur, tous les éléments sont présents au sein du greffon pour favoriser la survenue d'une réponse immunitaire spécifique.

1.2.2. OU SE SITUE LE RENDEZ-VOUS ENTRE LES LYMPHOCYTES T ET LES ALLO-ANTIGENES ?

Le déclampage permet la mise en contact des lymphocytes du receveur avec les CPA du donneur inaugurant ainsi la composante spécifique de la réponse allo-immune. Des données expérimentales suggèrent que les CPA du donneur présentes dans le greffon, ayant mûri du fait de la présence de signaux de danger, migrent vers les ganglions lymphatiques drainant où elles rencontrent les lymphocytes de l'hôte. En effet, les souris dépourvues d'organe lymphoïde périphérique sont incapables de rejeter une greffe de cœur (12). Néanmoins, le lieu de la rencontre n'est peut-être pas le même pour toutes les catégories de lymphocytes. Ainsi les cellules endothéliales du greffon peuvent activer les CD8 du receveur par reconnaissance directe du CMH de classe I (13), cette relative indépendance vis-à-vis des organes lymphoïdes est probablement exacerbée pour les cellules mémoires participant à l'immunité hétérologue.

1.2.3. LA RECONNAISSANCE SPECIFIQUE VIA LE TCR CONDUIT A PLUSIEURS SIGNAUX

Le terme de signal est très présent en immunologie de la transplantation pour décrire les différentes phases de l'activation de la cellule dominante de la réponse allo-immune à savoir le lymphocyte T. Cette description a l'avantage d'explicitier les différentes voies sur lesquelles il est possible d'agir pour endiguer la réponse allo-immune et ainsi de classer les immunosuppresseurs en fonction (14).

Le premier signal est celui consécutif à la reconnaissance spécifique par le TCR du complexe CMH-peptide présenté par la CPA. Cet engagement va déclencher la réorganisation spatiale d'un ensemble de molécules membranaires aboutissant à la formation d'une synapse immunologique. Au niveau intracellulaire, ce nouvel agencement va permettre la mise en

contact du complexe TCR-CD3 avec des protéines tyrosines kinases (PTK) qui vont phosphoryler les motifs ITAMs de CD3, s'en suit le recrutement d'une autre PTK, ZAP70 qui conduit à une cascade de phosphorylation en particulier de 2 protéines adaptatrices : LAT et SLP-76 formant ainsi le complexe de signalisation proximal. A partir de ce dernier vont s'activer, pour simplifier, 3 voies de signalisation aboutissant au passage intranucléaire de facteurs de transcription : la voie des MAP kinases aboutissant à AP-1, celle de la PKC aboutissant à NF-KappaB et enfin celle du calcium et de la calcineurine aboutissant à NFAT (15). L'action de ces facteurs de transcription va principalement conduire à la synthèse d'IL-2 et à l'expression de la chaîne alpha de haute affinité de son récepteur (CD25). L'IL-2 et d'autres cytokines de prolifération vont agir de façon autocrine et paracrine délivrant ainsi le signal 3, transduit par la voie du mTOR, qui va conduire à l'expansion clonale des lymphocytes T activés. La prolifération cellulaire requiert la synthèse de nucléotides, purines et pyrimidines, c'est à ce niveau qu'agissent les immunosuppresseurs antiprolifératifs.

1.2.4. LE SECOND SIGNAL : NON SPECIFIQUE MAIS INSTRUCTIF ET NECESSAIRE

L'importance du second signal dit de costimulation pour la réponse alloimmune n'est plus à démontrer. En effet l'étude comparative des réponses xéno et allogénique par Lafferty et Jones à la fin des années 60 est à l'origine même de ce concept (16,17). Ils avaient remarqué que paradoxalement, plus l'espèce du donneur est distincte de celle du receveur, moins la réponse du receveur est intense. Ils firent donc l'hypothèse que quelque chose d'autre que l'antigène, spécifique d'espèce, était nécessaire à l'activation des lymphocytes. Ils appelèrent ce second signal l'« allogenic stimulus », qui devint lorsqu'il fut étendu à l'ensemble des réponses T, le signal de costimulation qui s'intégrait au modèle du second signal précédemment décrit par Bretscher et Cohn (18).

Le signal 1 est spécifique, même si (cf. supra) il peut être pris à défaut dans le cadre de la reconnaissance directe. En revanche il n'apporte pas d'information sur l'environnement, le contexte dans lequel l'antigène est présenté. Cette information essentielle est apportée par le second signal dit de costimulation. Au même titre que le premier signal, il est nécessaire à l'activation des lymphocytes T et constitue de ce fait une cible thérapeutique privilégiée. Il est apporté de part et d'autre de la synapse immunologique, par l'engagement de molécules de costimulation présentes sur les lymphocytes avec leurs ligands exprimés par les CPA. Ces

dernières après avoir capté des signaux de danger via leur PRRs, vont surexprimer CD80/86, ligands de CD28 molécule de costimulation activatrice majeure exprimée de façon constitutive par les lymphocytes T. De façon quasi contemporaine CD40L, autre molécule de costimulation majeure exprimée par les lymphocytes activés, va s'engager avec son récepteur CD40 présent sur les CPA renforçant l'activation de ces dernières avec un effet de boucle d'amplification. Le signal 2 joue également un rôle essentiel dans la contraction de la réponse immune, prévenant tout emballement de cette dernière qui pourrait être délétère. Ainsi dans les suites de leur activation, les lymphocytes T vont exprimer CTLA-4, molécule de co-inhibition dont le ligand est aussi CD80/86 mais avec une affinité très supérieure que pour CD28. Ainsi, dès l'expression de CTLA-4, une compétition s'engage et l'interaction inhibitrice CD80/86 / CTLA4 prend le pas sur CD80/86 / CD28. Il en résulte une inhibition de la réponse après 48 à 72 heures nécessaire à l'équilibre homéostatique. Récemment, la vision de la costimulation s'est encore complexifiée avec la découverte de nombreuses interactions activatrices ou inhibitrices qui forment un panel variable en fonction de l'environnement, du site anatomique, du degré de différenciation des lymphocytes/CPA. C'est de l'intégration de l'ensemble de ces signaux que résultent non seulement l'intensité mais aussi l'orientation de la phase effectrice de la réponse immune (19).

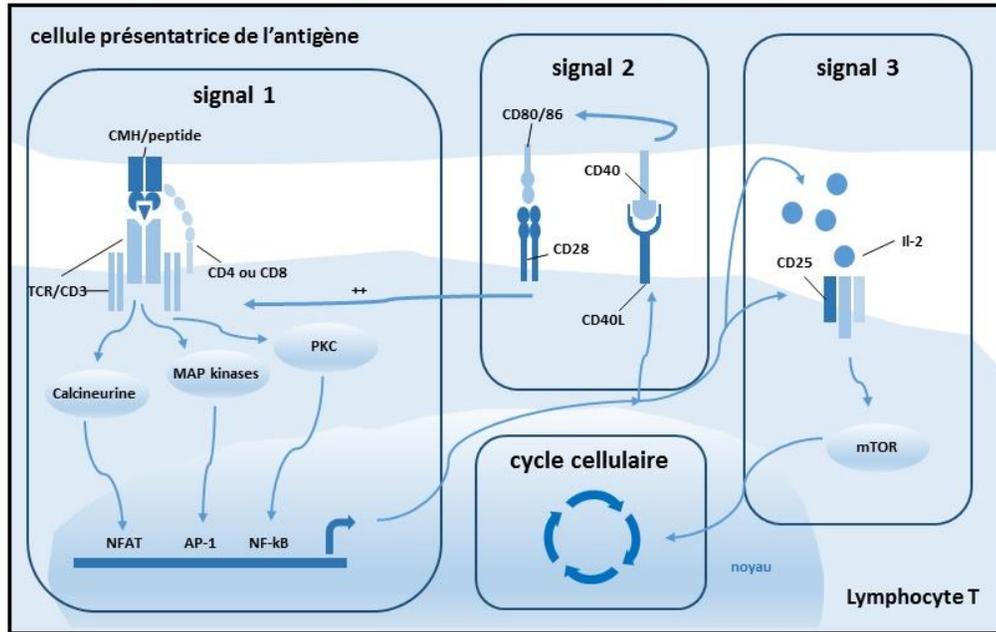


Figure 3 : l'activation du lymphocyte T, du signal 1 au signal 3.

1.2.5. LES DIFFERENTES COMPOSANTES DU REJET

Après l'étape de la reconnaissance, vient celle de l'orientation vers les différentes composantes effectrices de la réponse allo immune. Le moteur de cet agencement est le lymphocyte T CD4 helper (CD4 Th) dont il existe différents types. En fonction du micro-environnement, représenté principalement par les cytokines, influencé par de très nombreux éléments, les CD4 Th après leur activation vont se différencier en différentes catégories exprimant un facteur de transcription spécifique et une signature cytokinique déterminant leurs capacités fonctionnelles. Pour simplifier, les CD4 Th1, via la sécrétion d'interféron gamma (IFN γ) et d'IL-2 vont influencer sur les deux principales composantes du rejet cellulaire. D'une part l'activation des macrophages et des monocytes conduisant à une réaction d'hypersensibilité retardée. D'autre part la différenciation des CD8 en lymphocyte T cytotoxique (CTLs). Celle-ci est consécutive à une interaction entre trois cellules : le CD4 Th via l'interaction CD40L-CD40 habilite la CPA qui permet ainsi la différenciation du CD8 auquel elle présente l'antigène. Par ailleurs les Th2 via l'IL-4 et l'IL-5 mais aussi les Th1 via l'IL-2 et l'IFN γ et les helper folliculaires (Tfh) via IL-21 et surtout les molécules de costimulation CD28 et CD40L vont permettre la constitution d'une réponse humorale efficace en agissant sur les lymphocytes B, ces derniers étant préalablement activés par la reconnaissance via leurs récepteurs (Immunoglobuline de membrane correspondant aux anticorps qu'ils produiront par la suite).

1.3 LES MECANISMES DE DESTRUCTION DU GREFFON : LE REJET

Classiquement la phase effectrice de la réponse allo immune est regroupée sous le terme de rejet. Initialement les rejets étaient décrits chronologiquement selon leur délai de survenue : hyperaigu (<24h), aigu et chronique. Les progrès de l'immunologie de la transplantation ont permis de superposer une seconde grille de lecture à savoir le mécanisme effecteur principal : cellulaire ou humoral. Dans l'avenir cette nosologie est amenée à se complexifier avec la description de phénotype de rejet de plus en plus précis.

1.3.1. LE REJET CELLULAIRE

Il s'agit de la première forme de rejet à avoir été identifié et défini. En effet dès 1953, Jean Hamburger décrit au décours de la première greffe rénale, l'association d'une symptomatologie associant oligurie, fièvre, HTA et protéinurie à un infiltrat de cellules mononuclées sur l'anatomopathologie. Cette « crise du transplant » correspondait au rejet aigu cellulaire, et présentait la particularité d'être sensible à une corticothérapie à forte dose. Jusqu'à récemment l'efficacité des stratégies thérapeutiques développées en transplantation d'organe était jugée essentiellement sur la prévention de sa survenue.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, du fait de l'activation du système immunitaire inné, avant même le déclampage, le greffon est le site d'une inflammation qui va conduire à l'accumulation de chimiokines en son sein. Parallèlement les récepteurs spécifiques de ces dernières vont être surexprimés par les lymphocytes suite à leur activation dans les organes lymphoïdes périphériques, d'où ils vont migrer vers le greffon selon un gradient (20). De la même façon, l'endothélium suite à l'agression que constitue la greffe, va surexprimer des molécules d'adhésions : sélectines et intégrines dont les ligands sont exprimés par les leucocytes activés. L'interaction entre la principale sélectine VCAM-1 et son ligand VLA-4 va permettre un roulement des leucocytes suivi d'une adhésion ferme puis d'une migration médiées par des intégrines, ICAM-1 et son ligand LFA-1 par exemple, et encore une fois des chimiokines (21). De nouveau, ces différentes molécules bien que redondantes peuvent être la cible d'un traitement visant à empêcher l'infiltration du transplant. Ainsi cette composante de la réponse alloimmune est parfois assimilée à un cinquième signal.

Un infiltrat de cellules mononuclées va se constituer à partir d'une unité fondamentale constituée d'une cellule T, récemment activée ou mémoire qui reconnaît son antigène spécifique, autour de laquelle vont être recrutés des macrophages et des monocytes mais aussi d'autres lymphocytes T non spécifiques CD4, CD8 effecteurs, effecteurs mémoires. Dans ce contexte, l'altération de la fonction du greffon va être la conséquence d'une réaction d'hypersensibilité retardée, à savoir l'activation non spécifique des macrophages et des monocytes par la synthèse de cytokines proinflammatoires telles que l'IFN γ ou le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α). Cette activation va aboutir à la production d'enzymes protéolytiques et de facteurs solubles qui entretiennent le processus inflammatoire (22).

L'autre mécanisme impliqué dans le rejet cellulaire est la cytotoxicité directe exécutée par les CD8 cytotoxiques après reconnaissance de leur cible spécifique à savoir les molécules CMH de classe I du donneur. Elle est la conséquence soit de l'exocytose de granules contenant des molécules cytotoxiques (granzyme B, perforine) soit de l'engagement de FasL à Fas son ligand, présent sur la cellule cible, qui vont induire l'apoptose via la voie des caspases.

1.3.2. LE REJET HUMORAL

Le rejet hyperaigu

Dès 1966, le rôle des anticorps dirigés contre le greffon est mis en évidence avec la description par Kissmeyer-Nielsen du rejet hyperaigu. Dans ce cas les anticorps IgG anti-HLA spécifique du donneur sont présents avant la transplantation. Ils sont la conséquence d'une immunisation préalable soit lors d'une transfusion sanguine, soit chez les femmes au cours d'une grossesse. Le même phénomène survient en cas d'incompatibilité ABO, où dans ce cas les anticorps naturels sont dirigés contre les antigènes des groupes sanguins. Le rejet hyperaigu est donc l'archétype du rejet humoral, Il survient dans les minutes ou les heures qui suivent le rétablissement de la perfusion du rein transplanté. Les alloanticorps vont agir très vite puisqu'ils vont cibler l'élément avec lequel ils sont directement en contact, à savoir l'endothélium vasculaire. La description des fonctions effectrices des anticorps permet de souligner encore une fois l'interconnexion entre système immunitaire adaptatif et inné. En effet ce dernier en plus de créer un environnement qui facilite l'activation de la réponse spécifique, fournit un ensemble de mécanismes effecteurs, qui vont être le « bras armé » de la réponse immunitaire (exemple de l'hypersensibilité retardée du rejet cellulaire). Pris isolément, les anticorps n'ont pas d'activité effectrice, ils font donc appel à un des principaux éléments du système immunitaire inné : le complément. Il s'agit d'un vaste ensemble de protéines essentiellement sériques, qui à l'état basal sont inactives. Il existe trois voies d'activation du complément, la voie classique, la voie alterne et celle des lectines ne font pas intervenir le système immunitaire adaptatif puisqu'elles sont déclenchées par la reconnaissance de PAMPs. En revanche, l'étape inaugurale de la voie dite classique est la fixation d'une protéine du complément C1 suivi de celle de C4, à la partie constante d'anticorps préalablement fixé à une cellule via leur antigène. Dans tous les cas, l'activation du complément va induire une cascade de réaction qui va aboutir à une issue commune : la formation du complexe d'attaque

membranaire qui provoque la lyse de la cellule cible. Parallèlement des fragments protéolytiques, les anaphylatoxines, issus du clivage de différentes protéines du complément, vont provoquer une inflammation aiguë en activant les mastocytes et les polynucléaires neutrophiles (cf **figure 4**). Dans le cas du rejet hyperaigu, l'activation massive du complément par les alloanticorps est responsable de la destruction de l'endothélium vasculaire. La libération de facteur procoagulant qui s'en suit, associée à l'exposition des tissus sous endothéliaux, est à l'origine de thromboses étendues surtout de la micro-circulation.

Dès 1969 Patel et Terasaki décrivent le principe du cross-match (CM) consistant à mettre en contact le sérum du receveur avec les lymphocytes T et B du donneur, ceux-ci étant lysés de façon dépendante de complément en cas de présence d'alloanticorps dans le sérum.

Ainsi la négativité du CM associée au respect des règles de compatibilité ABO permettra de se prémunir du rejet hyperaigu qui dès lors ne représentera plus une limite à la transplantation.

Le rejet humoral aigu

Les immunologistes de la transplantation vont alors délaisser la réponse humorale pendant de nombreuses années. Deux éléments vont changer la donne. Premièrement le développement de stratégie immunosuppressive très efficace pour prévenir le rejet cellulaire va fortement diminuer leur incidence et ainsi faire émerger d'autres types de rejet jusqu'alors qualifiés de corticorésistants ou de vasculaires. Deuxièmement, bien qu'il existait des spéculations sur la responsabilité des anticorps dans la survenue de rejets, l'absence de marqueur histologique spécifique rendait la communauté scientifique septique quant à leur véritable implication. En effet les anticorps forment de fragiles liaisons hydrostatiques avec leurs antigènes rendant tous marquages impossibles. Le tournant survient dans les années 90, quand Feucht décrit le marquage du C4d, produit de dégradation sans activité biologique du C4, une des principales protéines du complément impliquée dans la voie classique, qui formant des liaisons covalentes reste fixé aux membranes cellulaires à long terme. Il constitue ainsi une empreinte témoignant d'une activité humorale dépendante du complément (23)(cf **figure 4**). Parallèlement les techniques de détection des anticorps anti-HLA se sont progressivement améliorées en termes de sensibilité et de spécificité. Ainsi, il est devenu clair qu'au-delà du

rejet hyperaigu, les anticorps dirigés contre le greffon pouvaient être responsables de phénomènes immunologiques à plus long terme (24).

Les cibles antigéniques reconnues par les lymphocytes B via leur B Cell Receptor (BCR) sont les molécules HLA de classe I et II allogénique du donneur, mais aussi des protéines appartenant au CMH comme le MHC-class-I-polypeptide-related sequence A (MICA). Comme nous l'avons vu ci-dessus après l'activation des lymphocytes B via leur BCR, le développement de la réponse humorale requiert l'aide de lymphocytes T CD4 helper via des cytokines et des molécules de costimulation, s'en suit la commutation isotypique en particulier vers les IgG et la maturation d'affinité par hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines. Enfin les cellules B vont se différencier en plasmocytes qui vont migrer dans la moelle osseuse et produire des anticorps (25). La cible privilégiée des alloanticorps est la cellule endothéliale. Comme pour le rejet hyperaigu l'activation par les anticorps fixés à leur antigène de la voie classique du complément est à l'origine du rejet. Néanmoins les données clinico-biologiques et d'anatomopathologies laissent supposer que certains rejets humoraux sont « C4d négatif ». Cela est possiblement dû à un manque de sensibilité de ce marqueur mais surtout à l'implication de mécanismes indépendants du complément. En effet, les macrophages et les lymphocytes Natural Killer (NK) possèdent un récepteur (CD16) pour la partie Fc des IgG. Ils peuvent ainsi se lier aux anticorps fixés sur leur cible antigénique, celle-ci va alors être détruite par opsonisation ou cytotoxicité (Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity, ADCC). Des données récentes ont confirmé la participation de ce phénomène au rejet humoral (26). De plus la fixation des molécules de CMH par les alloantigènes peut avoir un effet direct sur les cellules endothéliales, à savoir une activation voir une prolifération. Ces mécanismes sont également probablement impliqués dans le rejet humoral chronique.

Comme nous l'avons dit ci-dessus l'avènement de puissants immunosuppresseurs a permis de réduire l'incidence des rejets aigus cellulaires et donc d'améliorer la durée de vie des greffons. Mais depuis, peu de progrès ont été faits, les patients perdant leur greffon suite à une dysfonction dite chronique. Initialement celle-ci était essentiellement attribuée à la toxicité des immunosuppresseurs, mais des données récentes mettent en évidence la responsabilité de mécanismes immunologiques, en particulier dépendant des alloanticorps (Donor Specific Antibody, DSA). En effet le rejet humoral semble être un processus évolutif qui débute avec

l'apparition de ces derniers. Même s'il peut être émaillé d'épisode aigu, il est le plus souvent initialement indolent sous la forme d'une inflammation microvasculaire qui aboutit irrémédiablement à des lésions histologiques accompagnées d'une dégradation de la fonction du greffon, définissant le rejet humoral chronique (27)(cf **figure 5**).

Ainsi, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, évitant ou diminuant le recours aux anti-calcineurines, mais aussi plus efficace en particulier vis-à-vis de la réponse humorale, s'avère nécessaire. Une possibilité pourrait être de cibler le second signal de costimulation et plus particulièrement sa principale composante la triade CD28 / CD80/86 / CTLA-4.

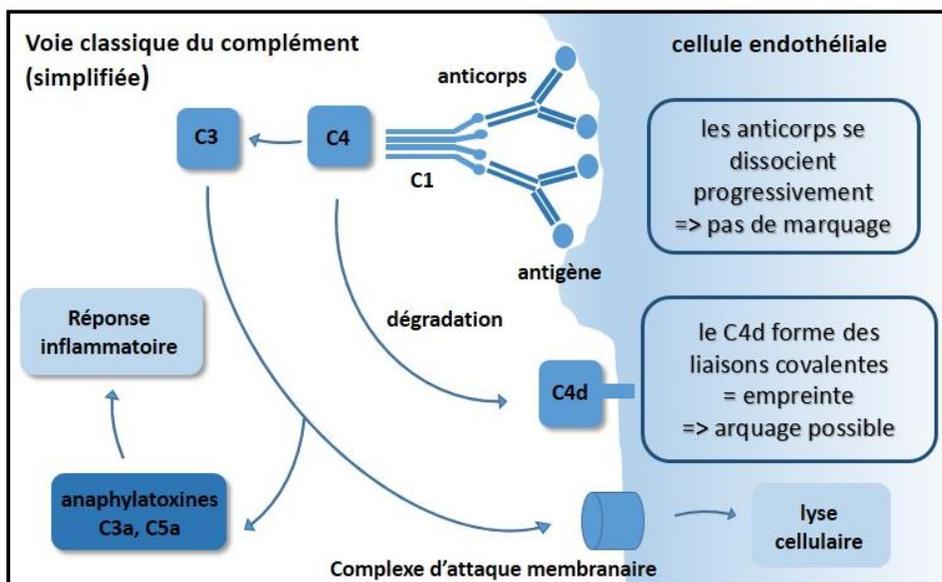


Figure 4 : la voie classique du complément et le marquage par le C4d.

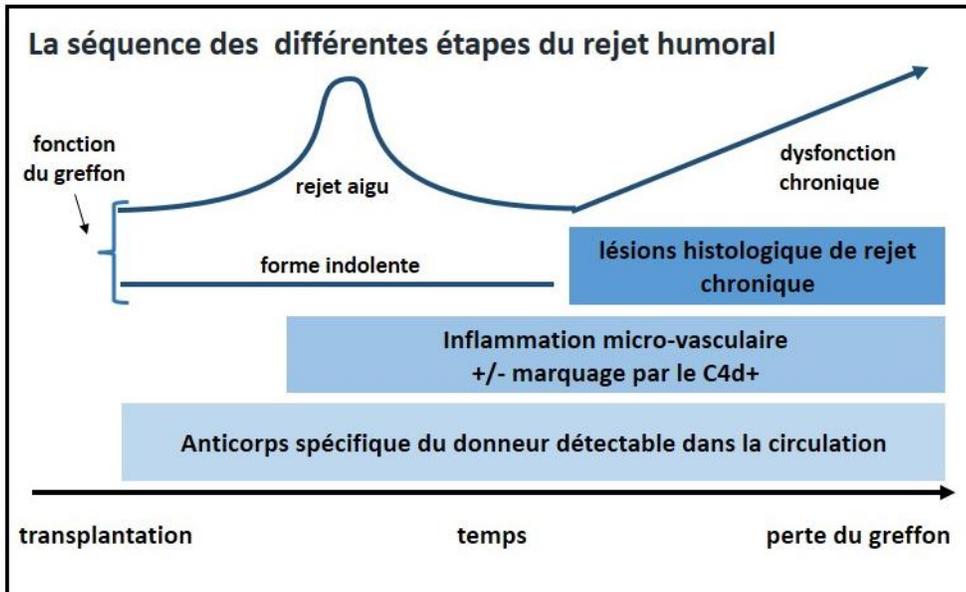


Figure 5 : le rejet humoral un processus évolutif.

2 LA TRIADE CD28 / CD80-86 / CTLA-4.

2.1 MODELE CLASSIQUE

Il faudra attendre 1990 et Linsley pour que l'identité moléculaire de la principale interaction de l' « allogenic stimulus » de Lafferty soit révélée : CD28 sur le versant lymphocyte et son ligand CD80/86 du côté des CPA (28). L'identification en 1987 sur des lymphocytes activés cytotoxiques (29) du « Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4 » (CTLA-4) puis la démonstration qu'il partageait le même ligand que CD28 sur les CPA en 1991 (30), va complexifier le modèle simpliste du second signal. En effet, en 1995 l'étude du phénotype des souris CTLA-4 déficientes, qui présentent un syndrome lympho-prolifératif léthal, a permis de le définir comme un régulateur négatif de l'activation des cellules T introduisant le concept plus complexe de balance CD28 / CD80/86 / CTLA-4 (31) .

CD28 est constitutivement exprimé sur les cellules T naïves et fournit parallèlement au signal 1 émanant du TCR, un signal de costimulation essentiel à leur prolifération (sécrétion d'IL-2) et à leur survie (via Bcl-2 et Bcl-x). CD28 abaisse le seuil d'activation des lymphocytes T, c'est-à-dire le nombre d'interaction TCR – peptide / CMH nécessaire à leur prolifération (32).

Rapidement, CTLA-4 devient exprimé à la surface des lymphocytes T, délivre des signaux inhibiteurs et diminue l'expression membranaire de CD28 ce qui a pour conséquence de moduler la réponse immunitaire (33).

Ces dernières années, ce modèle bien que toujours valable, s'est extraordinairement complexifié. Premièrement, de nombreuses nouvelles interactions entre des molécules de surface sur les lymphocytes et leur ligand sur les CPA, transduisant un signal activateur ou inhibiteur (Cell Surface Signaling Molecule, CSSM) ont été décrites (34). L'expression de ces molécules de part et d'autre la synapse immunologique, y compris pour CD28 et CTLA-4, varie en fonction du type / sous-type de cellules, de leur degré d'activation, de leur localisation au sein du système immunitaire et des boucles de régulation les modulent les unes les autres (19). Ainsi l'importance de la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4 pour une cellule donnée varie nécessairement en fonction de son sous-type (de sa polarisation, de son degré de

différentiation, etc...) et elle dépend de l'intégration de l'ensemble des signaux intracellulaires issus des interactions entre de multiples CSSM sans compter les facteurs solubles comme les cytokines.

Deuxièmement, à la classique fonction de CD28 et CTLA-4 de signalisation, ce que l'on peut qualifier de fonctions intrinsèques, se sont rajouté d'autres fonctions « supra-cellulaire ». Il convient d'en distinguer deux types :

(1) la régulation spatio-temporelle de la synapse immunologique, pour laquelle le rôle de CD28 et CTLA-4 a été bien décrit récemment, qui constitue une première « couche » à laquelle est étroitement liée la transduction des signaux intracellulaires à la couche inférieure.

(2) des fonctions extrinsèques, qui font intervenir d'autres cellules, particulièrement développées chez CTLA-4.

Enfin tous les domaines de l'immunologie ont été grandement impactés par la mise en évidence des lymphocytes T régulateurs, ce qui est vrai pour CD28 comme pour CTLA-4.

Ces progrès dans la compréhension du rôle de CD28 et CTLA-4 ont bien sûr complexifié les prédictions qui peuvent être faites quant à leur stimulation ou leur blocage, néanmoins ils soulignent leur importance fondamentale à tous les niveaux de la réponse immunitaire.

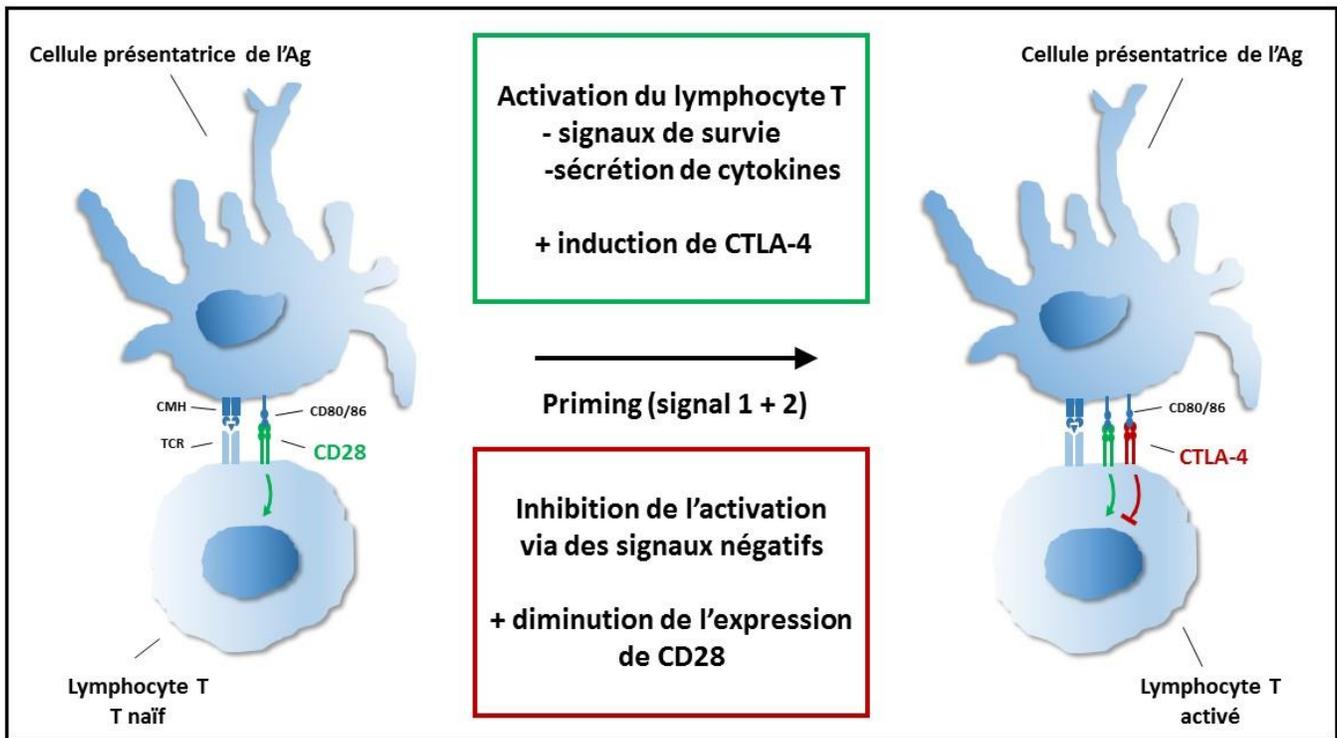


Figure 6 : représentation classique de la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4.

2.2 NOUVEAUX ACTEURS DE LA BALANCE CD28 / CTLA-4

Récemment la vision dichotomique de la balance CD28 / CD80/86 / CTLA-4 a été remise en question par la mise en évidence de nouvelles interactions entre ces membres et d'autres CSSM.

Freeman *et al* ont révélé l'existence d'une interaction bidirectionnelle entre PD-L1, le ligand de PD1 (la principale molécule de co-inhibition induite après activation des lymphocytes T en dehors de CTLA-4) et CD80, aussi bien chez l'homme (35) que chez la souris (36), avec une affinité qui se situe entre celle de CD28 et de CTLA-4 pour CD80. Cette interaction est fonctionnelle puisqu'elle a pour conséquence une diminution de la prolifération cellulaire et de la production de cytokines et son blocage spécifique exacerbe le diabète, lorsqu'il est déjà déclaré, dans les souris NOD (37).

Chez l'homme (et pas chez la souris), une autre interaction inattendue a été mise en évidence : celle d'ICOS-L, le ligand d'ICOS (la principale molécule de costimulation induite après activation des lymphocytes T) avec CD28 et aussi CTLA-4 (38). *In vitro*, l'interaction d'ICOS-L avec CD28 apparaissait fonctionnelle lors de la réponse de cellules T à une CD allogénique et lors d'une réponse mémoire à la toxine tétanique. En revanche la relevance fonctionnelle de l'interaction entre ICOS-L et CTLA-4 demeure à établir.

Ainsi chez l'homme, à la simple triade CD28 / CD80/86 / CTLA-4 pourrait se substituer un quintet CD28 / CD80/86 / PD1-L / ICOS-L / CTLA-4, à prendre en considération dorénavant, lorsqu'on envisage une intervention thérapeutique ciblant une de ces molécules.

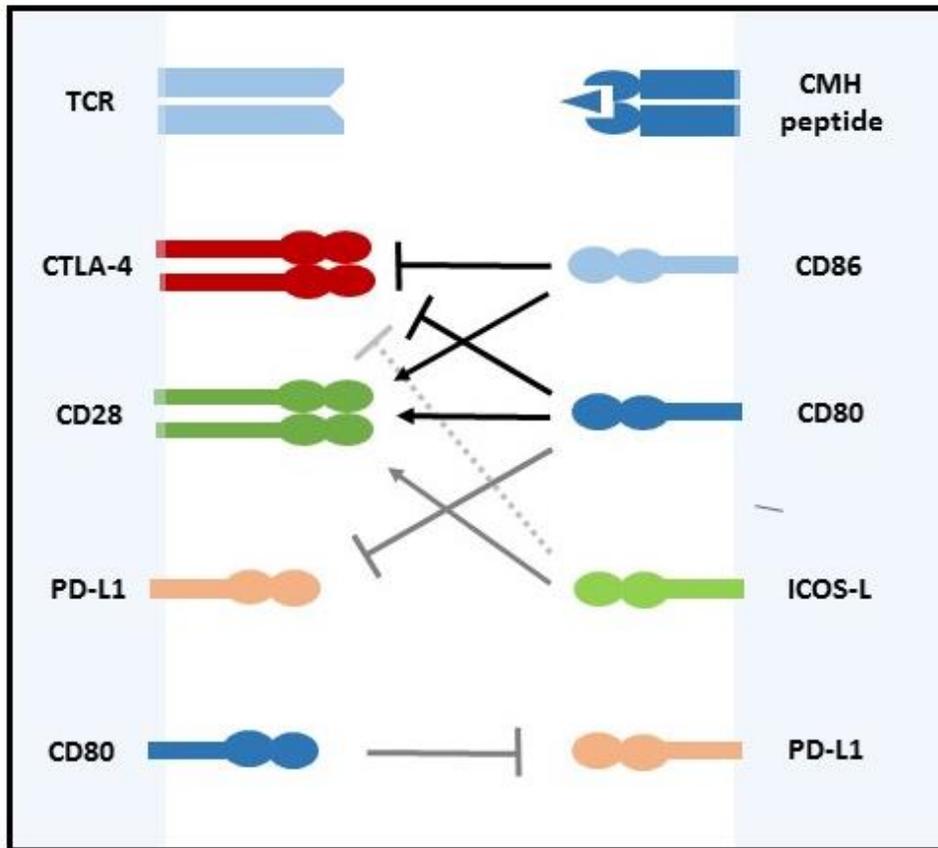


Figure 7 : « Quintet » de la costimulation prenant en compte les dernières données concernant l'interaction CD80 / PD-L1 et ICOS-L / CD28.

2.3 DYNAMIQUE DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE, ET TRIADE CD28 / CD80-86 / CTLA-4.

La garantie d'une réponse immunitaire efficace nécessite que les lymphocytes T discriminent le complexe peptide/CMH qui leur est spécifique parmi ceux présentés par des milliers de CPA. Ainsi à l'état de base, au sein des organes lymphoïdes, les cellules T sont en continuel mouvement à environ 25µm par minute, ce qui leur permet de contacter environ 5000 CD par heure. Chaque contact donne lieu à des signaux STOP (dont le plus puissant est un complexe peptide/CMH agoniste), GO et EXIT dont l'intégration décide du sort de l'interaction : fugace, ou constitution d'une synapse immunologique (SI), étape préalable et nécessaire à toute réponse immunitaire(39). Celle-ci a initialement été décrite de façon statique par Kupfer par l'identification de complexes d'activation supramoléculaire (SMAC) : le central (cSMAC) composé de l'interaction TCR – peptide / CMH et le périphérique (pSMAC) où prédomine des molécules d'adhésions (interaction ICAM1 - LFA1). Plus récemment des modèles plus complexes ont montré la nature dynamique de la SI, en particulier la formation de micro-clusters (MC), constitués de complexes TCR - peptide / CMH qui migrent de la périphérie, où ils sont formés de façon continue vers le centre de la synapse. Les MC sont des unités de signalisation puisque du côté intracellulaire ils comportent de nombreuses PTK telles que Lck, ZAP70, et des protéines adaptatrices telles que LAT et SLP76 (cf 1.2.3). Leur phosphorylation intervient essentiellement lors de la migration vers la cSMAC mais pas en son sein même. Une des conséquences de la signalisation est le renforcement du signal STOP via le TCR et l'induction de Rap1 qui conduit à une modification de conformation de LFA-1 lui conférant une meilleure affinité pour ICAM-1 permettant la stabilisation de la SI (signal inside-out).

CD28, la SI et signalisation intracellulaire.

CD28 amplifie une myriade de voies de transduction à travers ses deux motifs situés sur sa queue intra-cytoplasmique : YMNM et PYAP (33). Une des premières décrites consiste en l'association d'YMNM avec la sous unité p85 de la PI3K (40) ce qui permet la promotion de la voie CD28-PI3K-AKT qui favorise la prolifération et à la survie des cellules T à travers les voies NFκB et NFAT déjà activées par le premier signal (cf 1.2.3). Une autre association

remarquable est celle de CD28 avec la PKC θ , puisque son étude a permis de démontrer le lien entre la dynamique de la SI et les signaux de costimulation via CD28 (41).

Yokosuka *et al*, ont montré que les molécules de CD28 lorsqu'elles interagissent avec leurs ligands CD80/86 incorporent les MC (TCR – peptide / CMH) en périphérie et migrent vers la cSMAC, où elles se déploient de façon annulaire autour des complexes TCR – peptide /CMH. Contrairement à beaucoup d'autres molécules potentiellement impliquées dans la signalisation via CD28 et souvent via le TCR (dont la PI3K), qui sont retrouvés uniquement en périphérie, seule la PKC θ s'accumule dans la cSMAC (42). Celle-ci, co-localise avec CD28, avec lequel elle est physiquement liée via son motif intra-cytoplasmique YMNM, tout au long de son cheminement vers la cSMAC, où les complexes CD28-PKC θ forment une cSMAC « de signalisation » amplifiant ainsi massivement l'activation des cellules T en particulier via la voie NF- κ B et AP-1.

CTLA-4 et la SI : régulation négative de la cSMAC de signalisation.

Contrairement à CD28 qui est exprimé de façon constitutive à la surface des lymphocytes T, à l'état basal, CTLA-4 n'est pas exprimé à la surface cellulaire, mais localisé dans des vésicules intra-cytoplasmiques. La stimulation du TCR induit le déplacement de ces vésicules vers la surface de la cellule. Depuis longtemps il est connu que CTLA-4 a une affinité plus importante pour CD80/86 que CD28 et entre en compétition avec ce dernier expliquant une partie de son action inhibitrice. Ce mécanisme a pu être directement mis en rapport avec la régulation spatio-temporelle de la SI.

Yokosuka *et al* (43) ont observé que CTLA-4, après sa migration vers la surface, forme des MC mais qui ne co-localisent pas avec les TCR-MC. En effet, ils s'accumulent directement dans la cSMAC, à l'endroit même où s'accumule les complexes CD28-PKC θ , ce qui aboutit à leur évincement avec pour conséquence un blocage de la co-signalisation par CD28. Une chimère de CTLA-4 conservant son site de fixation avec CD80-86 mais allongé pour la maintenir mécaniquement en périphérie de la SI (qui est de plus en plus « étroite » vers son centre), échoue à inhiber l'activation du lymphocyte T, démontrant ainsi l'importance de la localisation de CTLA-4 au sein de la cSMAC pour réaliser sa fonction inhibitrice.

CTLA-4 reverse le STOP signal

Une autre fonction de CTLA-4 en rapport avec la SI a été décrite par Schneider *et al.*(44) Ils ont observés, dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*, que CTLA-4 diminue le temps de contact entre les lymphocytes T et les CPA présentant leur antigène spécifique, et donc les signaux d'activation visualisés par des flux calciques. Ce phénomène de réversion du signal STOP induit par le TCR implique des voies de signalisation intracellulaire (via Rap-1 en particulier) et persiste avec des cellules déficientes en CD28, ce qui exclut qu'il soit simplement consécutif à une compétition entre CD28 et CTLA-4 pour fixer CD80/86 (45).

2.4 FONCTION DE CD28 AU-DELA DU MODELE CLASSIQUE

2.3.1. CD28 ET LA REPOSE MEMOIRE.

Lors d'une réponse primaire, le second signal via CD28 est indispensable à la prolifération et à la survie des lymphocytes T, son absence induisant une anergie, c'est-à-dire l'absence de réponse lors de la réintroduction de l'antigène. Néanmoins, dès l'origine, Lafferty nota qu'une fois générés, les lymphocytes T cytotoxiques étaient capables de tuer n'importe quelle cellules exprimant l'antigène étranger, c'est-à-dire qu'une fois activé, la nécessité de l' « allogenic stimulus » était perdu. Par la suite s'est installé le dogme que les réponses mémoires sont CD28 indépendantes. Dans cette perspective, la perte de la dépendance vis-à-vis de CD28 des cellules T, est interprétée comme un avantage sélectif, attribué aux cellules ayant répondu avec succès à un premier contact avec l'antigène.

Les premières données in vitro et chez la souris CD28 déficiente.

En comparaison de l'ensemble de la littérature sur la costimulation par CD28 les études concernant la réponse mémoire ont été initialement, du fait de contraintes techniques, très peu nombreuses : des études *in vitro* et chez la souris CD28 déficiente.

Le premier modèle à avoir été utilisé par Steinman il y a 30 ans a été la réponse allo génique. Il s'agissait alors non pas de cellules mémoires mais de lymphoblastes « sensibilisés » au cours d'une MLR primaire. Ces cellules proliféraient au contact de n'importe quels types de CPA y compris des macrophages et des cellules B, contrairement aux cellules naïves qui répondaient uniquement aux CD (46). La conclusion fut qu'une fois sensibilisé les lymphocytes deviennent indépendants du second signal.

Par la suite l'étude de lymphocytes T mémoires Ag spécifiques fut rendu possible par la méthode du transfert adoptif de lymphocytes T activés issus d'une souris TCR transgénique. Après une prolifération homéostatique ces cellules acquièrent des caractéristiques de cellules mémoires et peuvent être étudiées *in vitro* une fois récoltées, en les stimulant avec leur Ag peptidique chargé de façon exogène sur différents types de CPA. En utilisant ces cellules, Croft (47) confirma les données de Steinmann. Le principal biais de ces études *in vitro*, est que le stimulus de la cellule T n'est pas du tout équivalent au stimulus physiologique en particulier au niveau quantitatif. En effet, même dans une réponse primaire la dépendance vis-à-vis de CD28 peut être surmontée si un haut niveau de stimulation du TCR est obtenu excédant un seuil minimum, qui est significativement abaissé par la costimulation via CD28 et dans les cellules mémoires par rapport aux cellules naïves (32).

Néanmoins une confirmation *in vivo* de la CD28 indépendance des réponses mémoires est venue d'une étude utilisant des souris CD28 déficientes, dans un modèle d'infection par le virus de la chorio-méningite lymphocytaire (LCMV). En effet quand ces souris sont re-challengées à distance d'une première infection avec une dose létale de LCMV, elles survivent contrairement aux souris naïves (48).

Mais l'efficacité de la réponse à l'infection par le LCMV dans les souris CD28 déficientes constitue une exception (49), cela est attribué à une stimulation antigénique plus intense et durable du fait de la diffusion systémique du virus par rapport à d'autres modèles d'infections virales plus localisées. Néanmoins, ces souris une fois immunisées par le LCMV ont donc servi pour étudier la dépendance des réponses mémoires à la costimulation, déjà réputée plus sensible.

Etude in vivo

La remise en cause de l'idée de la CD28 indépendance des réponses mémoires a débuté avec des études montrant que la déplétion en CD en amont d'une réponse secondaire au VSV ou au LCMV impacte négativement la réponse mémoire (50,51), suggérant la nécessité d'un signal de costimulation. Un autre argument est apporté par la démonstration de l'efficacité du CTLA4-Ig dans le traitement de certaine maladie auto-immune (52,53) dans lesquelles le traitement est par définition débuté alors qu'une réponse immune auto-réactive a déjà eu lieu.

Puis la mise au point de modèles d'infection virale plus pertinents a permis d'étudier la dépendance vis-à-vis de CD28 des réponses mémoires. En particulier, le développement de tétramères spécifiques d'un TCR donné a permis de suivre les réponses mémoires chez des individus sauvages (WT), en présence ou non d'agents bloquant la costimulation. Globalement, il est apparu que l'élaboration optimale d'une réponse mémoire contre le HSV-1, le VACV le MHV-68 et le LCMV est dépendante d'interaction entre CD28 et CD80/86 (54–56). Une étude utilisant un système cre-lox permettant un Knock out (KO) inducible de CD28 après la réponse primaire contre *N. Brasiliensis* a abouti aux mêmes conclusions (57).

Comme mentionné ci-dessus, de nombreuses nouvelles CSSM ont été décrites, elles sont souvent absentes sur les cellules naïves mais induites secondairement et participent activement à l'induction et au contrôle des réponses secondaires. Néanmoins, il apparaît qu'au-delà de son rôle primordial dans la mise en œuvre d'une réponse primaire, CD28 soit aussi largement impliqué dans les réponses mémoires.

CD28, ICOS et la réponse Tfh.

Au stade mémoire / effecteur, les cellules T sont polarisées vers différentes fonctions effectrices. Il est vraisemblable que la dépendance vis-à-vis des molécules de costimulation varie entre ses différentes sous-populations. En ce qui concerne les cellules T Tfh, « une compartimentalisation » entre CD28 et ICOS a été décrite (58). Lors de la réponse primaire, la costimulation via CD28 est indispensable à la polarisation des cellules T en Tfh. Au cours de cette différenciation, sous l'effet de *Roquin*, une E3 ubiquitine ligase qui contrôle la stabilité de l'ARNm codant pour ICOS, celui-ci est exprimé à un niveau très élevé par les Tfh, qui perdent leur dépendance vis-à-vis de CD28 au profit d'ICOS (59). Il a été proposé que cette répartition des tâches évite l'émergence d'auto-anticorps.

Lors de la réponse primaire les cellules B en tant que CPA « valident » le caractère étranger de l'antigène en exprimant, en présence de signaux de dangers, CD80 et CD86 (alors qu'ICOS-L est exprimé constitutivement). L'interaction, dépendante de CD28, de ces cellules B avec des cellules T naïves spécifiques, va permettre leur migration dans le CG où ils deviennent respectivement des cellules B du CG et des Tfh.

La particularité de la réponse B effectrice / mémoire est que la spécificité des cellules B évolue secondairement du fait de la maturation d'affinité par hyper-mutation somatique, dont le risque majeur est de faire émerger des clones auto-réactifs. Dans ce cas précis, les signaux de danger sont dissociés de cette auto-réactivité acquise secondairement. Ainsi, la dépendance des Tfh vis-à-vis de CD28 au sein du centre germinatif (CG) pourrait être délétère. Cette fois, c'est l'expression d'ICOS par les Tfh issus de la réponse primaire et donc « sécurisé » qui permet de « valider » les nouveaux clones B qui présentent l'antigène correspondant à leur nouveaux BCR, si toutefois il s'agit toujours du même et non pas d'un Ag du soi.

Dans cette perspective l'indépendance vis-à-vis de CD28 serait donc une particularité, propre aux Tfh, qui du fait de leur coopération avec les cellules B du CG, sont les seules pour lesquelles l'information véhiculée par CD80/86 pourrait être inappropriée. Cette idée est soutenue par l'analyse phylogénétique de l'évolution du système immunitaire (60,61), puisque l'apparition d'ICOS, qui résulte d'une duplication de CD28, coïncide avec celle de la réponse humorale de haute affinité.

2.3.2. CD28 ET LYMPHOCYTES T REGULATEURS.

Lymphocytes T régulateurs naturels

Les lymphocytes T régulateurs qualifiés de naturels (nTreg) sont issus du thymus. Leur déplétion entraîne une auto-immunité, puisqu'ils sont auto-réactifs et garants de la tolérance périphérique (62). Ainsi, c'est l'exacerbation du diabète dans les souris CD28 déficiente, sur fond NOD (diabète spontané), qui a fait suspecter l'importance de CD28 pour la génération intra-thymique des Treg (63), le niveau de celle-ci étant profondément diminué dans ces souris. Puis en utilisant des souris CD28 déficientes ou un blocage de CD80/86, l'importance de CD28 pour la fonction et l'homéostasie des Treg en périphérie a été montré (64,65). Les biais principaux de ces modèles sont d'une part que la génération intra-thymique de Treg est déjà impactée et d'autre part, que le défaut en signaux médiés par CD28, peut agir de façon extrinsèque au niveau des cellules T conventionnelles (donc de la sécrétion d'IL-2, cruciale pour l'homéostasie des Treg). Néanmoins l'utilisation de KO conditionnel ciblant CD28 dans les cellules Foxp3 positive (66) ou de KO inductible (67), a permis de confirmer le rôle

intrinsèque de CD28 pour la fonction et l'homéostasie des nTreg. En effet, les Treg déficientes en CD28 présentent un défaut de suppression associé à un déficit en CTLA-4 et un défaut de survie que ce soit dans des conditions compétitives ou dans un environnement lymphopénique. Ainsi pour ce qui est des nTreg, CD28 est indispensable à tous les niveaux.

Il faut néanmoins apporter une nuance concernant une sous population de nTreg mise en évidence en 2008 chez l'homme (68,69), où l'expression d'ICOS permet de distinguer deux populations de Treg (ICOS+ et ICOS-) parmi les effecteurs (CD45RA-). Elles se différencient par leur mécanisme de suppression (IL10 et TGF β pour les ICOS+ et uniquement TGF β pour les ICOS-), mais aussi par l'importance relative de CD28 et ICOS sur leur survie et leur prolifération. En effet en présence d'un anti-CD28 agoniste, alors que les ICOS- prolifèrent, la prolifération des ICOS+ est inhibée. En revanche ICOS-L favorise la prolifération de ces dernières, suggérant qu'ICOS pourrait se substituer à CD28 pour assurer les signaux nécessaires à leur survie.

Lymphocytes T régulateurs induits.

Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg) sont issus de cellules T naïves conventionnelles ayant rencontré leur antigène spécifique. Il convient de différencier ceux générés *in vitro*, selon des protocoles bien établis (culture avec de l'IL2 et du TGF β) mais dont la pertinence biologique est incertaine, de ceux apparaissant *in vivo* dans un environnement propice (70). Le rôle de CD28 dans leur induction reste à ce jour controversé. Bien que la costimulation via CD28 soit nécessaire à la génération d'iTreg à travers la sécrétion d'IL-2 (71), un haut niveau de stimulation de CD28 semble délétère (72). Une étude a montré que des CD4+CD25- (dépourvus de nTreg) déficients pour une des voie de transduction de CD28 (KO CD28-Lck) lorsqu'ils étaient transférés dans des souris irradiées, étaient incapables contrairement aux WT d'induire une maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), ce qui était attribué à une meilleure induction d'iTreg (73). Ces données suggèrent qu'un faible niveau de costimulation via CD28, ce qui correspond à des situations quiescentes, favoriserait l'induction de Treg, alors qu'une stimulation intense de CD28 dans un contexte de signaux de danger, favoriserait l'induction de cellules effectrices.

Helios comme un marqueur des iTreg ?

Une des difficultés qui se pose pour l'étude des iTreg est l'absence de marqueur spécifique les différenciant des nTreg. En 2010 Thornton *et al* ont proposé qu'Helios, un facteur de transcription pourrait servir à distinguer ces deux populations (74). Leurs arguments reposaient sur (75) :

- (1) le fait que chez la souris dans les premiers jours de vie toutes les cellules Foxp3+ sont Helios positive.
- (2) le fait que les Treg induit *in vitro* sont Helios négative.
- (3) le fait que des Treg induit *in vivo* dans un modèle de tolérance orale et dans un modèle d'immunisation sans adjuvant soient Helios négative.

Mais depuis ces résultats ont été largement contestés. En effet il a été montré que lorsque la stimulation du TCR nécessaire à l'induction de Treg *in vitro* est apportée par des CPA, certaines iTreg sont Helios+ (75). Akimova *et al* (76), ont montré qu' Helios pouvait être exprimé par des cellules T conventionnelles et en font un marqueur d'activation et de prolifération de ces cellules. Enfin chez l'homme Himmel *et al* (77) ont montré qu'Helios n'est pas exprimé par toutes les cellules Treg naïves (CD45RA+CD31+CCR7+CD62L+ Foxp3+) qui sont par définition issues du thymus.

2.5 FONCTION DE CTLA-4

Le fait que CTLA-4 partage le même ligand que CD28 associé au phénotype des souris CTLA-4 KO (lympho-prolifération massive et manifestations auto-immunes) en a fait le plateau négatif de la balance CD28 / CD80/86 / CTLA-4. Cela était rapidement étayé par la mise en évidence de signaux de transduction intracellulaires inhibiteurs, induit par des anti-CTLA-4 agonistes (78) ou par son interaction avec CD80/86 et supposés s'opposer aux signaux activateurs en aval de CD28. Par la suite une littérature très dense a détaillé les mécanismes moléculaires à l'origine de cette fonction intrinsèque de CTLA-4. Globalement, la queue intracellulaire de CTLA-4, bien que dépourvue d'activité enzymatique, contient des motifs permettant son interaction avec de nombreuses protéines comme SHP-2 et PP2A, dont l'activité phosphatase interfère avec les signaux de transduction en aval du TCR et de CD28 (33). Les autres fonctions intrinsèques de CTLA-4 comme nous l'avons vu ci-dessus font

intervenir la régulation spatio-temporelle de la SI via un phénomène de compétition avec CD28 pour lier CD80-86 et la réversion du STOP signal.

Deux éléments ont fait suspecter aux immunologistes une plus grande complexité concernant le rôle de CTLA-4 dans le système immunitaire : (1) la mise en évidence que seul les Treg l'expriment constitutivement, son expression étant contrôlée par le facteur de transcription Foxp3, leur « master regulator » (2) le développement de modèles murins de chimères de moelle osseuse a permis de distinguer les effets intrinsèques / extrinsèques des molécules. Dans le cas de CTLA-4 les souris présentant un mélange de cellules WT et de cellules déficientes ont un phénotype normal, démontrant que CTLA-4 n'agit pas seulement sur les cellules qui le possède (rôle intrinsèque), mais au-delà au travers d'autres cellules (rôle extrinsèque).

Bien que fortement suspecté, le rôle de CTLA-4 pour la fonction suppressive des Treg a été initialement l'objet de controverses (probablement du fait de conditions expérimentales variables). Finalement, en 2008, le KO induit de CTLA-4 dans les cellules exprimant Foxp3, qui entraîne un tableau proche du KO simple (lympho-prolifération et auto-immunité), a permis de confirmer son rôle majeur pour la fonction des Treg (79), puis d'en déterminer les mécanismes, à tel point que CTLA-4 apparaît aujourd'hui comme l'élément central de la fonction suppressive des Treg.

Dans ce contexte, la relevance de la fonction intrinsèque a pu être questionnée. Néanmoins, de nouveaux travaux, sur les mécanismes d'action des anti-CTLA-4, dont l'efficacité y compris clinique dans le traitement du cancer s'est affirmée, ont précisé l'importance du rôle direct de CTLA-4 sur les réponses effectrices qu'elles soient primaires ou secondaires.

2.4.1. LES FONCTIONS EXTRINSEQUES DE CTLA-4.

La stimulation des Treg et la sécrétion de TGFβ

Une première explication plausible du rôle extrinsèque de CTLA-4 est son rôle intrinsèque, direct, sur les Treg, c'est à dire la potentialisation de leur activité suppressive particulièrement via le TGFβ. En effet la stimulation de lymphocytes CD4+ au moyen d'anti

CTLA-4 agoniste augmente leur production de TGF β (80), ce qui est également observé avec des cellules CD4+CD25+ Foxp3+ lors de contact cellule-cellule dépendant de CTLA-4 (81).

L'activation d'IDO dans les CPA.

Lorsque CTLA-4 engage son ligand sur les CPA, il initie un « signal inverse » au sein des CPA à travers CD80/86, induisant l'activation de l'indoleamine 2,3 – dioxygénase (IDO) (82,83). Cette enzyme catabolise le tryptophane conduisant à sa déplétion locale, avec pour conséquence l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T (84).

La trans-endocytose de CD80/86 sur les CPA.

Dès 2000, la capacité des Treg à réduire le niveau d'expression de CD80/86 sur les CPA a été mis en évidence chez la souris (85). Cela pouvait expliquer leur propension à altérer la formation de contact stable entre les CPA et les cellules T, dans les ganglions lymphatiques (86). Cette fonction est absente en cas de déficit en CTLA-4 (79). En 2011, la base moléculaire de ce mécanisme a été observé par microscopie confocale (87). Suite à leur interaction avec CTLA-4, les molécules de CD80/86 sont physiquement capturées à surface des CPA et transférées par trans-endocytose dans des vésicules, au sein de la cellule CTLA-4 positive qui par ailleurs n'est pas nécessairement une Treg.

Depuis, la pertinence *in vivo* de cette fonction dans différents contextes a été démontrée. La réponse humorale fait intervenir, au sein des ganglions lymphatiques, une collaboration entre les cellules B et une sous-population de lymphocytes T CD4+, les cellules T helper folliculaires (Tfh). Le rôle modulateur de CTLA-4 dans cette situation était suspecté (59), des études récentes ont montré que cela fait intervenir la baisse du niveau d'expression de CD80/86 sur les lymphocytes B via CTLA-4 et les Treg (88–90). Encore plus récemment, dans le classique modèle d'infection par le LCMV, il a été montré que la déplétion en Treg après une réponse primaire provoquait une perte de quiescence des cellules mémoires en absence d'antigène (prolifération et différenciation en cellules effectrices). Ce phénomène pouvait être empêché par l'ajout simultané de CTLA4-Ig, faisant suspecter que le mécanisme d'action des Treg est la capture de CD80/86 sur les CPA. Cette observation amène deux remarques :

(1) cela illustre l'importance de la costimulation médiée par CD28 pour les lymphocytes T mémoires (cf 2.3.1) puisque c'est la disponibilité de CD80/86 suite à la déplétion en Treg qui est à l'origine de leur réactivation.

(2) le CTLA4-Ig en saturant CD80/86 sur les CPA mime le mode d'action des Treg lorsqu'il implique le mécanisme de trans-endocytose de CD80/86.

Cependant le CTLA4-Ig ne saurait reproduire toutes les fonctions des Treg, car comme nous l'avons vu celles-ci possèdent d'autres mécanismes suppresseurs dépendant de CTLA-4, sans compter ceux qui ne le sont pas.

De plus, même si les fonctions extrinsèques de CTLA-4 ont ces dernières années pris beaucoup d'importance, la relevance de ses effets intrinsèques a également pu être réaffirmée à la lumière des études sur les mécanismes d'action des anti-CTLA antagonistes (« checkpoint inhibitors »).

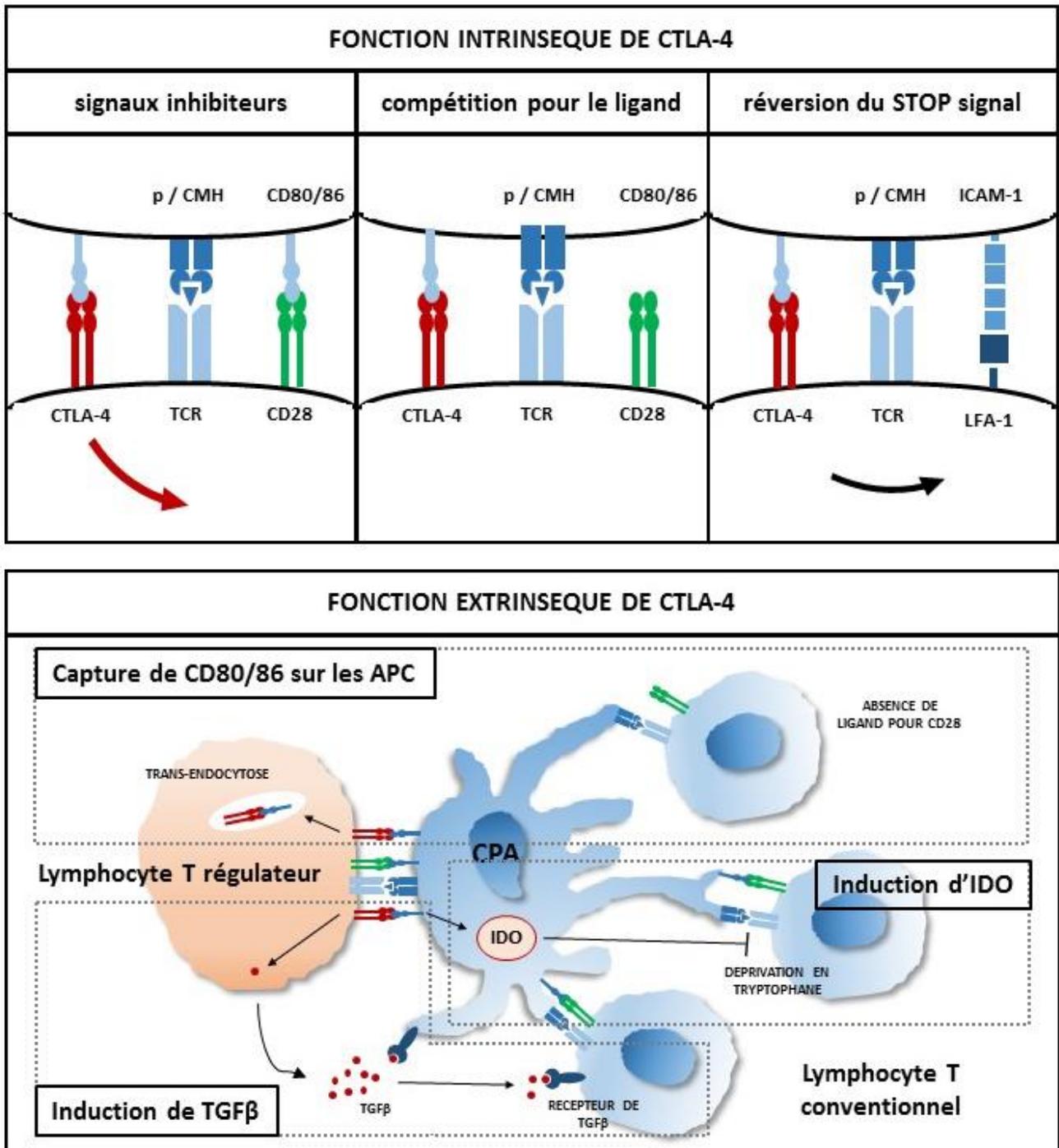


Figure 8 : principales fonctions intrinsèques et extrinsèques de CTLA-4.

2.4.2. FONCTIONS INTRINSEQUES DE CTLA-4.

Les leçons des anti-CTLA-4

Dès 1996 l'efficacité des anti-CTLA4 antagoniste pour optimiser l'immunité anti-tumorale a été montrée dans des modèles précliniques (91), puis confirmée chez l'homme dans des essais cliniques (92,93). La première hypothèse pour expliquer leur activité, était un effet direct sur les cellules effectrices anti-tumorales, le blocage de CTLA-4 entraînant un déséquilibre de la balance en faveur de CD28. Néanmoins la démonstration du rôle essentiel de CTLA-4 pour la fonction des Treg (79) a soulevé une seconde hypothèse : celle d'une inhibition des fonctions immunosuppressives des Treg au sein de la tumeur, et suscité un questionnement sur l'importance respective de ces deux mécanismes, en particulier sur la relevance des effets directs. La preuve de l'importance de ces derniers, a été apportée par une étude utilisant un ingénieux mécanisme permettant de bloquer CTLA-4, soit sur les lymphocytes T conventionnels, soit sur les lymphocytes T régulateurs (94). Seul le ciblage spécifique des T effecteurs avait un impact significatif sur la croissance tumorale alors que le blocage des deux compartiments avait un effet synergique. Plus récemment il a été montré que les anti-CTLA4 induisent une déplétion des cellules T régulatrices dans le micro-environnement tumoral de façon dépendante des récepteurs Fcγ (95–97) aussi bien qu'une augmentation des cellules T activées au sein de la tumeur (98,99).

Un effet intrinsèque sur les réponses primaires et secondaires.

L'effet direct du blocage de CTLA-4 sur les cellules T conventionnelles peut s'expliquer par deux scénarios non mutuellement exclusifs :

- (1) une optimisation du priming puis de l'expansion des cellules T naïves spécifiques des antigènes tumoraux ce qui reviendrait à une diversification du répertoire,
- (2) une amplification des réponses T effectrices / mémoires spécifiques pré-existantes par la levée de signaux inhibiteurs.

Des données récentes que ce soit en périphérie chez l'homme à la faveur des essais cliniques, ou au sein de la tumeur dans des modèles murins très poussés, semblent démontrer que les deux mécanismes coexistent.

Chez l'homme, Kvitstborg *et al* (100), ont montré en utilisant une large collection de multimètres peptides (spécifique des antigènes tumoraux du mélanome) / CMH, permettant de monitorer la réponse T CD8+ anti-tumorale, que l'ipilimumab (anti-CTLA-4) permet de faire apparaître de nouveaux clones, augmentant ainsi la diversité de la réponse anti-tumorale. En analysant le répertoire T, par la mesure de la fréquence de chaque réarrangement des gènes du TCR β , Cha *et al* (101) retrouvent également une diversification du répertoire après traitement par les anti-CTLA-4. Néanmoins ils montrent que leur efficacité clinique est associée avec le maintien à une haute fréquence des clones déjà présents avant le traitement, ce qui suppose que l'efficacité passe plutôt par une optimisation des réponses anti-tumorales pré-existantes, effectrices et/ou mémoires.

L'analyse approfondie des effets des « checkpoint inhibitors » (anti-CTLA4 et anti-PD1) sur les lymphocytes infiltrant la tumeur, dans un modèle murin de sarcome, démontre que les anti-CTLA-4, augmentent, au sein des clones anti-tumoraux préexistants au traitement, un panel de gènes identifiés à une réponse anti-virale secondaire (comme le Granzyme B, TNF α , IFN γ) et diminuent un autre groupe de gènes assimilés à l'exhaustion, observés dans les infections virales chroniques (comme LAG-3 et TIM-3) (102). Encore plus récemment dans un modèle murin de mélanome il a été démontré que les anti-CTLA-4, en plus de dépléter les Treg, lèvent l'exhaustion des T CD8+PD1+Eomes+ (103).

Globalement ces études arguent pour un effet intrinsèque de CTLA-4 et d'autres CSSM en particulier PD-1, non seulement lors du priming des cellules naïves mais aussi sur la régulation des cellules T expérimentées (effectrices ou mémoires) lors des réponses secondaires.

A ce stade les lymphocytes T sont polarisés, l'importance relative des signaux inhibiteurs intrinsèques médiés par CTLA-4 varient en fonction du sous-type cellulaire. L'importance de la régulation par CTLA-4 a été montrée pour les Th17 dans un modèle de myocardite auto-immune ou son blocage exacerbe la maladie (104). Comme nous l'avons vu ci-dessus CTLA-4 régule la réponse Tfh effectrice via ses fonctions extrinsèques exercées par les Treg (88,89). Néanmoins, il a récemment été démontré que l'effet de CTLA-4 est aussi la conséquence de signaux inhibiteurs intrinsèques au sein des Tfh (89).

3 LE BLOCAGE DE CD80-86 PAR LE CTLA4-IG

C'est la production de la protéine de fusion CTLA4-Ig soluble qui a permis d'identifier le ligand de CTLA-4 sur les lymphocytes B : CD80/86 (30), déjà connu pour être celui de CD28 identifié alors comme dépositaire du second signal (28). Ainsi, avant même que la fonction régulatrice du CTLA-4 soit décrite (78) le CTLA4-Ig a fait la démonstration *in vivo* de son efficacité pour prévenir le rejet dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (105) et même pour induire la tolérance à une xéno greffe d'îlots pancréatiques humain chez la souris (106).

Les espoirs d'induction de tolérance nés de ces premiers résultats ont été déçus par ceux plus modestes obtenus chez le primate. Puis, une seconde génération de CTLA4-Ig (LEA29Y) de meilleure affinité pour CD86 a été développée, dont les résultats encourageants en préclinique, en association avec une induction par anti-IL2R ou avec un traitement d'entretien par mycophenolate mofétil (MMF) et corticostéroïdes (Cs), ont abouti à un essai clinique où le Belatacept était associé à ces deux thérapeutiques, sans inhibiteurs de la calcineurine (CNI). Comme attendu, ce protocole permit une amélioration de la fonction du greffon, attribuée à l'absence de néphrotoxicité. Cependant, en particulier avec de fortes doses, les patients traités par Belatacept présentaient un taux de rejet supérieur : les rejets résistants au Belatacept.

Les effets délétères du CTLA4-Ig sur les Treg pourraient être une raison de leur efficacité limitée. Cela est difficile à mettre en évidence, en particulier chez l'homme du fait de la faible spécificité de Foxp3, leur principal marqueur, arguant pour le développement de nouvelles techniques plus pertinentes, issues de l'épigénétique.

L'autre explication avancée pour expliquer la résistance au blocage de la costimulation est l'indépendance vis-à-vis de CD28 des cellules T mémoires, associée à leur réactivité croisée avec les allo-antigènes (immunité hétérologue). Il apparaît aujourd'hui que ce sont davantage les cellules effectrices qui sont impliquées.

3.1 DEVELOPPEMENT EXPERIMENTAL ET PRECLINIQUE

Après les deux études princeps mentionnées ci-dessus (105,106), de très nombreux laboratoires ont étendu avec succès cette stratégie, en utilisant du CTLA4-Ig (ou parfois des anticorps anti CD80/86), à d'autres organes dont le rein. Les grands principes issus de ces études sont (107) :

(1) qu'un traitement court, voir une dose unique suffit.

(2) le plus souvent la simple antagonisation de CD80/86 ne suffit pas à obtenir une induction de tolérance : pour prévenir l'apparition d'un rejet chronique il est nécessaire d'associer soit une transfusion de lymphocytes du donneur soit un anti-CD40L.

Les limites du blocage de CD80/86 sont surtout apparues lors de son utilisation chez le primate où les résultats ont été beaucoup moins bons que ce soit avec le CTLA4-Ig (108,109) ou avec les anti-CD80/86 (110,111). Initialement, une faible affinité de la première génération de CTLA4-Ig (Abatacept) pour CD86 comparé à CD80 était supposée être à l'origine de ce manque d'efficacité. Ainsi une seconde génération de CTLA4-Ig, le LEA29Y (Belatacept) avec une meilleure affinité pour CD86 fut développée. Chez le primate en monothérapie, utilisé non plus en induction comme précédemment mais en traitement d'entretien, le LEA29Y montrait une nette supériorité pour prévenir le rejet aigu comparé au CTLA4-Ig (temps de survie moyenne de 45 contre 8 jours). L'autre objectif de l'étude était de démontrer son efficacité en entretien dans deux protocoles sans CNI :

(1) avec une induction par des anti-II2R où aucun rejet ne fut constaté.

(2) avec du MMF et des Cs en entretien, où 2 animaux sur 5 rejetèrent.

Après l'arrêt du LEA29Y, tous les animaux rejetèrent avec parfois apparition d'allo-anticorps qui n'apparaissent jamais sous blocage de la costimulation (112).

Fort de ces deux atouts (prévention du rejet dans un protocole sans CNI et prévention de la survenue d'allo-anticorps) qui s'opposent aux principales problématiques à l'origine de

la dysfonction chronique, le Belatacept était supposé permettre l'amélioration de la fonction du greffon à long terme.

3.2 DONNEES CLINIQUES

3.2.1. BENEFIT ET BENEFIT EXT

Efficacité sur la fonction du greffon

C'est donc dans un protocole sans CNI, en traitement d'entretien à deux doses différentes et en association avec une induction par anti-IL-2R, et du MMF et des Cs en entretien, que le Belatacept fut introduit en clinique dans un protocole de phase II contrôlé par un bras avec de la ciclosporine (113,114). Cette étude démontra la non-infériorité du Belatacept en termes de rejet, avec par ailleurs une meilleure fonction et une incidence plus faible de néphropathie chronique d'allogreffe (CAN) à 12 mois chez les patients traités par Belatacept.

Deux études de phase III baptisée BENEFIT (115) excluant les donneurs aux critères élargis et BENEFIT-EXT (116–118) avec ces derniers, comprenant les mêmes groupes (Belatacept à dose plus intensive (MI), dose moins intensive (LI) et ciclosporine (CsA)) confirmèrent la supériorité du Belatacept sur la fonction rénale et l'incidence de la CAN à 12 mois. En revanche dans BENEFIT, l'incidence de rejet aigu la première année, était supérieure avec le Belatacept en particulier dans le groupe à dose MI, qui ne respecta pas les critères de non-infériorité : 22%, 17% et 7% respectivement. Il s'agissait de rejets cellulaires, l'incidence d'apparition de DSA étant très faible (d'avantage qu'avec la CsA) y compris au moment des rejets. Néanmoins, ces rejets étaient sévères en particulier avec le régime intensif, avec respectivement 40%, 25% et 12 % de rejets de classe IIB selon la classification de Banff, avec pour conséquence l'utilisation d'un lympho-déplétant d'emblée dans respectivement 32%, 25% et 12,5% des rejets et par ailleurs 32% et 25% de rejets cortico-résistant avec le Belatacept contre aucun avec la ciclosporine. Ainsi à 3 ans, 15% et 25% des patients ayant eu un rejet sous Belatacept avait perdu leur greffon contre 4% de ceux sous CsA. Après 18 mois l'incidence de rejet était très faible dans tous les groupes, alors que la survenue de DSA était plus faible chez les patients traités par Belatacept avec 6% et 5% contre 11% avec la CsA, y compris chez ceux ayant subi un rejet (12% et 8% contre 19%)(117). Cela explique

certainement, avec l'absence de néphrotoxicité confirmée par l'analyse du profil transcriptionnel des biopsies (119), le maintien d'une meilleure fonction rénale à 5 ans chez les patients traités par Belatacept (74, 76 et 53 ml/min/1,73m²) (120).

Cette efficacité dans le contrôle de la réponse humorale déjà constatée en préclinique peut s'expliquer par l'importance de CD28 pour la réponse Tfh primaire, mentionnée ci-dessus. En effet dans un modèle préclinique de rejet humoral aigu survenant au cours de la reconstitution consécutive à un traitement lympho-déplétant (121), l'adjonction de Belatacept prévient la réponse Tfh au sein des organes lymphoïdes secondaires, la survenue de DSA et donc le rejet.

Critères secondaires

Par ailleurs BENEFIT et BENEFIT-EXT ont démontré que les patients sous Belatacept et donc sans CNI, présentaient un meilleur profil cardiovasculaire et métabolique (122,123), permettant de réduire l'utilisation de médicaments pour contrôler l'hypertension artérielle, les anomalies lipidiques et la survenue d'un diabète, ce qui participe aussi peut être à la différence en terme de fonction rénale.

Tolérance

Alors que la tolérance générale et la survenue d'infections étaient similaire entre les groupes, le principal risque du Belatacept mis en évidence par BENEFIT et BENEFIT-EXT est la survenue de syndrome lympho-prolifératif post transplantation (PTLD), dont certains du système nerveux central (particulièrement avec le régime plus intensif). Ces PTLT le plus souvent EBV-induits, surviennent dans les 18 premiers mois avec un risque dix fois plus important chez les patients avec une sérologie EBV négative ce qui a conduit à la contre-indication du Belatacept dans cette population (120).

3.2.2. AUTRES ESSAIS CLINIQUES

Inhibiteur de mTOR et abstention en corticoïdes

Une autre association possible avec le Belatacept pour éviter le recours aux CNI sont les inhibiteurs du mTOR (124). Un autre objectif en transplantation est d'éviter le recours aux corticoïdes. Un essai de phase II a ainsi comparé trois bras : Belatacept-MMF, Belatacept-

Sirolimus et Tacrolimus-MMF, à chaque fois sans corticoïdes au long cours mais avec une induction par sérum anti-lymphocytaire (SAL) (125). L'incidence de rejet était globalement plus faible que dans BENEFIT, probablement du fait de la différence d'induction, encourageant l'abstention ou le sevrage précoce en corticoïdes. Comme dans BENEFIT, le groupe Belatacept-MMF présentait plus de rejet que le groupe Tacrolimus-MMF, à l'opposé du groupe Belatacept-Sirolimus, cependant le nombre de changement de bras était plus important dans ce dernier du fait de la mauvaise tolérance du Sirolimus. A 1 an les patients des 2 groupes Belatacept présentaient une meilleure fonction rénale (environ 10 ml/min plus haute) que dans le bras Tacrolimus-MMF.

Une autre étude a étudié l'association Belatacept / sirolimus, cette fois avec une induction par Alemtuzumab (126). De plus en se référant aux bons résultats de combinaison blocage de la costimulation / transfusion de cellules du donneur, la moitié des patients reçurent de la moelle osseuse de leur donneur. Après 1 an, il était proposé au patient de poursuivre une bithérapie ou de maintenir uniquement le Belatacept. Globalement les résultats furent satisfaisants quel que soit le groupe (avec ou sans moelle osseuse). Sur les 10 patients qui acceptèrent d'arrêter le sirolimus, 5 gardèrent une fonction rénale stable, sans que des DSA n'apparaissent et 5 présentèrent un rejet ou des lésions borderlines, parmi lesquels 2 furent finalement passés en monothérapie.

Changement CNI pour Belatacept

Une autre alternative pour diminuer l'exposition aux CNI est de commuter à distance de la greffe les CNI pour un autre traitement. Cette stratégie a été utilisée dans un essai de phase II, chez des patients stables, entre 6 et 36 mois après la greffe, les patients étaient randomisés entre arrêt des CNI remplacés par le Belatacept ou poursuite des CNI (127,128). Les résultats montraient une amélioration de la fonction rénale après l'arrêt des CNI, particulièrement avec le tacrolimus, bien que dans le groupe Belatacept 5% des patients présentaient un rejet dans les 6 mois suivant le switch.

3.3 MECANISMES DE LA RESISTANCE AU BLOCAGE DE LA COSTIMULATION PAR LE CTLA4-IG.

3.3.1. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS

Nous avons vu ci-dessus l'importance de CD28 pour la génération, l'homéostasie et la fonction des lymphocytes T régulateurs, ainsi que de celle de CTLA-4 pour leur fonction. Or, l'équilibre entre lymphocytes T effecteurs et régulateurs intervient dans l'induction et le maintien de la tolérance (129). Ainsi, il a été proposé que l'origine des rejets résistants aux Belatacept soit secondaire à la survenue d'un déséquilibre entre lymphocytes T conventionnels et régulateurs, au détriment de ces derniers.

Données expérimentales

Le CTLA4-Ig empêche l'induction de tolérance dans un modèle murin d'induction de tolérance à une greffe de peau dépendante des T régulateurs, consistant en l'administration de complexe IL-2/IL2-R (130). Dans ce modèle l'administration d'anti-CD28 agoniste restaure la tolérance. Dans une autre étude il était montré qu'alors que le CTLA4-Ig augmente la survie du greffon lors d'une greffe entre deux lignées de souris avec un complet mis-match de classe II, il accélère le rejet dans un modèle où le pool de cellules allo-réactives est faible et la survie à long terme dépendante des cellules T régulatrices (131).

Données cliniques

Les données issues de BENEFIT, quant aux cellules T régulatrices, sont contradictoires. Bluestone *et al* ont observé que contrairement aux anti-IL2R, qui diminuent le nombre de cellules Foxp3+ dans le sang périphérique à court terme, le Belatacept n'avait pas d'effet en comparaison des CNI (132), confirmant les données de la première étude de phase II qui ne retrouvaient pas d'expansion des Treg (133). Par ailleurs, en immuno-histologie, le ratio cellules Foxp3+/CD3+ était plus important dans l'infiltrat des biopsies de rejet aigu des patients sous Belatacept (132). En revanche, Grimbert *et al* (134) en utilisant la mesure des transcrits de Foxp3 dans les biopsies protocolaires à 12 mois de BENEFIT trouvaient significativement moins de Foxp3 dans le groupe Belatacept alors qu'aucune autre différence de niveau d'expression n'était constatée (marqueurs Th1, Th2, Th17 et Granzyme B).

Le Treg Specific Demethylation Region (TSDR)

Une explication possible de cette différence et plus généralement de la confusion qui entoure les études en transplantation rénale utilisant la mesure de Foxp3 (135), est son manque de spécificité. En effet chez l'homme, Foxp3 peut être exprimé transitoirement dans les cellules T effectrices (136). Ainsi sa pertinence en particulier dans des environnements inflammatoires tels qu'un rejet aigu a été remise en question (135). C'est l'expression stable de Foxp3 qui en revanche est spécifique des lymphocytes Treg (137). Floess *et al* (138) ont montré qu'elle est maintenue par un mécanisme épigénétique : la déméthylation d'une région non codante du gène de Foxp3 : le TSDR. Cela a été étendu à d'autres gènes dont CTLA-4, et il a été montré que le degré de la déméthylation corrèle avec « l'authenticité » des Treg, leur stabilité : contrairement aux Treg induit *in vitro* les nTreg sont totalement déméthylés (139). Cela ne signifie pas, contrairement à ce qui est parfois compris, que tous les iTreg sont méthylés au niveau de ces régions. Au contraire par définition, les iTreg en particulier induit *in vivo*, qui sont stables, dont la fonction est relevante, devrait avoir cette signature épigénétique synonyme d'une stabilité de l'expression de Foxp3 (140).

L'analyse de la méthylation du TSDR est donc une technique beaucoup plus spécifique pour quantifier les Treg (141). En transplantation rénale Bestard *et al* (142) ont montré que la déméthylation du TSDR ne corrèle pas avec le marquage par Foxp3 en situation inflammatoire (rejet aigu cellulaire), mais bien dans les cas de rejet infra-clinique.

3.3.2. L'IMMUNITE HETEROLOGUE

Concept et preuves

Comme mentionné ci-dessus, à la suite d'études *in vitro* et *in vivo* chez la souris CD28 déficiente, l'idée que les lymphocytes T mémoires sont indépendants de la costimulation via CD28 était admise. Par conséquent, ces cellules ont été rendues responsables des rejets résistants au Belatacept en vertu du principe d'immunité hétérologue. Ce concept issu de la virologie, correspond à l'activation d'une cellule mémoire spécifique d'un virus par la reconnaissance croisée d'un autre virus dit hétérologue, par mimétisme moléculaire (et non pas simplement par effet bystander) (143). Avant même qu'elle ne soit démontré pour les virus, la réactivité croisée entre des lymphocytes T cytotoxiques spécifique d'un virus et une cible allo-

génique non infectée avait été mise en évidence (144,145). Cela est attribué à la reconnaissance par un même TCR du complexe peptide spécifique d'un pathogène / CMH du soi, et d'un complexe peptide / allo-CMH. L'exemple le plus connu fut rapporté par Burrows *et al*, qui ont observé que les cellules T CD8⁺ spécifiques du peptide EBNA3A de l'EBV restreint au HLA-B8, croisent avec le HLA-B44 présentant un peptide du soi. Par ailleurs des études chez l'homme ont montré que la fréquence de cellules T mémoires allo-réactives chez le donneur est corrélée au pronostic de la greffe (6). Récemment, les bases moléculaires de ce phénomène (146), ainsi que son amplitude dans le contexte de la transplantation ont été précisées (147).

Ainsi, l'implication de l'immunité hétérologue était suspectée dans la résistance à l'induction de tolérance dans les situations où le receveur avait des antécédents d'exposition à des antigènes. En effet de nombreuses études ont montré que les receveurs précédemment infectés avec différents micro-organismes deviennent réfractaires aux protocoles d'induction de tolérance utilisant du CTLA4-Ig (148,149) et cette résistance est transmise par le transfert des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ d'un animal immunisé dans un animal naïf (150). Dans un modèle plus relevant de transplantation rénale chez le primate où la tolérance est induite par la combinaison entre le blocage de la costimulation et des transfusions de cellules du donneur, la fréquence des cellules mémoires préexistantes allo-réactives vis-à-vis du donneur (mesurée par ELISPOT) corrèle avec la survenue du rejet aigu (151). Globalement, ces études concluent que la résistance à l'induction de la tolérance par blocage de la costimulation dans les modèles expérimentaux et par extrapolation les rejets résistants au Belatacept, sont causés par le phénomène d'immunité hétérologue.

Cellules effectrices plutôt que mémoires.

Les études plus récentes ont nuancé et précisé ces données en montrant que les cellules résistantes au blocage de la costimulation, dans le contexte de la transplantation, sont plutôt des cellules effectrices que des cellules mémoires. Même si le contexte est différent (le niveau de stimulation antigénique étant plus intense, particulièrement dans la phase initiale faisant intervenir la reconnaissance directe) cela est en adéquation avec les progrès, mentionnés ci-dessus, démontrant l'importance des signaux de costimulation médiées par CD28 dans le cadre des réponses mémoires anti-infectieuses (cf 2.3.1).

Lorsque des cellules T CD8+ centrale mémoire (TCM) ou des effectrices mémoires (TEM) sont transférées dans un individu sauvage, elles ont la même capacité à rejeter une greffe qui leur est spécifique (152). En revanche lorsqu'elles sont transférées dans un individu aly-déficient (ce qui conduit à l'absence d'organes lymphoïdes secondaires), les TEM sont significativement plus à même de rejeter la greffe. Cela suggère que les TCM et pas les TEM sont dépendantes des CPA et par extension de la costimulation pour être réactivées.

De façon analogue, dans un modèle d'immunité hétérologue généré par une infection latente de souris par un virus, les cellules T effectrices (CD44^{high}CD127^{low}CD62L^{low}) et les TEM (CD44^{high}CD127^{high}CD62L^{low-int}) et pas les TCM étaient responsables de la résistance à l'induction de tolérance par blocage de la costimulation (153). Une autre étude a montré que la résistance au blocage de la costimulation est dépendante des conditions dans lesquelles les cellules allo-spécifiques sont générées. Seules les cellules T ayant été suffisamment exposées à l'antigène, ce qui est réputé favoriser l'émergence d'une population de cellules effectrices, résistent au blocage de la costimulation (154). Cela semble se confirmer par l'étude *in vitro* des effets différentiels du Belatacept sur la prolifération des cellules T en réponse soit à des peptides viraux chargés sur des CPA autologues soit à une stimulation allogénique. Xu *et al* (155) ont montré qu'un large répertoire prolifère lors de la stimulation allogénique mais avec peu de cellules polyfonctionnelles (c'est-à-dire exprimant l'IFN γ , TNF α et l'IL-2, ce qui correspond à un profil de cellules effectrices). A l'opposé, les cellules répondant aux peptides viraux représentent une faible proportion mais sont majoritairement polyfonctionnelles. Dans tous les cas quand le Belatacept est ajouté aux cultures cellulaires, seules les cellules les plus différenciées échappent au blocage de la costimulation.

Les cellules T CD28 négative

Cela est aussi en adéquation avec le phénotype des cellules T CD28 négative qui sont de fait indépendante vis-à-vis de CD28 pour leur activation. Cette population est composée essentiellement de lymphocytes T CD8+, elle est retrouvée principalement chez l'homme et les primates, ce qui a limité leur étude chez les rongeurs. Néanmoins sa responsabilité dans les rejets résistants au Belatacept est suspectée (156,157). Leur proportion augmente avec l'âge, probablement du fait que la perte de CD28 est consécutive à l'exposition itérative aux antigènes. Il apparaît que ces cellules ont d'importantes capacités effectrices. Leur seuil

d'activation est bas, parfois elle pourrait même être indépendante de l'antigène (avec un risque d'auto-immunité), mais elles possèdent en contrepartie de nombreuses CSSM inhibitrices et elles présentent un potentiel de prolifération réduit. Globalement leur contribution à la réponse immunitaire est néfaste, s'inscrivant dans le tableau plus large de l'immuno-senescence (158,159). Il a été montré que ce phénomène (et donc la proportion de cellules T CD28 négatives) est exacerbé chez les patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (160) candidat à la transplantation et lors de la reconstitution consécutive à un traitement d'induction par SAL (161).

Le blocage d'ICOS

Les cellules T mémoires / effectrices, y compris celles qui conservent CD28, à l'inverse des cellules T naïves, expriment d'autres CSSM activatrices dont les signaux sont plus ou moins redondants avec ceux médiés par CD28. Leur blocage est donc une des stratégies envisagées pour « rattraper » les cellules T qui échappent au CTLA4-Ig. La principale de ces CSSM activatrice est ICOS. Son antagonisation en association avec le CTLA4-Ig, dans des modèles de greffe chez le rongeur, a produit des résultats contrastés : amélioration de la survie dans certains cas (162,163), abrogation de l'effet bénéfique du CTLA4-Ig dans un autre (164). Récemment une protéine de fusion ICOS-Ig a été évaluée dans un modèle de transplantation rénale chez le primate (165). Celle-ci n'améliorait pas la survie que ce soit en monothérapie ou en association avec le Belatacept, cet échec était attribué à la perte concomitante de CD28 et d'ICOS, la majorité des cellules T CD8+CD28 négative infiltrant la greffe étant aussi ICOS négative.

Le ciblage des intégrines

Les cellules T mémoires / effectrices en plus de leur capacité de homing en périphérie présentent à leur surface des molécules d'adhésions qui leur permettent après leur interaction avec les cellules endothéliales de migrer au sein des tissus pour, dans le cas de la transplantation, rejeter la greffe. Après que le blocage d'une de ces molécules, LFA-1, ait montré prévenir le rejet dans un modèle de greffe cardiaque chez la souris (166), cette stratégie a été utilisée pour tenter de compenser la résistance des cellules mémoires vis-à-vis du blocage de la costimulation. Un effet synergique avec le CTLA4-Ig a été observé chez la souris dans un modèle de GVHD (167) et chez le primate dans un modèle de transplantation d'îlots

pancréatiques (168) et un essai de phase II débuté. Malheureusement des cas de Leucoencephalopathie Multifocale Progressive (LEMP) secondaire à une infection par le JC virus ont été rapportés, ce qui conduit à l'abandon de cette molécule (169). Une autre stratégie a consisté à bloquer CD2 le ligand de LFA-3, avec une protéine de fusion LFA3-Ig (Alefcept). CD2 est une autre molécule d'adhésion exprimée par les cellules effectrices / mémoires potentiellement impliquées dans la résistance au Belatacept, y compris chez l'homme (156). Initialement, dans un modèle de transplantation rénale chez le primate, administré en association avec du sirolimus et du Belatacept, ce traitement améliorait la survie des greffons (170). Ce résultat n'a pas été confirmé par la suite en préclinique que ce soit dans un modèle de greffe d'îlot pancréatique (171) ou de rein (172), toujours avec l'association Belatacept-sirolimus puisque l'ajout d'alefcept accélérerait la survenue du rejet. Cela a été attribué d'une part à la réactivation du CMV du primate et à un effet délétère sur les Treg. A noter que dans un essai clinique de phase II, l'alefcept en association avec du tacrolimus, du MMF et des Cs comparé à un placebo ne diminuait pas l'incidence du rejet aigu à 6 mois (173).

Effet du blocage de CTLA-4 sur les cellules T Th17

Le rôle de l'immunité hétérologue dans la résistance au blocage de la costimulation par CTLA4-Ig pourrait aussi s'expliquer par le blocage des signaux intrinsèques inhibiteurs médiés par CTLA-4 pouvant lever l'inhibition des cellules effectrices / mémoires, par exemple, celles polarisées Th17 comme mentionné ci-dessus. Cela s'accorde avec l'absence d'efficacité du CTLA4-Ig dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, qui impliquent les cellules Th17, une exacerbation de la maladie ayant même été observée dans certains groupes de patient. Or, l'implication de ces cellules a été démontrée dans le rejet d'allogreffe (174) et évoquée dans la résistance au blocage de la costimulation (131). Dans un modèle murin où l'immunisation spécifique précédant la greffe était polarisée Th1 ou Th17 en co-administrant du *M.Tuberculosis* ou du *C.Albicans* respectivement, seules les souris orientées Th17, dont les lymphocytes Th17 spécifiques de la greffe sur-exprimaient CTLA-4, résistaient au blocage de la costimulation (175). En utilisant une autre approche, consistant à utiliser des souris KO ROR γ T pour obtenir un rejet orienté Th1 et des souris KO T-bet pour obtenir un rejet orienté Th17, Sabet-Baktach *et al* ont montré les lymphocytes T Th1 mais pas les Th17, étaient efficacement bloqués par le blocage de la costimulation. Chez l'homme,

Krummey *et al* (176) ont montré que les cellules Th17 allo-réactives expriment un plus haut niveau de CTLA-4 que les Th1. *In vitro*, après stimulation en présence de Belatacept, alors que la prolifération des Th1 est inhibée celle des Th17 est exacerbée. Enfin une association entre le niveau de cellules Th17 et l'incidence des rejets chez les patients traités par Belatacept était observée.

4 LE BLOCAGE SELECTIF DE CD28

4.1 LES ANTICORPS ANTI-CD28 DIVALENTS.

Le CTLA4-Ig, comme mentionné précédemment, avant même que le rôle régulateur de CTLA-4 soit découvert, a très rapidement été utilisé pour bloquer le second signal avec d'excellents résultats. Une fois la balance CD28 / CD80/86 / CTLA-4 décrites, l'inconvénient majeur du CTLA4-Ig est apparu : le blocage de CTLA-4 et non uniquement de CD28.

La difficulté pour obtenir une antagonisation sélective de CD28, est venue des caractéristiques des anticorps anti-CD28 divalents (177,178). En effet qu'ils soient qualifiés de conventionnels ou de super-agonistes, ils activent les cellules T. Les premiers nécessitant un signal 1, alors que les seconds activent les cellules T indépendamment du TCR.

4.1.1. LES ANTI-CD28 SUPER-AGONISTES

L'intérêt des anti-CD28 super-agonistes est leur propension à favoriser la prolifération des Treg *in vitro* et *in vivo* (179). Cette propriété leur confère une efficacité dans la prévention du rejet comme dans le contrôle de l'auto-immunité dans de nombreux modèles murins (180,181). Par ailleurs, il était montré que l'activation polyclonale des lymphocytes T par l'anti-CD28 agoniste TGN1412 augmente leur activité cytolytique *in vitro* contre les cellules B malignes de la leucémie lymphoïde chronique. C'est dans l'optique de cette indication qu'une étude de phase I fut initiée, lors de laquelle tous les volontaires sains présentèrent un orage cytokinique immédiat (182). Cette réaction n'avait pas eu lieu dans les études précliniques, cela serait dû à une différence de sensibilité, de seuil d'activation, entre les lymphocytes humains et ceux des primates, secondaire à la perte d'expression au cours de l'évolution humaine, d'une lectine inhibitrice liant l'acide sialique de type immunoglobuline (la SIGLEC-3, CD33) (183).

4.1.2. LES ANTI-CD28 CONVENTIONNELS

Pour ce qui est des anti-CD28 conventionnels divalents leur effet agoniste s'explique par la dimérisation (le cross-linking) des molécules de CD28 à la surface du lymphocyte. Dans l'hypothèse que ce phénomène est dépendant de l'engagement de Fc récepteurs, des anti-CD28

rendus « silencieux » vis-à-vis de ces derniers ont été développés, néanmoins, ils conservent des propriétés agonistes certes amoindries (184).

In vivo, certains de ces anticorps ont montré chez le rongeur une efficacité dans la prévention du rejet (185,186). Néanmoins, leur mode d'action controversé, repose sur un équilibre fragile, pouvant faire craindre comme dans le cas des anti-CD28 superagonistes une exacerbation de la réponse immunitaire, ce qui a entravé leur développement clinique.

L'anticorps de souris anti-CD28 anti-rat JJ319, bien que divalent est qualifié de « modulateur » car il induit une diminution de l'expression de CD28 à la surface des lymphocytes T *in vivo*, ce qui en fait un « antagoniste fonctionnel » (187). Alors que dans d'autres cas (foie et cœur), il est nécessaire de lui adjoindre d'autres éléments (CNI, transfusion de cellules du donneur, CD40-Ig), en transplantation rénale, son injection sur une courte période permet l'induction de tolérance par un mécanisme dépendant d'IDO (188,189). Mais aucun anti-CD28 anti-humain avec des propriétés similaires n'a été décrit.

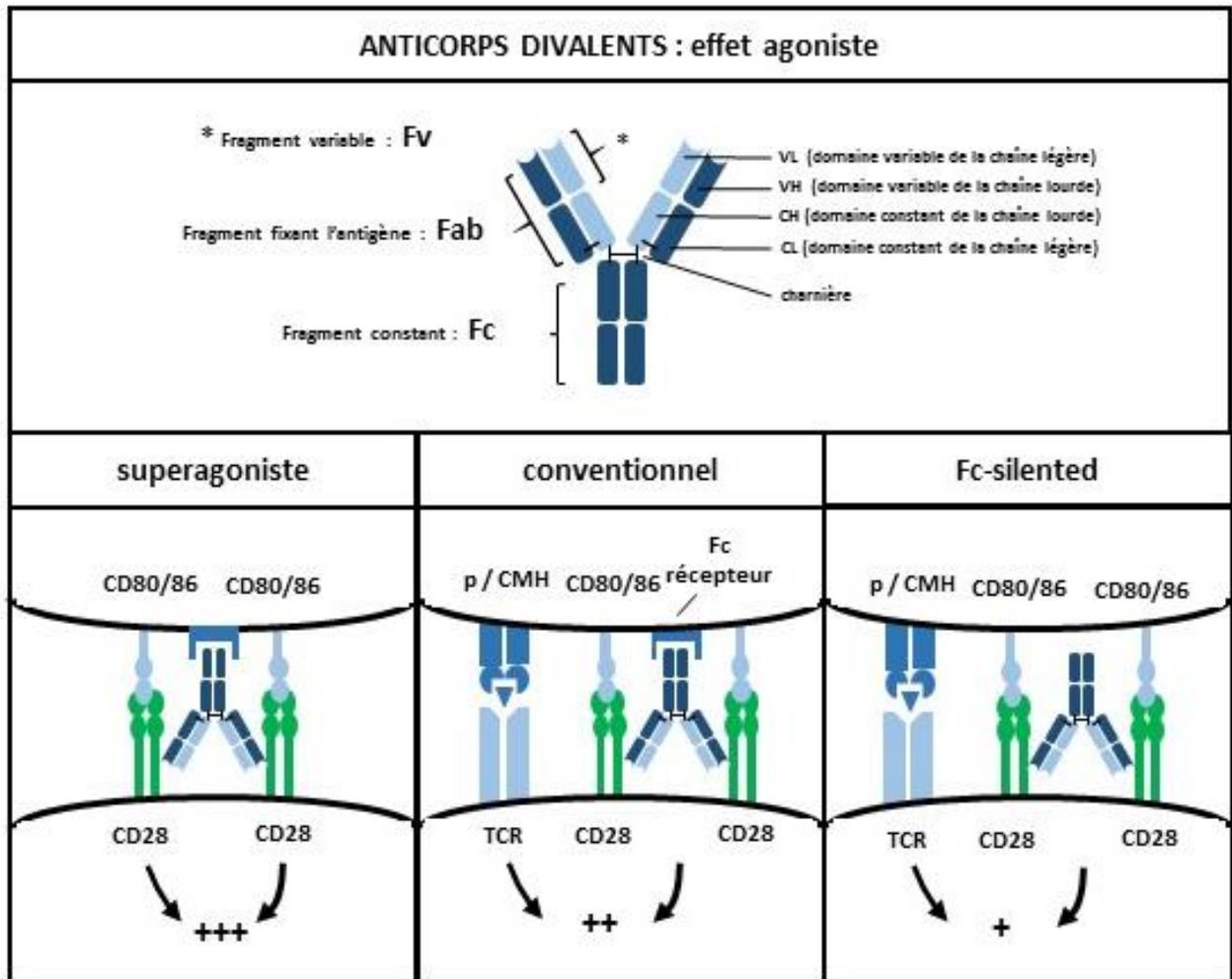


Figure 9 : les différents types d'anticorps anti-CD28 divalents et leur mode de fonctionnement.

4.2 LES ANTI-CD28 MONOVALENTS

4.2.1. LE sc28AT

Une autre approche moins équivoque, consiste à véritablement antagoniser CD28. Depuis très longtemps cette propriété était reconnue aux fragments Fab monovalents d'anti-CD28 monoclonaux conventionnels, qui ne cross-link pas CD28, et sont capables d'induire l'anergie *in vitro* (190). L'inconvénient de ces molécules est leur demi-vie très courte *in vivo*, où ils avaient néanmoins montré leur efficacité dans le traitement de l'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris avec des fragments Fab d'anticorps ciblant CD28 (clone PV1) (191). Pour remédier à ce problème, notre équipe a développé une molécule de fusion consistant en la partie variable des chaînes lourdes et légères (scFv, cf **Figure 10**) de l'anti-CD28 conventionnel et très affin CD28.3, fusionnée avec une molécule humaine d' $\alpha 1$ anti-trypsine pour augmenter sa demi-vie d'élimination (192).

In vitro, comme attendu cette molécule se comporte comme un « vrai » antagoniste en inhibant la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T humains sans dimériser les molécules de CD28. De plus, il a été démontré que le maintien de CTLA-4 contribue aux effets du sc28AT. Comme mentionné ci-dessus, CTLA-4 reverse le stop signal induit par le signal 1, ainsi en présence du sc28AT les lymphocytes restent mobiles, sans apparition d'une SI stable. En revanche le blocage de CD80/86 (avec du CTLA4-Ig ou des anti-CD80/86) bien qu'inhibant l'activation des lymphocytes (visualisée par des flux calciques), n'empêche pas la formation de SI (193). Chez le rongeur, le temps de contact entre les lymphocytes et leurs CPA spécifiques a été inversement corrélé avec l'induction de tolérance (194). Cela démontre que préserver le rôle intrinsèque de CTLA-4 dans la régulation spatio-temporelle de la SI peut constituer un avantage. Par ailleurs sc28AT n'altère pas l'activité des Treg dans des tests de suppression (193), contrairement à un anti-CTLA-4, ce qui démontre que le blocage sélectif de CD28 préserve les fonctions suppressives de CTLA-4 au niveau des Treg.

In vivo, dans un modèle de transplantation rénale chez le babouin, en monothérapie, le sc28AT n'augmentait que très modestement le temps de survie médian (11 jours contre 6 pour le contrôle). En revanche en association avec du tacrolimus (25 jours de sc28AT et 90 jours de tacrolimus) aucun rejet n'était observé, y compris après l'arrêt des

traitements, bien que des animaux durent être euthanasiés à 23, 36 et 130 jours pour nécrose tubulaire aigue ou pyélonéphrite et un dernier perdu lors d'un accident d'anesthésie à J 103. La comparaison était rendu possible par le groupe tacrolimus en monothérapie pour lequel 50% des animaux rejetèrent la première semaine, mais l'autre moitié seulement après l'arrêt du traitement à 90 jours. Ainsi le niveau des Treg (CD4+CD25highCD127low) dans le sang était augmenté en valeur absolue et en proportion de cellules CD4+ dans le groupe sc28AT / tacrolimus en comparaison du groupe tacrolimus seul. De plus dans l'infiltrat des greffons à 1 mois et 3 mois, en immunohistochimie, le pourcentage des Treg Foxp3+ parmi les cellules CD3+ était significativement plus important dans le groupe recevant du sc28AT. Par ailleurs, l'analyse des transcrits retrouvait, à une semaine, un niveau d'expression d'IDO significativement supérieur. Enfin dans un modèle d'allogreffe cardiaque, le sc28AT en synergie avec la ciclosporine, prévenait le rejet aigu et la vasculopathie (193).

Des résultats comparables ont été obtenus, avec le α 28scFv (un scFv d'un anti-CD28 anti-souris, clone PV1), dans un modèle d'allogreffe cardiaque (195). En l'utilisant en monothérapie durant 2 semaines, il permettait d'obtenir une médiane de survie de 27 jours (contre 9 sans traitement). En association avec 3 jours de ciclosporine ou une dose d'anti-CD40L (MR1) une survie indéfinie était obtenue (> 100 jours) associée à une incidence et une sévérité plus faible de la vasculopathie d'allogreffe. De plus, à J10, dans ces deux groupes, le pourcentage de cellules CD4+Foxp3+ parmi les lymphocytes et les transcrits d'IDO, étaient supérieurs. Le blocage de CTLA-4 durant le traitement par α 28scFv conduisait à une accélération du rejet associée à l'inhibition de l'expression de Foxp3 et d'IDO.

4.2.2. LE FR104

Afin d'améliorer encore la pharmacocinétique du sc28AT, notre équipe a développé une nouvelle molécule, le FR104 consistant en l'association d'un Fab', constitué des domaines variables (VH et VL) du CD28.3, humanisés et d'une fraction de polyéthylène glycol (196). Cette pegylation n'altère pas les capacités de liaison à CD28 mais en revanche améliore grandement la demi-vie mesurée *in vivo* chez la souris (33,6 h contre 1,5 h). *In vitro* le FR104 inhibe la prolifération des lymphocytes T en MLR et leur sécrétion d'IL-2 de façon dose dépendante.

Un élément important étant donné l'historique des anti-CD28 au sens large, était de démontrer son absence d'effet agoniste en particulier sur des cellules humaines. Cela était démontré *in vitro* y compris dans des conditions limites qui favorisent le cross-linking, et *in vivo*, dans un modèle de souris humanisée (NOD/SCID reconstituée avec des cellules mononuclées du sang de donneurs sains). Une semaine après le transfert, les souris reçurent soit un anti-CD28 super-agoniste, soit un anti-CD28 conventionnel divalent qui induisent une activation des cellules T et une sécrétion de cytokine, contrairement au FR104.

Dans le même temps l'effet du FR104 sur la maladie du greffon contre l'hôte qui survient sur un mode xéno-génique dans ces souris une fois « engraftées » a été évalué. Alors que sans traitement la GVHD survient en une semaine, le FR104 administré deux fois par semaine de J0 à J25 prévenait la GVHD indéfiniment (jusqu'à 1 mois après l'arrêt). Dans ce modèle la co-administration d'anti-CTLA-4 abrogeait complètement l'effet du FR104. L'administration de Belatacept hebdomadaire était partiellement efficace alors qu'une administration deux fois par semaine n'avait pas d'effet ce qui évoque les différences entre régime plus ou moins intensif observées dans BENEFIT (cf 3.2.1).

4.2.3. LE CD28 DAB

Récemment a été élaboré un autre antagoniste de CD28 murin, qui consiste en une unique chaîne légère κ d'immunoglobuline (nanobody) sélectionnée par la technique dite de « phage display » à partir d'une bibliothèque contenant de multiples chaînes lourdes et légères.

Liu *et al* (197) ont comparé cette molécule avec le CTLA4-Ig (abatacept) dans des modèles de greffe de peau chez la souris. Dans un contexte d'incompatibilité pour le CMH, alors que l'association d'un anti-CD40L avec le CTLA4-Ig permettait une médiane de survie de 32 jours, celle avec le CD28 dAb allongeait celle-ci (>50 jours). En monothérapie dans un modèle d'incompatibilité mineure (expression transgénique d'OVA par le donneur), le CD28 dAb permettait une survie > 100 jours contre 32 jours pour le CTLA4-Ig.

Dans l'infiltrat du greffon, les cellules T CD4+ et CD8+ spécifiques de la greffe étaient moindre et qualitativement moins différenciées dans le groupe traité par le CD28 dAb. Par ailleurs dans ce même groupe, le niveau d'expression d'ICOS était diminué et celui de 2B4, une CSSM inhibitrice, augmenté, parmi les cellules T CD8+. Alors que l'augmentation de 2B4

dépendait de signaux intrinsèques médiés par CTLA-4, la diminution relative d'ICOS était dépendante de l'engagement de 2B4. Enfin il était montré, en utilisant des souris transgéniques (2B4 KO (189) ou surexprimant ICOS (198)) que seule la modulation de 2B4 en présence du CD28 dAb avait une conséquence sur la survie de la greffe. Cette régulation de l'expression de 2B4 serait donc une fonction intrinsèque de CTLA-4, jamais décrite jusqu'à présent, dont le maintien garanti par un blocage sélectif de CD28 serait un avantage par rapport au CTLA4-Ig.

Une molécule analogue spécifique du CD28 humain a été développée puis pegylée pour améliorer sa pharmacocinétique. Ses propriétés antagonistes et son absence d'effet agoniste ont été démontrées *in vitro* et *in vivo* chez le macaque dans un modèle d'immunisation par la KLH (199).

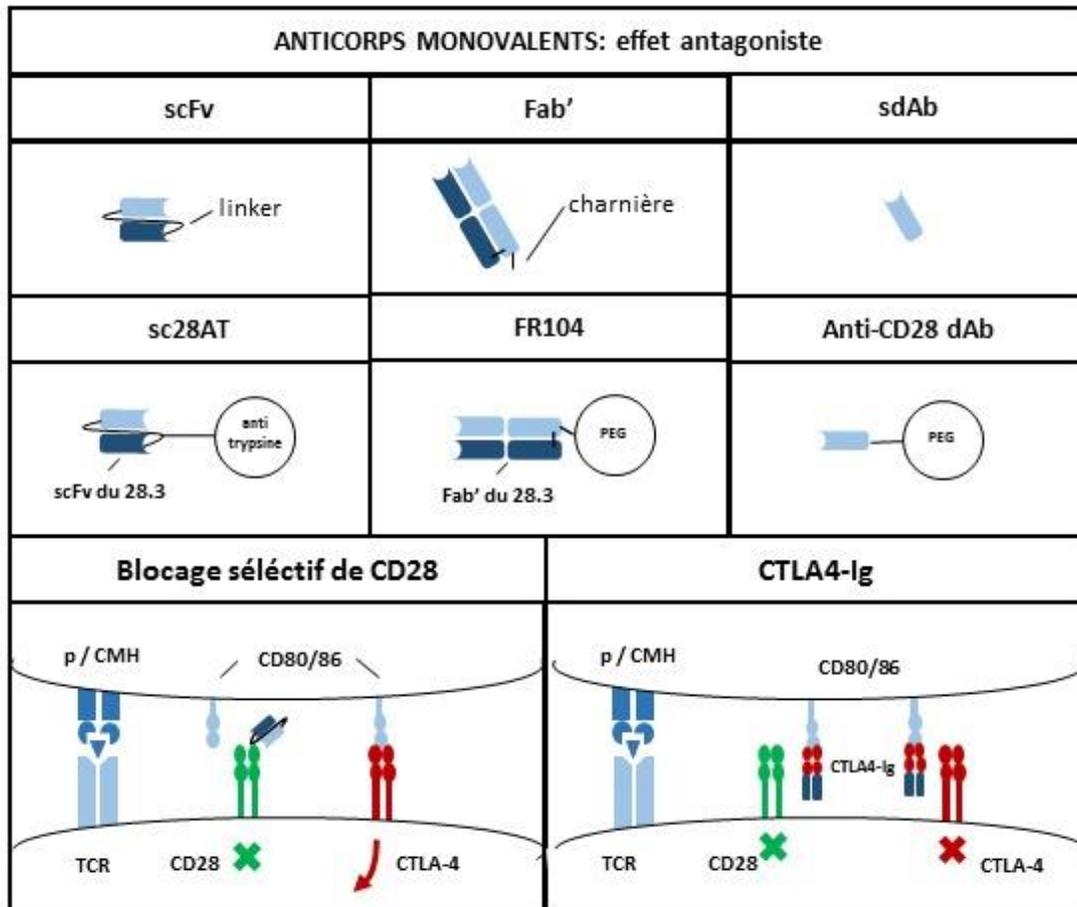


Figure 10 : les différents types de fragments monovalents antagonistes d'anticorps anti-CD28 et le concept de blocage sélectif / non-sélectif de la balance CD28 / CD80/86 / CTLA-4.

RESULTATS

PARTIE 1 – ARTICLE 1

4.3 OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL

Comme nous l'avons vu en introduction, notre équipe a montré dans un modèle de transplantation rénale chez le primate l'efficacité du blocage sélectif de CD28 avec le sc28AT, un scFv issu de l'anticorps anti-CD28.3 couplé à l' α 1-antitrypsine, aux propriétés antagonistes. Alors qu'en monothérapie il retardait simplement l'apparition du rejet aigu, son association avec la ciclosporine était très encourageante (193).

In vitro, son action préservait les fonctions de CTLA-4, aussi bien intrinsèque (réversion du STOP signal), qu'extrinsèque (fonction suppressive des Treg). *In vivo* par rapport au groupe contrôle ciclosporine seule, la quantité de Treg était plus importante en périphérie dans le sang et dans l'infiltrat des greffons (193).

La pharmacocinétique de cette molécule ne permettant pas son utilisation en pratique clinique (une administration par jour), à partir du même anti-CD28 divalent conventionnel, un Fab' pégylé, le FR104, a été produit, avec cette fois, une fréquence d'administration hebdomadaire voir au-delà. Son affinité pour CD28 et ses propriétés antagonistes exclusives (son absence d'effet agoniste) ont été confirmées *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris humanisées. Enfin dans ce même modèle le FR104 prévenait la GVHD xénogénique, de façon dépendante de CTLA-4 (196).

Ce premier travail constitue l'étape suivante, à savoir l'évaluation du FR104 dans un modèle préclinique de transplantation rénale chez le primate.

Le premier objectif était de confirmer les données de pharmacocinétiques attendues chez un grand animal après celle recueillies chez la souris.

Le second objectif était d'évaluer l'efficacité du FR104 en transplantation rénale, avec la perspective des deux principales problématiques qui se pose en pratique clinique lors d'une première greffe, avec pour conséquence l'apparition de la néphropathie chronique d'allogreffe.

La CAN aboutit à la perte du greffon et à la nécessité d'une nouvelle transplantation posant d'autres problèmes.

La première problématique, est la néphrotoxicité des inhibiteurs de la calcineurine, principal facteur non immunologique contribuant à la CAN. Jusqu'à présent, aucune molécule utilisée en monothérapie n'a permis de prévenir le rejet de façon satisfaisante. Les stratégies visant à diminuer l'exposition aux CNI sont :

- (1) l'association de deux molécules d'une autre classe immédiatement après la transplantation ou au-delà (switch).
- (2) de diminuer les doses de CNI.

Le FR104 a donc été associé au mycophenolate mofétil (MMF), à un inhibiteur du mTOR (la rapamycine) ou à de faible dose de tacrolimus, sur une durée de 90 jours, afin de déterminer quelle stratégie serait la plus prometteuse en vue de son introduction chez l'homme.

Le principal facteur immunologique responsable de la CAN est la survenue de façon plus ou moins indolente d'un rejet, dans lequel la composante humorale, via l'émergence de DSA, est prépondérante. La capacité du FR104 à prévenir l'apparition de DSA a donc été explorée, y compris en monothérapie, dans un modèle d'allo-immunisation par injection sous-cutanée de cellules mononuclées du donneur, déjà décrit dans l'équipe pour induire des DSA contre les molécules de CMH de classe I et pour induire un rejet humoral aigu (200).

Enfin le troisième objectif, au vu des données précédemment obtenues avec le sc28AT était d'évaluer *in vivo*, dans un modèle préclinique, l'impact du FR104 sur les Treg au niveau quantitatif et de leur fonction. Nous avons vu en introduction la difficulté de quantifier les lymphocytes T régulateurs chez les primates, du fait de l'expression transitoire de Foxp3 dans les cellules T conventionnelles activées. Pour remédier à ce manque de spécificité, nous avons utilisé l'évaluation du statut de méthylation du TSDR, ce qui a constitué ma contribution principale à ce travail. Comme mentionnée en introduction le TSDR est une région non codante du gène de Foxp3 qui est déméthylée uniquement dans les Treg, témoignant d'une expression stable de l'expression de Foxp3.

Différentes techniques existent pour quantifier le degré de méthylation d'une région donnée dans une population cellulaire. Nous avons choisi d'adapter une technique déjà décrite pour l'homme par Wieczorek *et al* (141) : la MSP pour Methylthion Specific PCR, que nous avons adapté au babouin en séquençant au préalable le TSDR *de papio anubis*. Elle utilise comme toutes les techniques d'analyse de la méthylation, afin de transformer ce caractère épigénétique difficile à quantifier, en variation génétique plus facilement détectable, la propriété du bisulphite qui converti uniquement les cytosines non-méthylés en uracile. L'étape suivante consiste à réaliser deux PCR quantitatives sur le même échantillon, une avec des amorces et une sonde spécifiques du TSDR déméthylé, l'autre du TSDR méthylé. Cela permet pour un échantillon donné d'établir un ratio, proportionnel à la quantité de Treg. Sur les biopsies protocolaires à 1 mois (ou plus tôt en cas de rejet), en plus de la quantification de Foxp3 par qPCR et immunohistochimie, nous avons donc utilisé cette technique pour évaluer la richesse en Treg de l'infiltrat.

FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody, Prevents Alloimmunization and Allows Calcineurin Inhibitor Minimization in Nonhuman Primate Renal Allograft

N. Poirier^{1,2,3,†}, N. Dilek^{1,2,3,†}, C. Mary^{1,2,3},
S. Ville^{1,2}, F. Coulon^{1,2}, J. Branchereau^{1,2,4},
X. Tillou^{1,2,5}, V. Charpy^{1,2}, S. Pengam^{1,2},
V. Nerriere-Daguin^{1,2}, J. Hervouet^{1,2}, D. Minault^{1,2},
S. Le Bas-Bernardet^{1,2,4}, K. Renaudin⁴,
B. Vanhove^{1,2,3,‡} and G. Blancho^{1,2,4,*}

¹Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 1064, Nantes, France

²Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Université de Nantes, Nantes, France

³Effimune SAS, Nantes, France

⁴Department of Urology, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

⁵Department of Urology, Centre Hospitalier Universitaire, Caen, France

*Corresponding author: Gilles Blancho, gilles.blancho@chu-nantes.fr

[†]These authors contributed equally to the first authorship of this study.

[‡]These authors contributed equally to the senior authorship of this study.

Selective targeting of CD28 might represent an effective immunomodulation strategy by preventing T cell costimulation, while favoring coinhibition since inhibitory signals transmitted through CTLA-4; PD-L1 and B7 would not be affected. We previously showed *in vitro* and *in vivo* that anti-CD28 antagonists suppress effector T cells while enhancing regulatory T cell (Treg) suppression and immune tolerance. Here, we evaluate FR104, a novel antagonist pegylated anti-CD28 Fab' antibody fragment, in nonhuman primate renal allograft transplantation. FR104, in association with low doses of tacrolimus or with rapamycin in a steroid-free therapy, prevents acute rejection and alloantibody development and prolongs allograft survival. However, when FR104 was associated with mycophenolate mofetil and steroids, half of the recipients rejected their grafts prematurely. Finally, we observed an accumulation of Helios-negative Tregs in the blood and within the graft after FR104 therapy, confirmed by Treg-specific demethylated region DNA analysis. In conclusion, FR104 reinforces immunosuppression in calcineurin inhibitor (CNI)-low or CNI-free protocols, without the need of steroids. Accumulation of intra-

graft Tregs suggested the promotion of immunoregulatory mechanisms. Selective CD28 antagonists might become an alternative CNI-sparing strategy to B7 antagonists for kidney transplant recipients.

Abbreviations: APC, antigen-presenting cells; CNI, calcineurin inhibitors; DSAs, donor-specific alloantibodies; MMF, mycophenolate mofetil; NHP, nonhuman primate; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; Teff, effector T cell; Treg, regulatory T cell; TSDR, Treg-specific demethylated region

Received 14 May 2014, revised 01 August 2014 and accepted for publication 04 August 2014

Introduction

In transplantation costimulation blockade is now considered as an alternative therapeutic strategy to specifically targeting T cell activation pathways. Costimulation blockade minimizes the renal, cardiovascular and metabolic morbidities associated with current immunosuppressors, such as calcineurin inhibitors (CNI) and steroids (1–3). Costimulation by molecules of the CD28 family contributes to establishing the balance between regulatory and pathogenic effector mechanisms after initial antigen exposure. The CD28–CD80/86–CTLA-4 costimulatory system functions as a molecular rheostat, where CD28–CD80/86 induces activation, proliferation and survival of effector T cell (Teff) as well as dampening regulatory T cell (Treg) function, while CTLA-4–CD80/86 delivers antiproliferative signals to Teff, is essential for the suppressive function of Treg, and confers subimmunogenic function to antigen-presenting cells (APC) (4).

Preventing CD28 access to its ligands with the CD80/86 antagonists abatacept (Orencia[®]; Bristol-Myers Squibb, New York, NY) and belatacept (Nulogix[®]; Bristol-Myers Squibb) has already proven immunosuppressive efficacy in the clinic (5,6). belatacept without CNI preserves patient and graft survival and improves renal function, cardiovascular and metabolic risk profiles compared with CNI (7–11). However, belatacept was developed with concomitant steroid maintenance therapy, and high rates of acute rejection have been recorded during phase III studies.

Selectively targeting CD28, to prevent engagement of CD80/86 with CD28 but not with CTLA-4, might therefore represent an effective strategy for modulating immune responses by preventing the maturation of deleterious effectors while preserving Treg functions (4,12–18). The theoretical advantage of selective CD28 blockade as compared with CD80/86 antagonists has been further reinforced by the recent discovery of the inhibitory interaction between PD-L1 and CD80 (19,20) and the activation interaction between CD28 and ICOSL (21). Previous work has shown that selective targeting of CD28 itself inhibits autoimmunity (22,23) and graft-versus-host disease (13,17,18,24,25), prevents acute and chronic allograft rejection in rodents (15,26–31), and induces regulatory cells (12,15,28,31–33) and immune tolerance in a CTLA-4 dependent manner (15). In nonhuman primate (NHP) kidney and heart transplantation, we reported that, with a pilot drug, selective CD28 blockade also inhibits acute and chronic rejection and promotes Tregs in association with CNI (12). However, its use in a CNI-free and steroid-free regimen was not evaluated and production of a selective CD28 antagonist devoid of any agonist properties and with a clinically compatible pharmacokinetic profile had yet to be achieved.

For that purpose, we developed FR104, a monovalent humanized Fab' antibody fragment CD28 antagonist, pegylated to prolong its half-life. We recently reported that FR104 cannot induce T lymphocyte activation, proliferation or cytokine release (34) and prevents graft-versus-host diseases in humanized mice through CTLA-4 dependent mechanisms (13).

In this study of NHP renal transplantation, we show that FR104 with CNI and steroid free or CNI low-dose regimen prevents allograft rejection, inhibits alloantibody development and prolongs allograft survival. Furthermore, FR104-treated recipients displayed increased Helios-negative Tregs in the blood and within the graft, confirmed by Treg-specific demethylated region (TSDR) DNA analysis.

Materials and Methods

Animals

Baboons (*Papio anubis*; 8–13 kg) were obtained from the Centre National de la Recherche Scientifique Primatology Center (Rousset, France). The animals were housed at the large animal facility of our laboratory and all experiments were performed in accordance with our institutional ethical guidelines. The donor–recipient combinations were chosen according to blood group compatibility, MHC mismatching by DRB MHC class II locus typing and verification of MHC incompatibility by MLR (stimulatory index >5).

Renal transplantation in baboons

Renal allotransplantation was performed on binephrectomized recipients, as described (12). Twenty-four hour diuresis was monitored daily, as well as blood urea nitrogen. Graftectomies were performed when plasma creatinine

levels rose to 500 $\mu\text{mol/mL}$, and surgical biopsies were performed for histological examination before euthanasia. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin—blinded histological examination by a pathologist. A second fragment was snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA extraction, and a third fragment was placed in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) for immunohistochemical staining. Protocol biopsies were performed at 1 month after transplantation. Recipient were either untreated; or received steroids (Solumedrol; Pfizer, New York, NY) intravenously 1 mg/kg/day (day 0–14) and mycophenolate mofetil (CellCept; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 35 mg/kg twice a day (*per os*) from day 0 to day 90; or tacrolimus (Prograf; Astellas, Tokyo, Japan) at 0.05 mg/kg/day (*i.m.*, adjusted to maintain trough levels between 5 and 10 ng/mL, considered as low in baboons) from day 0 to day 90; or Rapamycin (Sirolimus, Wyeth, Collegeville, PA) at 1 mg/kg/day (*per os*, adjusted to maintain trough level between 10 and 25 ng/mL) from day 0 to day 90; and/or received FR104 (Effimune) intravenously at 5 mg/kg at days 0, 4, 14 and then every 2 weeks until 3 months.

Allosensitization

Donor–recipient pairs were chosen according to absence of preformed donor-specific alloantibodies (DSAs) and MHC (class II) mismatching assessed by positive mixed lymphocyte culture and polymerase chain reaction (PCR) techniques. Briefly, 80 mL of heparinized blood was recovered from donors and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation. After lysis of red blood cells, the cells were resuspended in phosphate-buffered saline and adjusted to 20×10^6 cells/mL to be injected intradermally into recipients (two injections of 1 mL per animal). A challenge injection was performed with the same protocol 2 weeks later as previously described (35). Alloimmunization was confirmed by DSA detection using flow cytometry.

Mixed lymphocyte reactions

PBMC were isolated from whole blood of healthy donors (human or baboon) by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio, Courtaboeuf, France). Freshly isolated PBMC were incubated with allogeneic irradiated PBMC (10^5 cells/well of each cell type) for 5 days at 37°C, 5% CO₂, in complete medium (RPMI 1640, 5% human or baboon pooled serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate and 5 mM Hepes; all from Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesne, France). Cells were pulsed with 1 μCi of ³H-thymidine during the final 8 h of culture and then recovered and counted in a scintillation counter.

ELISA

Recombinant human CD28-Fc (R&D Systems, Abingdon, UK) was used at 2 $\mu\text{g/mL}$ in carbonate buffer (pH 9.2) to coat 96-well microtiter plates (Maxisorp Nunc, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) overnight at 4°C. Reactive sites were blocked with 1% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) in 0.1% Tween-PBS for 2 h at 37°C. FR104 samples were incubated for 2 h at 37°C and detected by monoclonal mouse antihuman kappa chain antibody (BioAtlantique, Nantes, France) at 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (1 h, 37°C) and by horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-mouse Ig antibody (0.41 g/mL, 1 h at 37°C; Jackson Immunoresearch, Marseille, France). Optical density was recorded at 450 nm after TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) revelation.

Flow cytometry

Fluorescent mAbs against human CD3 (SP34–2), CD4 (L200), CD25 (MA251), CD28 (28.6), CD127 (hIL-7R-M21) were from BD Biosciences (San Jose, CA). Anti-human Foxp3 staining kit (236A/E7) was purchased from eBioscience (Paris, France). Anti-human Helios (22F6) mAb was

purchased from Biologend (San Diego, CA). Polyclonal antibodies against human IgG and IgM were from DAKO (Trappes, France). FR104 staining was performed with a polyethylene glycol rabbit mAb (Epitomics; Abcam, Cambridge, UK) followed by a fluorescent goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen, Grand Island, NY). CD28 receptor occupancy by FR104 on T lymphocytes was determined by performing the ratio of median fluorescent intensity of FR104 staining between an unmodified blood sample and a blood sample incubated for 30 min at room temperature with a saturating concentration of FR104 (5 µg/mL). Polyclonal antibodies against human IgG and IgM were from DAKO (Trappes). DSA detection in sera was considered positive when the DSA score (PBMc median of fluorescence X % of positive-PBMc) was ≥2. The median of fluorescence for IgG and IgM could not be used when comparing new animals with historical controls. Samples were acquired on a BD FACSCANTO™ flow cytometer (BD Bioscience) and analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR).

Immunohistochemistry

Frozen sections (10 µm) were prepared from surgical or protocol renal biopsies. Slides were air-dried at room temperature for 1 h before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were saturated with phosphate-buffered saline containing 10% baboon serum, 2% normal goat serum and 4% bovine serum albumin. Sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, followed by fluorescent secondary antibodies. For intracellular immunostaining (CTLA-4, Foxp3 and Helios), sections were permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) in the saturating solution. Treg infiltration was determined by triple staining with antibodies against either 1/human CD3 (followed by Alexa Fluor 350-conjugated antibody against rabbit IgG; Invitrogen), human CTLA-4 (followed by Alexa Fluor 594-conjugated antibody against mouse IgG2a; Invitrogen), and human Foxp3 (followed by Alexa Fluor 488-conjugated antibody against mouse IgG1; Invitrogen), or 2/human CD3 (followed by Alexa Fluor 350-conjugated antibody against rabbit IgG; Invitrogen), human Helios (followed by Alexa Fluor 488-conjugated antibody against hamster IgG; Invitrogen), and human Foxp3 (followed by Alexa Fluor 568-conjugated antibody against mouse IgG; Invitrogen). Treg quantification was realized as previously described (12). For all biopsy samples, the percentage of CD3 cells expressing Foxp3, CTLA-4 or Helios was quantified manually (by two investigators blinded to the experimental conditions) on at least four different pictures from two different areas of

each tissue section separated by at least 100 µm. Slides were analyzed with the AxioVision imaging software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Messenger RNA analysis

Messenger RNA was extracted from snap-frozen renal biopsies with an RNA microextraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The quality and quantity of mRNA were controlled by infrared spectrometry (NanoDrop; Thermo Scientific, Waltham, MA). Messenger RNA was amplified and retrotranscribed with the Omniscript RT kit (Qiagen), and real-time quantitative PCR was then performed, as previously described (12), with an ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

TSDR analysis

Genomic DNA was isolated from frozen tissue slices incubated with 100 µL of lysis buffer supplemented with 2 mg/mL of proteinase K for 15 min at 56°C. DNA were purified using the NucleoSpin® Tissue kit (MacheryNagel, Düren, Germany) according to the manufacturer’s protocol. Bisulfite treatment of genomic DNA was performed with the EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer’s protocol. To adapt the protocol described by Wiczorek et al (36) to *P. anubis* we initially sequenced *P. anubis* TSDR using the primers previously described in human: tgtctggggtagag-gacct (forward primers), aaccgggtccaccctgt (reverse primers). *P. anubis* TSDR sequences showed no difference compared to human sequences in methylation-specific and demethylation-specific amplification primers. However, in hydrolysis probe sequences for TSDR there was one difference (an adenosine instead of a guanine), therefore we designed and validated new probes for *P. anubis*: atgggtggtggatgtattgggtt (demethylation-specific probe) and atggcgctcggatgtatc (methylation-specific probe). Real-time PCR was performed in a final reaction volume of 20 µL using Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) containing 15 pmol each of methylation or nonmethylation-specific forward and reverse primers for TSDR, 5 pmol of hydrolysis probe, 200 ng of lambda-DNA (New England Biolabs, Ipswich, MA) and 60 ng of bisulfite-treated genomic DNA template. Each sample was analyzed in duplicate using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics). Cycling conditions consisted of a 95°C preheating step for 10 min and 50 cycles of 95°C for 15 s followed by 1 min at 61°C. The proportion of

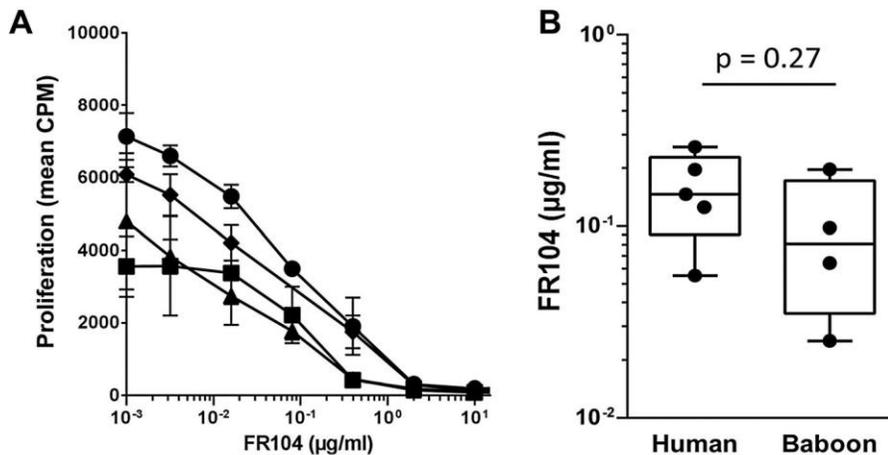


Figure 1: FR104 inhibition of T cell proliferation. (A) FR104 dose-response on baboon (n = 4) peripheral blood mononuclear cells mixed lymphocyte proliferation assay at day 5 assessed by ³H-thymidine uptake. (B) FR104 half-maximal inhibitory concentration (IC50) comparison in human (n = 5) versus baboon (n = 4) mixed lymphocyte reaction assay. Data are mean ± SEM for (A), each symbol represents a different experiment with different donors.

unmethylated DNA was computed as the ratio of unmethylated TSDR and methylated TSDR. For female recipients, this ratio was corrected by a factor of two due to the fact that one of the two TSDR alleles is methylated as a result of X-inactivation, as described by Wieczorek et al (36).

Statistical analyses

Graft survival times were plotted with the Kaplan–Meier representation, and survival time between different groups was evaluated with a log-rank test. Continuous variables were expressed as the mean \pm SEM, unless otherwise indicated, and compared with the Mann–Whitney nonparametric test. Multiple comparisons were analyzed with a one-way analysis of variance and a Kruskal–Wallis test. p-Values of <0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed on GraphPad Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Results

We have previously described the biological and antagonist properties of FR104, a humanized pegylated anti-CD28 Fab'

antibody fragment, *in vitro* on human leukocytes and *in vivo* in humanized mice models (13). In order to evaluate its potency in NHP, we first analyzed its antagonist properties in mixed lymphocyte reactions. As shown in Figure 1, FR104 dose-dependently inhibited baboon T-lymphocyte proliferation in a mixed lymphocyte reaction assay with an IC₅₀ ($0.10 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$, $n=4$), similar to what we measured with human PBMC in the same assay ($0.15 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, $n=5$).

FR104 was then administrated to three naïve baboons in order to evaluate its pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters (Figure 2). The elimination half-life in baboons injected once i.v. at 5 mg/kg was 8.4 ± 0.3 days. At this dose, serum concentration was maintained above $10 \mu\text{g/mL}$ for at least 20 days and full receptor occupancy was guaranteed for at least 1.5 months on peripheral blood lymphocytes (Figure 2A) and 1 month in lymph nodes (Figure 2B).

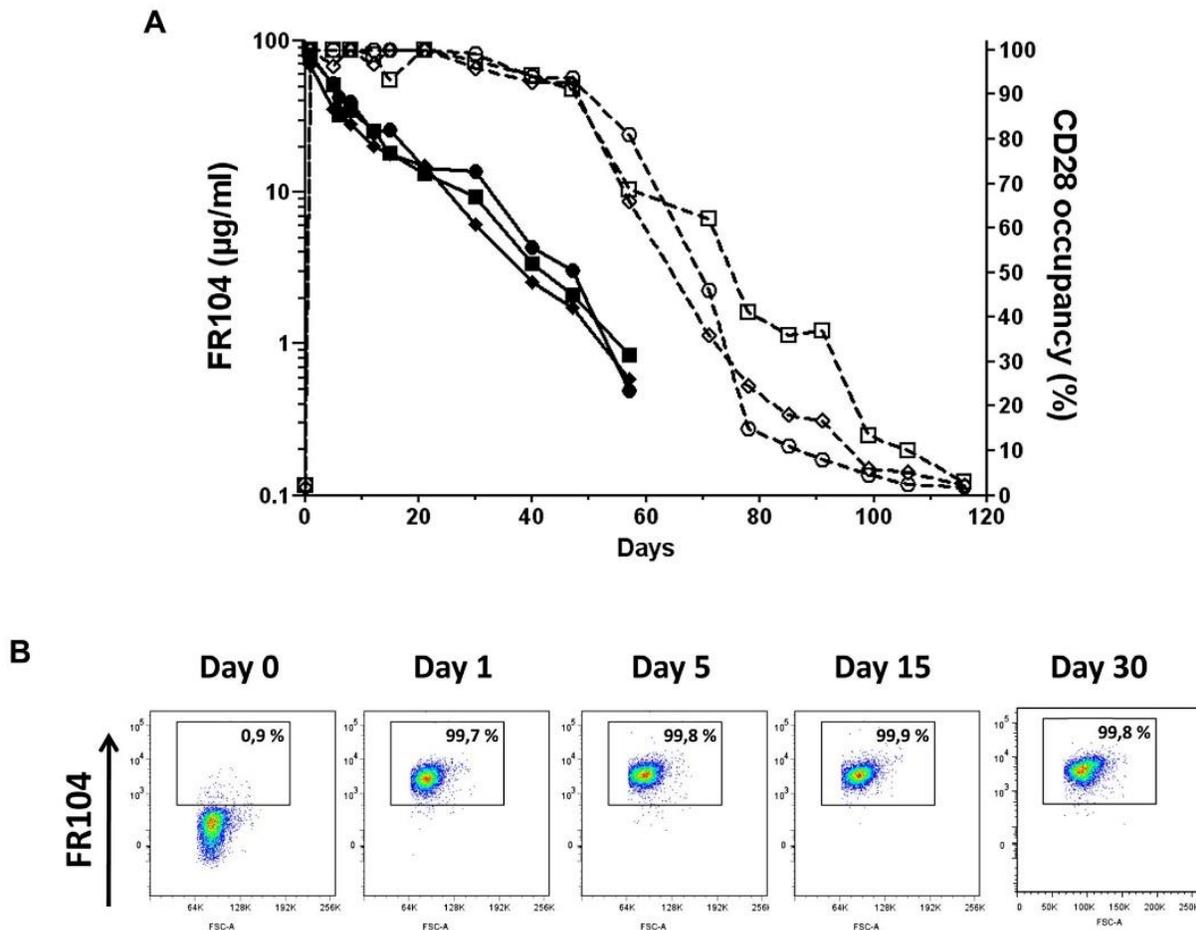


Figure 2: Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of FR104 after intravenous administration in baboons. (A) FR104 serum concentration (left y-axis; black symbols and solid lines) after a single administration at 5 mg/kg in baboons ($n=3$) and CD28 receptor occupancy by FR104 (right y-axis; open symbols and dotted lines) on peripheral blood T lymphocytes measured by flow cytometry. (B) CD28 receptor occupancy by FR104 on one representative baboon's T lymphocytes recovered from inguinal lymph nodes at the indicated time points.

FR104 prevents kidney allograft rejection in association with a steroid-free and CNI-free or -low regimen

From the results of the pharmacokinetic/pharmacodynamic study in naïve baboons, we designed a therapeutic protocol for renal allotransplantation experiments in baboons based on a twice-monthly i.v. administration of FR104 at 5 mg/kg with an end point at 3 months; the goal of the study being to explore control of acute rejection events. In monotherapy, FR104 significantly delayed allograft rejection (mean survival time [MST]: 18.5 vs. 6 days for untreated recipients) but failed to prevent later rejection (Figure 3A). Aiming to identify the strongest therapeutic association allowing minimization of CNI and/or corticosteroids, we performed a number of series where FR104 was associated either with 1/ a corticosteroid induction treatment (1 mg/kg/day for the first 2 weeks) combined with 3 months of MMF (35 mg/kg, twice a day, *per os*); or 2/ 3 months tacrolimus at low doses (0.05 mg/kg/day, *i.m.*, adjusted to maintain trough levels between 5 and 10 ng/mL) without steroids; or 3/ 3 months of rapamycin (1 mg/kg/day, *per os*, adjusted to maintain trough levels between 10 and 25 ng/mL) without steroids.

In association with a short course of steroids and MMF, FR104 significantly delayed allograft rejection (MST: 69.5 vs. 18 days for MMF + steroids induction). However, half the recipients lost their allograft through acute rejection within the 3 months posttransplantation observation period (Figure 3A). In contrast, in association with a CNI-low dose

and steroid-free regimen, FR104 prevented allograft rejection over the 3-month period, whereas subjects treated with low doses of tacrolimus alone lost their graft prematurely (MST: 15 days). Finally, in the third association with rapamycin, FR104 also prevented acute rejection whereas rapamycin alone-treated subjects developed early acute allograft rejection (MST: 16 days). Unfortunately, while end point was achieved with tacrolimus or rapamycin association, when we performed these experiments, we faced a contamination of our facility by a multi-drug resistant ESBL (extended-spectrum beta-lactamases)-producing *Escherichia coli*, requiring a cleanup of the facility and requiring euthanasia of these recipients (Table 1) as well as of other unrelated animals.

FR104 serum concentration and receptor occupancy were not modified by the association with any particular drug and remained similar in each group (Figure 3B). Similarly, trough levels of tacrolimus and rapamycin were not modified by the association of FR104, again remaining similar in each group (Figure 3C).

FR104 prevents DSA development

We next looked for the presence of DSA in the sera of all recipients at various time points. All the subjects treated with low doses of tacrolimus only, 2/3 subjects treated with rapamycin only, and 2/4 subjects treated with MMF and corticosteroid induction developed IgM and/or IgG DSA (Figure 4A and 4B). In contrast, FR104 alone or in

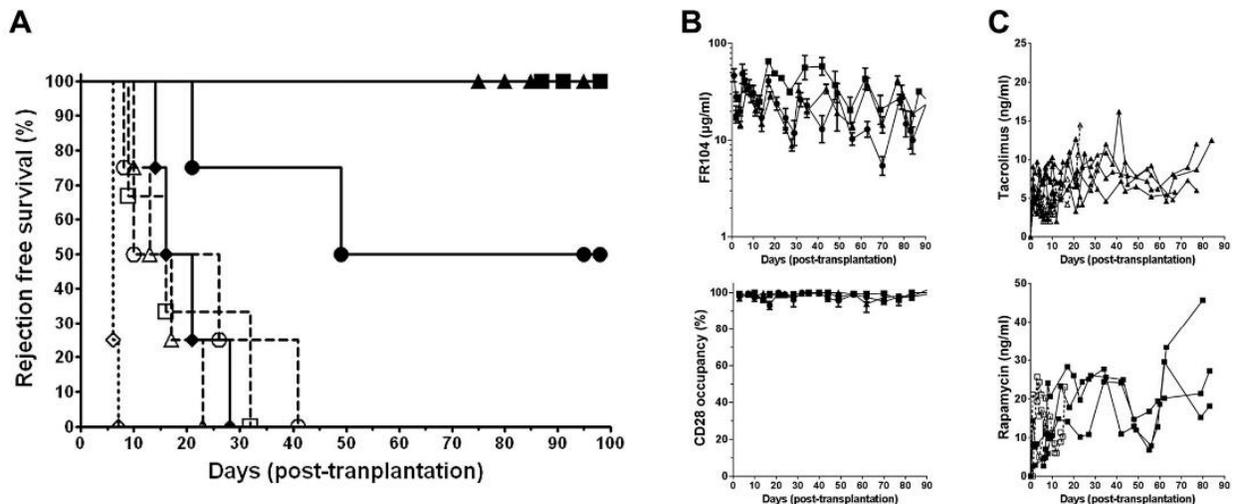


Figure 3: Selective blockade of CD28 by FR104 prevents kidney allograft rejection. (A) Kidney allograft survival for baboons without therapy (open diamond, $n=4$) or treated with FR104 monotherapy (black diamond, $n=4$), 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (open round, $n=4$), FR104 and 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (black round, $n=4$), low doses of tacrolimus (open triangle, $n=4$), FR104 and low doses of tacrolimus (black triangle, $n=4$), rapamycin (open square, $n=3$) or FR104 and rapamycin (black square, $n=3$). (B) FR104 serum concentration (top panel) and CD28 receptor occupancy on peripheral blood T lymphocytes (bottom panel) after transplantation on animals treated with FR104 in association. Data are mean \pm SEM, same symbols as in (A). (C) Tacrolimus (top panel) and rapamycin (bottom panel) trough levels after transplantation of animals treated in monotherapy (open symbols) or in association with FR104 (black symbols). Each line represents one animal.

Table 1: Survivals and outcomes of individual animals

	Survival (days)	Outcome	Statistics
Untreated	6	Acute rejection	
	6	Acute rejection	
	6	Acute rejection	
	7	Acute rejection	
FR104	14	Acute rejection	p < 0.01 (vs Untreated)
	16	Acute rejection	
	21	Acute rejection	
	28	Acute rejection	
MMF/Cs	8	Acute rejection	p < 0.01 (vs Untreated)
	10	Acute rejection	
	26	Acute rejection	
	41	Acute rejection	
MMF/Cs + FR104	21	Acute rejection	p = 0.05 (vs MMF/Cs)
	49	Acute rejection	
	158	Acute rejection after treatment withdrawal	p < 0.05 (vs FR104)
	291	Hypoglycemic coma	
Tac LD	10	Acute rejection	p < 0.01 (vs Untreated)
	13	Acute rejection	
	17	Acute rejection	
	23	Acute rejection	
Tac LD + FR104	77	ESBL-producing <i>E. Coli</i> +*	p < 0.01 (vs Tac LD)
	77	<i>Proteus mirabilis</i> +*	
	84	ESBL-producing <i>E. Coli</i> +*	p < 0.01 (vs FR104)
	112	Acute rejection after treatment withdrawal	
Rapa	9	Acute rejection	p < 0.05 (vs Untreated)
	16	Acute rejection	
	32	Acute rejection	
Rapa + FR104	84	Unexplained death - no rejection	p < 0.05 (vs Tac LD)
	91	ESBL-producing <i>E. Coli</i> +*	
	123	Acute rejection after treatment withdrawal	p < 0.05 (vs FR104)

Cs, corticosteroids; ESBL, extended-spectrum beta-lactamases; MMF, mycophenolate mofetil; Tac, tacrolimus low doses; Rapa, rapamycin.

*Because of a contamination of the facility by multi-drug resistant germs (even in naïve baboons), recipients presenting clinical signs and microbiological confirmation of bacterial urinary track contamination were sacrificed.

association with low doses of tacrolimus or MMF/steroid, prevented DSA development in all recipients. With the association of FR104 with rapamycin, we detected early significant levels of IgG DSA in the sera of one recipient at different time points without the development of any clinical signs of rejection.

In order to evaluate the potency of FR104 alone in preventing DSA development, we conducted experiments following a previously described immunization protocol to reproducibly induce cytotoxic DSA (against donor MHC class I) and acute humoral rejection of a kidney allograft coming from the original stimulating donor (35,37,38). For that purpose, we allosensitized naïve baboons with two intradermal injections of 20×10^6 allogeneic PBMC each, followed by a second challenge injection 2 weeks later. Whereas, 8/8 untreated controls developed IgM and IgG DSA within 1 month, 3/3 baboons treated once with FR104 did not develop any DSA, even after complete elimination of the drug (Figure 4C and 4D).

Assessment of Tregs

Recipient peripheral blood leukocytes were "phenotyped" at different posttransplant time points. We did not observe any significant difference regarding the frequencies or absolute number of the major lymphocytes populations. However, in recipients treated with FR104 alone or in association, we observed that the number of CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Foxp3⁺ Tregs seemed to increase in the posttransplant period (Figure 5), although the significance of this observation can be questioned with such small groups and inter-individual variability. Furthermore, whereas the majority of peripheral blood Tregs (>90%) expressed the Helios marker before transplantation, we observed an accumulation of Helios-negative Tregs, both in frequency and number, in FR104-treated recipients, suggesting the induction of Tregs from naïve CD4 T-lymphocytes (Figure 5). This was also observed for the frequency of Helios-negative Tregs in the rapamycin monotherapy group, but the number of these cells remained low compared with the association rapamycin with FR104.

We also analyzed cell infiltrates in protocol kidney biopsies at 1 month or earlier in the case of rejection. We did not observe significant differences in terms of macrophage, B-lymphocyte or major T-lymphocyte populations in the graft of all groups (data not shown). Stable recipient allografts were also characterized by mild infiltrates at 1 month. Unfortunately, analyses at later time points were compromised by the cleanup of our facility. In order to better qualify T-lymphocytes infiltrates at 1 month, but also quantify the frequency of cells having a Treg compatible phenotype, we performed a triple immunofluorescence staining with antibodies to CD3, Foxp3 and either CTLA-4 or Helios. We first observed that frequencies of Foxp3⁺ T-lymphocytes, CTLA-4⁺ T-lymphocytes and Foxp3⁺ CTLA-4⁺ T-lymphocytes at rejection were significantly higher in recipients treated with FR104 only compared to controls (Figures 6). This was also true for Foxp3⁺ Helios⁻ T-lymphocytes. At 1 month posttransplantation, whereas the difference between bitherapy groups and monotherapy groups at rejection was not obvious through immunohistology quantification (Figure 6A), mRNA transcript

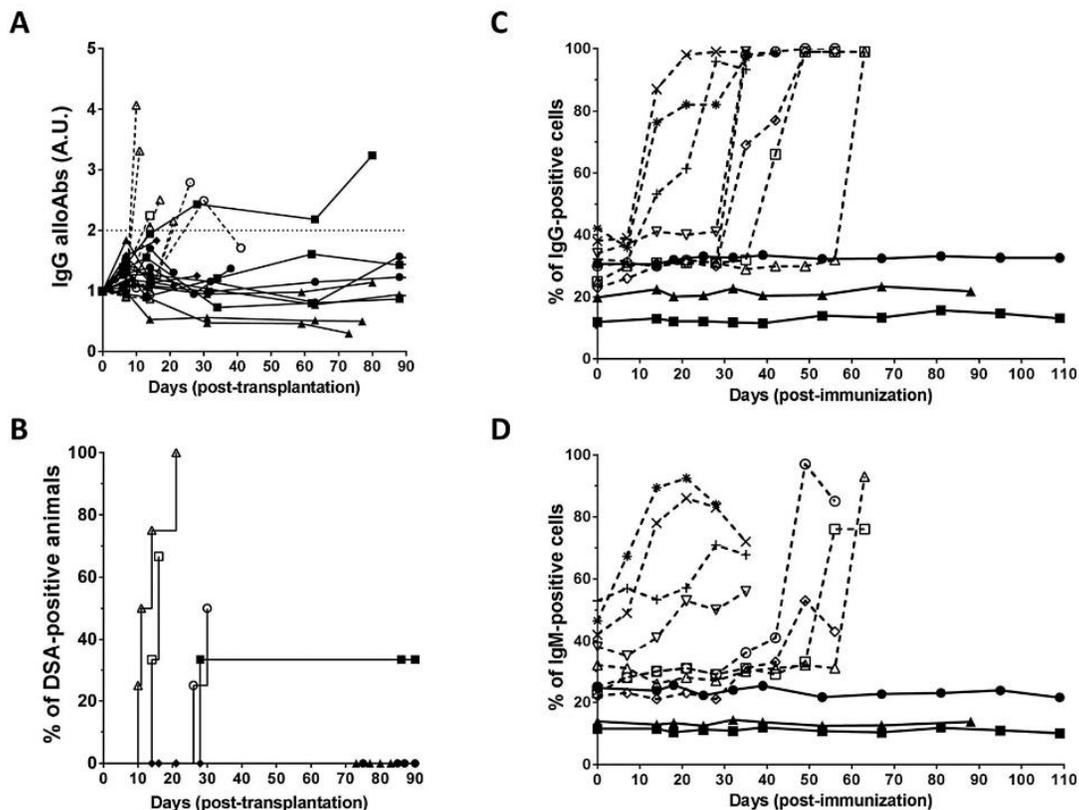


Figure 4: Selective blockade of CD28 by FR104 prevents alloantibody development. (A) Individual IgG donor-specific alloantibody (DSA) detection (each line represents one animal. Threshold of positivity: horizontal dotted lines at "2 A.U.") and (B) percentage of animal developing IgG and/or IgM DSA per group (bottom panel) as detected by flow cytometry after transplantation for baboons without therapy (open diamond) or treated with FR104 monotherapy (black diamond), 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (open round), FR104 and 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (black round), FR104 and low doses of tacrolimus (open triangle), rapamycin (open square) or FR104 and rapamycin (black square). (C) IgG and (D) IgM DSA detection by flow cytometry after allosensitization in nontransplanted untreated (dotted lines, historical controls) and FR104-treated (solid lines) baboons. Each line represents one animal.

quantification revealed an increased expression of genes compatible with a Treg accumulation, such as Foxp3, Helios, PD-1 and TGF- β , in FR104-treated recipients as compared to non-FR104 treated animals (Figure 6E).

As a result of the possible discrepancy highlighted in immunohistology and transcript analyses (Figure 7A), which could be explained by a different level of Foxp3 expression in infiltrating Tregs and associated with their functional and activated status and/or the induction of Tregs (39–42), we developed a quantitative PCR for baboon DNA TSDR in order to analyze the methylation versus demethylation within the Foxp3 locus. We found an absence of correlation between FoxP3 mRNA expression and TSDR demethylation (Figure 7B) but a fair correlation between FoxP3+ T cells assessed by immunohistology and TSDR demethylation (Figure 7C). However, TSDR analysis did not highlight significant difference between experimental groups (Figure 7D).

Discussion

The superiority of selective blockade of CD28 without perturbation of CTLA-4 and PD-L1 pathways over B7-blockade approaches has been recently demonstrated both *in vivo* in rodent transplant models and *in vitro* on human Tregs (4,15,43). We previously showed with a short half-life single-chain Fv anti-CD28 antibody that selective blockade of CD28 associated with optimal doses of CNIs inhibited acute and chronic rejection in NHP kidney and heart allografts models (12). However, selective CD28 antagonists have not yet been evaluated in the clinic due to the difficulty of assessing the innocuity of antagonist anti-CD28 mAbs, in relationship with the deleterious effects of superagonists anti-CD28 mAbs in humans (44). We previously showed that monovalency of the antagonist antibody is mandatory to avoid any agonist properties (14,16,34), complicating the development of such antagonists with clinically appropriate pharmacokinetic/

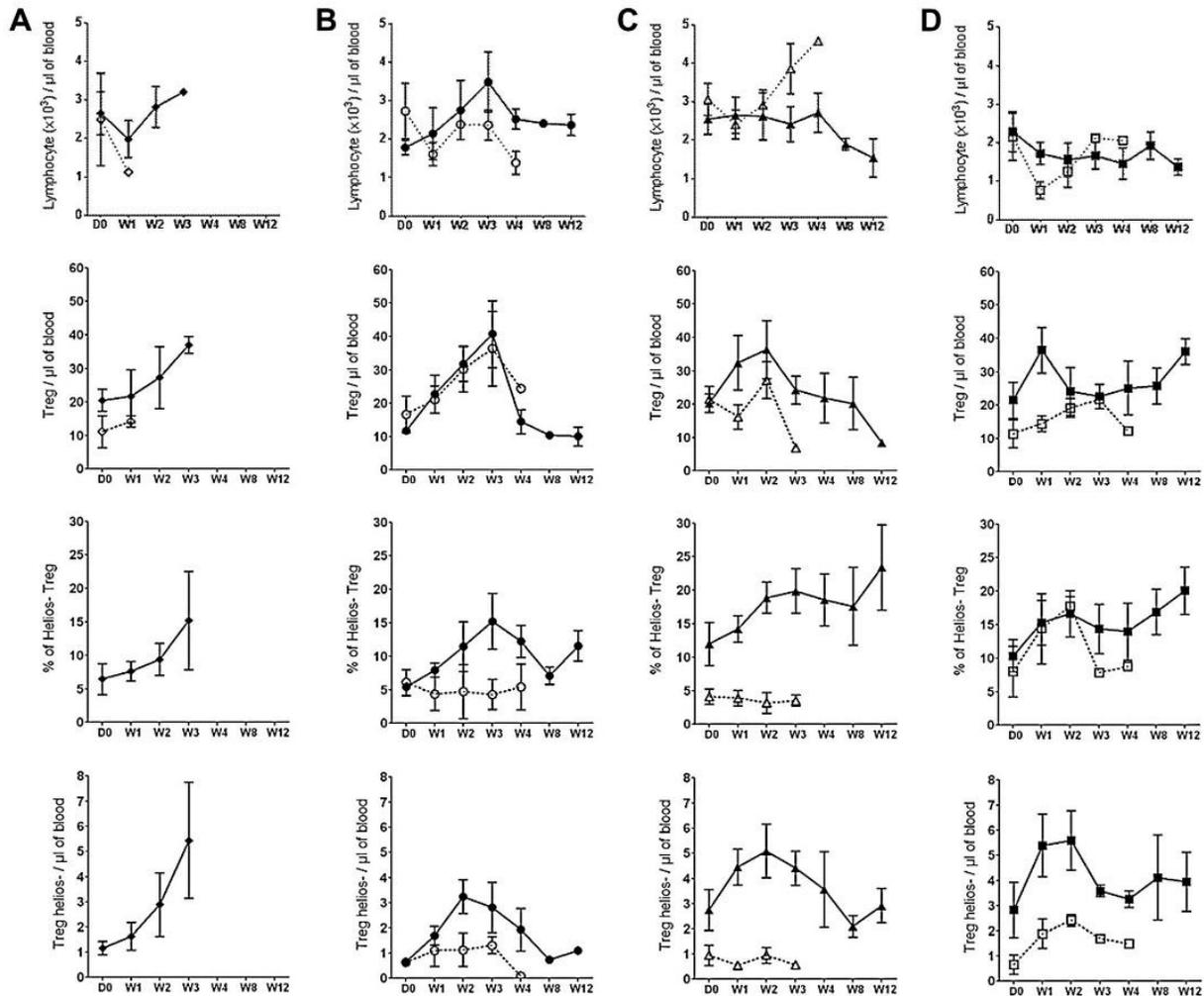


Figure 5: Peripheral blood regulatory T cells (Tregs) after kidney allotransplantation. Peripheral blood numbers of total lymphocytes, CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low} Foxp3⁺ (Tregs) count, Helios⁺ cell frequency among Tregs and Helios⁺ Tregs count after transplantation for baboons (A) without therapy (open diamond, n=4) or treated with FR104 monotherapy (black diamond, n=4), (B) 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (open round, n=4) or FR104 and 2 weeks of corticosteroids + chronic mycophenolate mofetil (black round, n=4), (C) low doses of tacrolimus (open triangle, n=4) or FR104 and low doses of tacrolimus (black triangle, n=4) and (D) rapamycin (open square, n=3) or FR104 and rapamycin (black square, n=3).

pharmacodynamic profiles. Therefore, we developed FR104, a novel, specific humanized anti-CD28 Fab' antibody fragment that is pegylated to prolong its half-life. FR104 was shown devoid of agonist properties, *in vitro*, *trans vivo* in humanized mice (13) and *in vivo* in baboons, which constitute a relevant species for the assessment of CD28 mAb immunotoxicity since they express CD28 on CD4⁺ effector memory T lymphocytes similarly to humans and in contrast to macaques (45). In the current study we evaluated the immunoregulatory effect and potency of FR104 in renal allotransplantation in NHP in order to identify an optimal therapeutic association allowing CNI (and steroid) minimization to limit their toxic effect.

We first evaluated the pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of FR104 after a single intravenous administration to baboons. The elimination half-life was superior to 1 week, and blood and lymph node receptor occupancy were superior to at least 1 month. Since secondary half-lives are known to be higher in man than in NHP, these data indicate that our pegylated Fab' fragment could be administered on a monthly basis or less in humans. As expected, FR104 alone delayed acute kidney rejection but did not induce long-term allograft survival in this full-mismatch NHP allograft model. However, we noticed that FR104 monotherapy-induced survival was very similar to the allograft survival of subjects treated

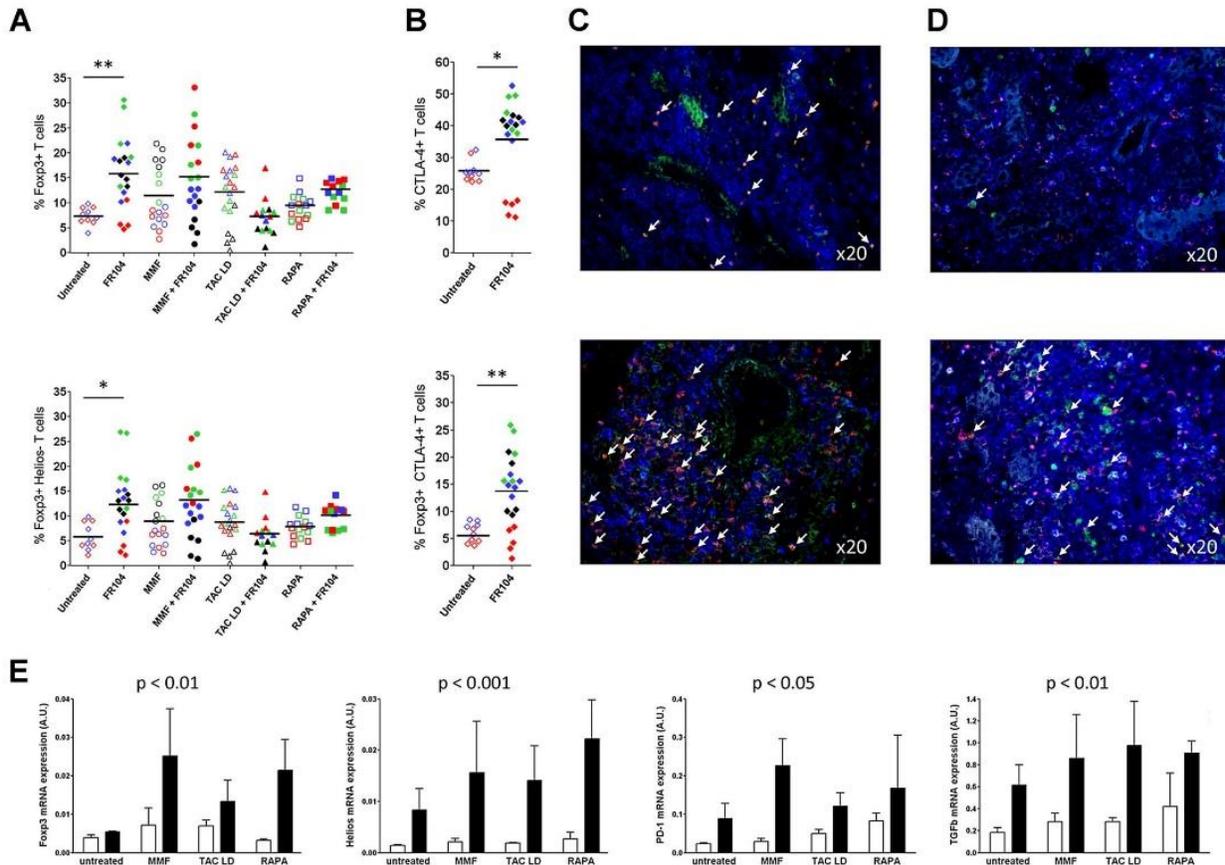


Figure 6: Kidney allograft infiltrating regulatory T cells. Frequency evaluation of graft infiltration, at 1 month or earlier in case of rejection, by (A) Foxp3⁺ (top panel) or Foxp3⁺Helios⁻ (bottom panel) T lymphocytes, and (B) CTLA-4⁺ (top panel) or Foxp3⁺CTLA-4⁺ (bottom panel) T lymphocytes. Data from individual animals are represented with a specific color and individual data points represent several measures performed on at least two different tissue sections of the same biopsy and analyzed by two different investigators (each dot represents the mean of the two investigators). Horizontal bars indicate the mean for the experimental group. (C) Representative immunostaining of a kidney graft biopsy from untreated (top panel) and FR104 monotherapy (bottom panel) recipients. Blue: CD3, red: Foxp3 and green: Helios. Arrows show triple-positive cells. (D) Same as in (C) with blue: CD3, red: CTLA-4 and green: Foxp3. (E) Quantitative real-time polymerase chain reaction measurement of mRNA expression, at 1 month or earlier in case of rejection, for animals treated with the indicated treatment without FR104 (white bars) or in association with FR104 (black bars). Data are mean ± SEM.

either by a 2-week induction therapy of corticosteroids and daily administration of MMF, or chronic exposure to clinical doses of rapamycin or low doses of tacrolimus. FR104 immunotherapy associated with CNI-free (rapamycin) or CNI-low (tacrolimus) regimens, without any corticosteroids exposure, induced long-term allograft survival and prevented acute rejection in all recipients. However, the association with MMF and steroids turned out suboptimal, since half the recipients developed early acute rejection episodes. This is similar to the approved way of using belatacept (excepted that patients remained on steroid and received anti-CD25 induction), for which all clinical trials have shown a higher rate of rejection than the control groups with CNI.

Based on this study, the best immunosuppressive association seemed to be tacrolimus at low doses, well known to

be less nephrotoxic (46,47), since none of these recipients developed detectable DSA, as opposed to one case with rapamycin. In fact, the prevention of DSA development has now emerged as a critical issue, since its presence is associated not only with humoral rejection and early graft loss, but also with reduced long-term graft survival (48,49). Therefore, in order to identify the contribution of immunosuppression in this FR104-mediated prevention of DSA development, we treated naïve baboons with a single injection of FR104 before undergoing a procedure of allosensitization we have already described as inducing reproducibly cytotoxic anti-MHC class I DSA and acute humoral rejection in large animals (35,37,38). The data confirmed that FR104 alone totally prevented alloimmunization since allostimulated baboons did not develop DSA even after the drug elimination. These results tie in with the critical role of CD28 in the development of follicular helper

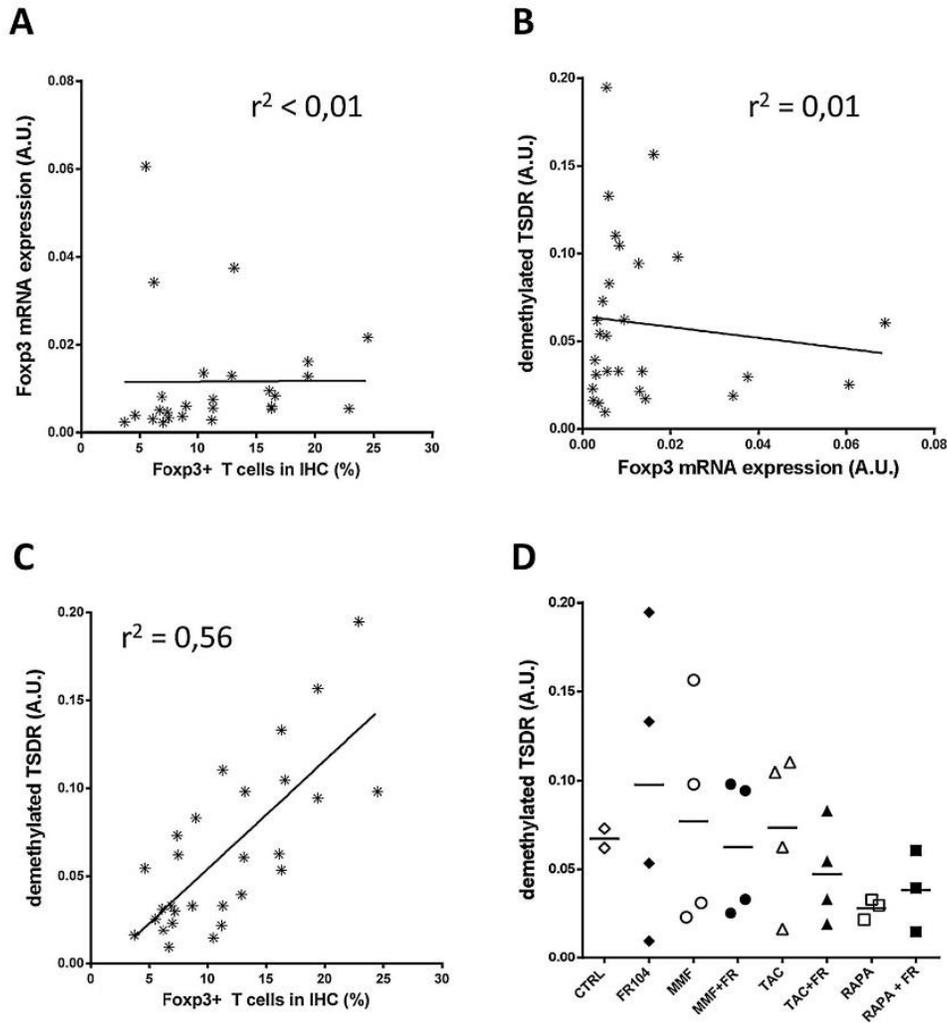


Figure 7: Allograft Treg-specific demethylated region (TSDR) evaluation. Correlation between (A) Fxp3 mRNA expression and Fxp3+ T cells quantification by immunohistochemistry, or (B) demethylated TSDR and Fxp3 mRNA expression, or (C) demethylated TSDR expression and Fxp3+ T cell quantification by immunohistochemistry, in kidney allograft biopsies, at 1 month or earlier in case of rejection, of all recipients. Each symbol represents analysis from one animal. (D) TSDR analysis by experimental groups. Horizontal bars indicate the mean for the experimental group.

T cells (Tfh) (50) and with the observation that costimulatory blockade alters germinal center responses (51) while CTLA-4-specific antibodies potentiate Tfh-dependent B cell activation and antibody responses in metastatic prostate cancer or melanoma patients (52,53).

Finally, we observed that FR104 treatment did not reduce Treg counts after transplantation. Instead, FR104 seems to favor Treg induction and/or accumulation since we observed in the blood and in the graft an accumulation of Helios-negative cells expressing Fxp3 and CTLA-4, a phenotype associated with the suppressive function of Tregs (54) and peripheral induced Tregs (55,56). This accumulation was probably due to the combined effect

of the antibody and the allograft, but not the drug alone, since we have previously shown that CD28 antagonist antibodies administered to nongrafted NHP do not alter the frequency of Tregs (12). Although not demonstrated here, we could hypothesize that under selective CD28 blockade (sparing CTLA-4-CD80 interactions), allogeneic T cells might differentiate into Tregs or, alternatively, that pre-existing allogeneic Tregs get activated and expand. In fact, while the survival of natural Tregs has been shown to be CD28-dependent (57), a recent subset expressing ICOS has been described and appears independent of CD28 for expansion (58). Furthermore, the generation of adaptive Tregs does occur in suboptimal costimulation situations (59), and in situations where CD28 signals are

absent (60). Conversely, the direct stimulation of CD28 has been shown to be detrimental for the induction of Tregs (61,62) while selective CTLA-4 engagement could induce adaptive Tregs with alloantigen specificity (63). Finally, in contrast to clinical immunosuppression achieved by a CD80/86 antagonist, which is not associated with induction of Tregs and does not rely on immune regulation (64,65), we also recently showed that antagonist antibodies against CD28, CTLA-4 and PD-L1 differentially regulates functions of alloreactive human Teff and Treg (43). In particular, we found that selective CD28 blockade reinforces Treg immune synapse formation with APC and Treg activation, while preventing Teff/APC immune synapse and Teff activation, in both case involving CTLA-4 and PD-L1 dependent mechanisms.

In conclusion, we have shown that FR104 immunotherapy allows CNJ and steroid minimization or avoidance, while efficiently preventing allograft rejection and DSA development in a full-mismatch NHP kidney allograft model.

Acknowledgments

The authors thank the SFR MicroPICell imaging platform and the SFR Integrative Genomic platform (Nantes, France) for technical assistance. The authors received funding from the Fondation de la Recherche Médicale (FRM grant #DIM20081013832; Paris, France), the Agence Nationale de la Recherche (ANR grant #09-BIOT-013-02; Paris, France) and the European project TRIAD (EU-FP7-Health program EC-GA N°281493; www.TRIAD-CD28.eu). This work was also supported by the Progreffe and Centaure foundations (France) and the IHU-Cesti project, supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.

Disclosure

The authors of this manuscript have conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*. N. P., N. D., C. M. and B. V. are shareholders and employees in Effimune, a company developing CD28 antagonists.

Author Contributions

N. P. designed, organized and performed *in vitro* and *in vivo* experiments, analyzed and interpreted the data and prepared the manuscript. N. D. performed *in vitro* and *ex vivo* experiments, analyzed and interpreted the data. S. L.-B. performed flow cytometry analysis. C. M. performed ELISA dosage. S. V. and V. C. developed and performed TSDR analysis. F. C. performed mRNA analysis. J. B. and X. T. performed renal allograft surgery. S. P. and V.N.-D. performed immunohistological analyses. J. H. and D. M. assisted with kidney transplantation in baboons. K. R. performed histological analyses of kidney biopsies. B. V. and G. B. funded the research, designed and supervised

experiments, analyzed and interpreted the data and edited the manuscript.

References

- Berber I, Aydin C, Yigit B, et al. Blood pressure and graft outcome in renal transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 997–998.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O’Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003; 349: 2326–2333.
- Porrini E, Delgado P, Bigo C, et al. Impact of metabolic syndrome on graft function and survival after cadaveric renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 134–142.
- Poirier N, Blanco G, Vanhove B. A more selective costimulatory blockade of the CD28-B7 pathway. *Transpl Int* 2011; 24: 2–11.
- Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003; 349: 1907–1915.
- Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* 2005; 353: 770–781.
- Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 535–546.
- Vincenti F, Larsen CP, Alberu J, et al. Three-year outcomes from BENEFIT, a randomized, active-controlled, parallel-group study in adult kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2012; 12: 210–217.
- Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant* 2010; 10: 547–557.
- Vanrenterghem Y, Bresnahan B, Campistol J, et al. Belatacept-based regimens are associated with improved cardiovascular and metabolic risk factors compared with cyclosporine in kidney transplant recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT studies). *Transplantation* 2011; 91: 976–983.
- Poirier N, Blanco G, Vanhove B. Alternatives to calcineurin inhibition in renal transplantation: Belatacept, the first co-stimulation blocker. *Immunotherapy* 2010; 2: 625–636.
- Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T-cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* 2010; 2: 17ra10.
- Poirier N, Mary C, Dilek N, et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab’ antibody. *Am J Transplant* 2012; 12: 2630–2640.
- Poirier N, Blanco G, Vanhove B. CD28-specific immunomodulating antibodies: What can be learned from experimental models? *Am J Transplant* 2012; 12: 1682–1690.
- Zhang T, Fresnay S, Welty E, et al. Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner. *Am J Transplant* 2011; 11: 1599–1609.
- 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.
- 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.

18. Li J, Semple K, Suh W-K, et al. Roles of CD28, CTLA4, and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 962–969.
19. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27: 111–122.
20. Butte MJ, Peña-Cruz V, Kim M-J, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol* 2008; 45: 3567–3572.
21. Yao S, Zhu Y, Zhu G, et al. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 2011; 34: 729–740.
22. 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.
23. Raychaudhuri SP, Kundu-Raychaudhuri S, Tamura K, et al. FR255734, a humanized, Fc-Silent, Anti-CD28 antibody, improves psoriasis in the SCID mouse-psoriasis xenograft model. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1969–1976.
24. Yu X-Z, 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.
25. Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 2000; 164: 4564–4568.
26. 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: 519–527.
27. 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.
28. Guillonnet C, Séveno C, Dugast A-S, et al. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J Immunol* 2007; 179: 8164–8171.
29. Urakami H, Ostanin DV, Hünig T, Grisham MB. Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 3244–3246.
30. 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.
31. Haspot F, Séveno C, Dugast A-S, 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: 2339–2348.
32. Dugast A-S, Haudebourg T, Coulon F, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol* 2008; 180: 7898–7906.
33. Dilek N, Poirier N, Usal C, Martinet B, Blancho G, Vanhove B. Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol* 2012; 188: 4209–4216.
34. Mary C, Coulon F, Poirier N, et al. Antagonist properties of monoclonal antibodies targeting human CD28: Role of valency and the heavy-chain constant domain. *MAbs* 2013; 5: 47–55.
35. Tillou X, Poirier N, Le Bas-Bernardet S, et al. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. *Kidney Int* 2010; 78: 152–159.
36. Wieczorek G, Asemissen A, Model F, et al. Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* 2009; 69: 599–608.
37. Poirier N, Maillet F, Barussaud M-L, et al. Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs. *J Surg Res* 2007; 139: 261–268.
38. Poirier N, Blancho G. Recombinant human c1-inhibitor inhibits cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies. *Transplant Proc* 2008; 40: 581–583.
39. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30: 899–911.
40. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: More of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30: 626–635.
41. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *J Immunol* 2009; 182: 148–153.
42. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol* 2013; 190: 2001–2008.
43. Dilek N, Poirier N, Hulin P, et al. Targeting CD28, CTLA-4, PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses, function of human regulatory, conventional T-cells. *PLoS ONE* 2013; 8: e83139.
44. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006; 355: 1018–1028.
45. Poirier N, Mary C, Le Bas-Bernardet S, et al. Advantages of *Papio anubis* for preclinical testing of immunotoxicity of candidate therapeutic antagonist antibodies targeting CD28. *MAbs* 2014; 6: 697–707.
46. Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, et al. Calcineurin inhibitor minimization in the symphony study: Observational results 3 years after transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9: 1876–1885.
47. Hernández D, Miquel R, Porrini E, et al. Randomized controlled study comparing reduced calcineurin inhibitors exposure versus standard cyclosporine-based immunosuppression. *Transplantation* 2007; 84: 706–714.
48. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, et al. Evidence for antibody-mediated injury as a major determinant of late kidney allograft failure. *Transplantation* 2010; 90: 68–74.
49. Gloor J, Cosio F, Lager DJ, Stegall MD. The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: Implications for treatment. *Am J Transplant* 2008; 8: 1367–1373.
50. Linterman MA, Vinuesa CG. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 183–196.
51. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2014; 14: 59–69.
52. Fong L, Kwek SS, O'Brien S, et al. Potentiating endogenous antitumor immunity to prostate cancer through combination immunotherapy with CTLA4 blockade and GM-CSF. *Cancer Res* 2009; 69: 609–615.
53. Yuan J, Gnjjatic S, Li H, et al. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 20410–20415.

54. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271–275.
55. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184: 3433–3441.
56. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and differences. *Immunol Rev* 2014; 259: 88–102.
57. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+ CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431–440.
58. Chen Y, Shen S, Gorentla BK, Gao J, Zhong X-P. Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol* 2012; 188: 1698–1707.
59. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219–1227.
60. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Mégret J, Bach J-F, Chatenoud L. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* 2003; 9: 1202–1208.
61. Fu S, Zhang N, Yopp AC, et al. TGF-beta induces Foxp3+ T-regulatory cells from CD4+ CD25- precursors. *Am J Transplant* 2004; 4: 1614–1627.
62. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007; 204: 1765–1774.
63. Li R, Perez N, Karumuthil-Melethil S, Prabhakar BS, Holterman MJ, Vasu C. Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4+ CD25+ Foxp3+ and CD4+ CD25- TGF-beta 1+ adaptive regulatory T cells. *J Immunol* 2007; 179: 5191–5203.
64. Chavez H, Beaudreuil S, Abbed K, et al. Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade. *Transpl Immunol* 2007; 17: 243–248.
65. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2086–2096.

4.4 DISCUSSION DES RESULTATS

Comme attendu, la demi-vie d'élimination du FR104 chez le babouin (8,4 jours +/- 0.3) est compatible avec son utilisation bimensuelle voir au-delà chez l'homme où les demi-vies d'élimination sont habituellement supérieures. En effet d'un point de vue pharmacodynamique, une occupation complète des molécules de CD28 était observée jusqu'à 6 semaines après l'injection du FR104.

Comme suspecté, du fait de l'expérience du sc28AT, en monothérapie le FR104 bien que supérieur à ce dernier ne faisait que retarder la survenue du rejet avec une médiane de survie sans rejet de 18,5 jours.

En association avec la rapamycine et le tacrolimus à faible dose aucun rejet n'était constaté pendant les 90 jours de traitement, malheureusement l'évaluation au-delà a été rendu difficile du fait de la forte incidence de pyélonéphrite favorisé par la présence de sonde double J. Ces résultats sont intéressants quand on les compare, en particulier pour la rapamycine, avec ceux du Belatacept en association avec le sirolimus, qui étaient également très bon, alors même que dans ce cas les receveurs recevait un traitement d'induction (par SAL (125) ou alemtuzumab (126)). En association avec le cellcept 50% de rejet aigu ont été constaté. Un résultat similaire avait été obtenu en pré-clinique avec le Belatacept (112). En clinique avec une induction avec du SAL et sans corticoïdes au long cours, l'association MMF/Belatacept avait aussi montré des résultats moins bon que celle entre le sirolimus et le Belatacept (125), confirmant les données « préoccupantes » de BENEFIT malgré une induction par anti-IL2R et des corticoïdes au long cours (115).

Alors qu'en monothérapie tous les animaux sous tacrolimus, 2/3 de ceux sous rapamycine et 2/4 de ceux sous MMF développèrent des DSA, sous FR104 que ce soit en monothérapie ou en association aucun DSA n'a été détecté en dehors d'un animal sous FR104 / rapamycine mais sans rejet associé. Pour se prémunir du rejet cellulaire qui survient en monothérapie sous FR104 interrompant de fait le suivi des DSA, une allo-immunisation au moyen de cellules mononuclées injectées en sous-cutané, était réalisée de façon concomitante d'une unique injection de FR104. Dans tous les cas (3/3), elle permettait de prévenir l'apparition de DSA jusqu'à 100 jours. Ces résultats sont concordants avec ceux du Belatacept

que ce soit en préclinique, ou dans les essais cliniques, où l'incidence d'apparition de DSA est très faible et inférieur au groupe contrôle CNI/MMF. Cela est probablement expliqué par la nécessité de l'interaction CD28 / CD80/86 lors de la coopération Tfh / cellules B qui inaugure la réponse humorale primaire. Cela a par ailleurs été étudié dans un modèle particulier de rejet humoral chez le macaque consécutif à une déplétion initiale des CD3 et malgré de l'alefacept et du tacrolimus en entretien (121), dans lequel l'ajout de Belatacept prévient l'apparition des DSA et donc le rejet ainsi que la formation de CG au sein des ganglions drainant.

L'analyse des lymphocytes T régulateurs, particulièrement au niveau quantitatifs diffèrent des données observées avec les sc28AT. Dans le sang périphérique, bien qu'une petite augmentation du nombre de Treg (CD4+CD25^{high}CD127^{low}Foxp3⁺) soit observée initialement cela ne se confirme pas à distance, et la différence entre le groupe FR104/tacrolimus et tacrolimus monothérapie n'est pas significative. Dans tous les groupes une plus grande quantité de Treg Helios négative est observée avec l'association de FR104 en comparaison des monothérapies. Cela peut signifier que l'induction de Treg est favorisée avec le FR104, même si comme nous l'avons vu en introduction la spécificité de ce marqueur pour identifier les Treg a pu être remise en question (76).

Au niveau de l'infiltrat, sur les biopsies à 1 mois, nous disposons d'un marqueur supplémentaire, à savoir la méthylation du TSDR, réputée plus spécifique. Ce marqueur est bien corrélé au pourcentage de Foxp3 parmi les cellules T en immunohistochimie mais pas à l'expression des transcrits de Foxp3, probablement du fait d'une plus grande sensibilité de la qPCR et donc d'un manque de spécificité vis-à-vis des cellules T activées exprimant transitoirement Foxp3. Que ce soit avec l'analyse du TSDR ou en immunohistochimie, aucune différence significative n'est observée entre la combinaison avec le FR104 et la monothérapie qu'elle que soit la drogue utilisée, contrairement à ce qui avait été observé avec le sc28AT.

Une explication possible est la différence de pharmacocinétique entre le sc28AT et le FR104. En effet nous avons vu en introduction que la signalisation via CD28 est nécessaire à la survie des nTreg et à l'induction des iTreg, mais pour ces dernières en particulier, un engagement trop important de la voie CD28 est délétère. Il est donc possible qu'avec le sc28AT, du fait de sa courte demi-vie, une interaction à minima de CD28 avec son ligand

favorise l'induction de Treg, alors que le FR104 du fait de sa demi-vie plus longue limite ces signaux.

Néanmoins, la combinaison avec le FR104 ne diminue pas pour autant la quantité de Treg en comparaison des groupes monothérapies. Nous avons vu que chez l'homme certains nTreg ICOS⁺ sont stimulés par ICOS-L (68). Cette interaction qui se substitue certainement en partie aux signaux médiés par CD28, impliqués dans l'homéostasie des Treg, pourrait expliquer que l'utilisation de FR104 n'impacte pas négativement les Treg.

Bien qu'informatrice, les données issues de la comparaison entre monothérapie et combinaison avec le FR104 sont limitées. En effet l'inflammation globale est nécessairement moindre avec une bithérapie ce qui modifie de fait les caractéristiques de la réponse allo-immune. Par ailleurs la dépendance de l'effet du FR104 vis-à-vis de CTLA-4 (son principal avantage à priori) ne peut pas être évaluée. Cela nécessite sa comparaison avec une autre molécule qui bloque la voie CTLA-4 : le Belatacept.

5 PARTIE 2 – ARTICLE 2

5.1 OBJECTIFS ET PRESENTATION DU TRAVAIL

Nous avons vu que le blocage sélectif de CD28 a de nombreux avantages théoriques par rapport à celui de CD80-86, sa supériorité étant démontrée dans un modèle de transplantation chez la souris (195) et dans un modèle de GVHD xéno-génique chez la souris humanisée (196), mais pas à ce jour chez le primate.

Après avoir démontré l'efficacité du FR104 dans la prévention du rejet aigu et la survenue d'allo-anticorps, la seconde partie de cette thèse a donc consisté à comparer directement dans un modèle de transplantation rénale chez le babouin le FR104 et le Belatacept.

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer si le blocage sélectif de CD28 avec le FR104, au-delà de ses atouts théoriques, a un intérêt pratique, quand on le compare directement au Belatacept, et cela en vue de motiver son transfert en clinique, dans l'indication de la prévention du rejet en transplantation rénale.

Pour répondre à cet objectif, nous avons choisi d'associer le FR104 et le Belatacept à du tacrolimus à faible dose pendant 1 mois, suivi d'un arrêt progressif du tacrolimus. Ce protocole avait pour objectif d'éviter deux écueils :

- (1) Le risque de rejet aigu précoce dans les deux groupes en cas de monothérapie, empêchant la mise en évidence d'une différence.
- (2) Le risque de « sur-immunosuppression » en cas de combinaison au long cours, avec pour conséquence une incidence de rejet aigu nulle et donc l'absence de différence, au moins sur un critère de jugement « clinique ».

Le choix du tacrolimus à faible dose s'est imposé car l'association du Belatacept comme du FR104 avec le MMF n'a pas donné de bons résultats. Deux éléments nous ont conduits à écarter les inhibiteurs du mTOR : leur mauvaise tolérance clinique en particulier en post opératoire, et le fait, mentionné dans l'article 1, qu'un animal traité par la combinaison FR104 / rapamycine, s'est immunisé contre son donneur (sans rejet associé néanmoins).

Enfin nous avons décidé de traiter de façon conventionnelle (bolus de stéroïdes suivi d'une décroissance progressive) les rejets prouvés par biopsie. D'une part cela se rapproche de la pratique clinique, d'autre part il nous est apparu intéressant d'évaluer la sensibilité aux stéroïdes des rejets survenant sous blocage de la costimulation.

Le second objectif était d'explorer les différences concernant les caractéristiques de la réponse allo-immune survenant sous blocage sélectif de CD28 (avec le FR104) par rapport à un blocage de CD80/86 (sous Belatacept).

En d'autres termes, d'objectiver des mécanismes de régulation dépendant de CTLA-4 (et dans une moindre mesure de PD-L1) qui ne seraient préservés qu'avec le FR104 et absent avec le Belatacept.

Nous avons vu que les fonctions de CTLA-4 se répartissent en deux catégories :

(1) Des fonctions intrinsèques :

- la régulation de la SI par compétition et par la réversion du STOP signal.
- la modération de l'activation des lymphocytes T aussi bien au cours d'une réponse primaire que d'une secondaire.
- l'induction d'autres molécules de co-inhibition en particulier 2B4.

Le Belatacept en bloquant l'interaction CD28-CD80/86 prévient l'expression de CTLA-4 à la surface des cellules naïves lors d'une réponse primaire. En revanche, nous avons vu que les cellules mémoires / effectrices, peuvent s'activer indépendamment de CD28, comme bien démontré avec les cellules T Tfh (58). Dans ce cas, la préservation des signaux inhibiteurs intrinsèques médiés par CTLA-4, démontrés notamment dans les Tfh (89) et les Th17 (104), pourrait être primordiale, ce que suppose la résistance des Th17 au blocage de la costimulation dans des modèles de rongeur (175) et leur association avec les rejets survenant sous Belatacept (176).

(2) Des fonctions extrinsèques principalement à travers des lymphocytes T régulateurs.

- L'induction de la sécrétion d'IDO par les CPA.
- La stimulation de la sécrétion de cytokines inhibitrices comme TGF β .

- La capture de CD80/86 à la surface des CPA par trans-endocytose.

Le Belatacept en saturant les molécules de CD80/86 sur les CPA, mime en quelque sorte la fonction de capture de CD80/86 du CTLA-4. Mais les autres fonctions extrinsèques du CTLA-4 nécessitent son interaction active avec CD80/86 qui serait préservé avec le FR104 et pas avec le Belatacept.

Le dernier objectif, secondaire, était d'évaluer le FR104 et le Belatacept, en monothérapie, au décours du sevrage complet en tacrolimus.

Anti-CD28 superiority over CTLA4-Ig in preventing renal allograft rejection in primate.

Simon Ville^{1,2}, Nicolas Poirier^{1,3}, Julien Branchereau^{1,2}, Vianney Charpy², Sabrina Pengam^{1,3},
Véronique Daguin¹, Stéphanie Le Bas-Bernardet¹, Flora Coulon¹, Caroline Mary^{1,3}, Jeremy
Hervouet¹, David Minault¹, Steven Nedellec⁴, Karine Renaudin^{1,2}, Bernard Vanhove^{1,3, †} and
Gilles Blancho^{1,2, †*}.

¹ INSERM UMR 1064, Nantes, France; Institut de Transplantation Urologie Néphrologie
(ITUN), Université de Nantes, Nantes F-44000, France

² Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

³ Effimune, Nantes, France

⁴ MicroPiCell Facility, SFR Bonamy, FED 4203, UMS 016, Nantes, France

‡These authors contributed equally to the senior authorship of this study

Running title: Anti-CD28 superiority over CTLA4-Ig

Abstract: 212 words

Main text: 2776 words

*** Correspondence should be addressed to:**

Pr. Gilles Blancho,

INSERM UMR1064

30 bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France

gilles.blancho@univ-nantes.fr

Phone : +33 (0)2 40 08 74 10 / Fax : +33 (0)2 40 08 74 11

Abstract

Belatacept is a biologic which targets CD80-86 and prevents its interaction with CD28 and also with the CTLA-4 checkpoint. Clinical experience in kidney transplantation reveals a high incidence of rejection under Belatacept, especially an intensive regimen, suggesting that blocking CTLA-4 could be deleterious. In this current study, we performed a head-to-head assessment of FR104 (n=5), a selective CD28 pegylated-Fab' antagonist which does not block the CTLA-4 pathway, versus Belatacept (n=5) in kidney allotransplantation in baboons. The biologics were used together with an initial 1 month treatment with tacrolimus at low dose. In cases of acute rejection, the animals received boluses of steroids.

In the Belatacept group (n=5) 4 recipients developed severe acute cellular rejection that proved to be steroid resistant, in contrast to FR104-treated animals, which did not. Treg-Specific-Demethylated-Region (TSDR) methylation status assessment in one month biopsies revealed more regulatory T cells in FR104-treated animals, whereas a transcriptional analysis did not reveal significant differences, except for IL-21, the main cytokine secreted by CD4 T follicular helper (Tfh), stronger in belatacept-treated animals. *In vitro*, FR104 controlled human preexisting Tfh proliferative response better than Belatacept. This was also true for Tfh memory responses to KLH in mice. Our data suggest that CD28 selective blockade is superior to Belatacept, in particular at the Tfh level.

Introduction:

Little progress has been made in the field of kidney transplantation, as regards long term graft survival since the introduction of calcineurin inhibitors (CNI), this is mainly due to chronic allograft dysfunction (CAD). Although CNI nephrotoxicity is part of the problem, recent advances have given evidence that CAD can also be due to a process of chronic antibody-mediated rejection (ABMR). It is therefore critical to develop novel therapeutic strategies which minimize or avoid the use of CNI and are also more effective in controlling humoral response. This has been partially achieved by the use of belatacept (CTLA4-Ig), a CD80-86 antagonist which prevent interaction with CD28, but also the CTLA-4 checkpoint(113). Belatacept gives equivalent graft survival and improved long term graft function compared to CNI. In addition belatacept-treated-recipients exhibit with remarkably little Donor Specific Antibody (DSA)(115). In a preclinical model, it prevent ABMR by inhibiting primary follicular helper T-cell (Tfh) response(121). However, Belatacept is associated with a high incidence of acute rejection, suggesting that blocking CTLA-4 / CD80-86 interactions might prevent the immune checkpoint function of CTLA-4.

FR104 is a humanized pegylated Fab' antibody antagonist of CD28, devoid of agonist activity, generated by our team(196). In synergy with low doses of CNI, it induces prolongation of renal allograft survival in non-human primates (NHP) (193,196). Preserving regulation by CTLA-4 might be the main advantage of antagonizing CD28 as a replacement for CD80-86. Regulation by CTLA-4 is thought to occur both through intrinsic inhibitory signaling and by extrinsic actions, mainly through Treg activities(201,202). In addition, availability of CTLA-4 is required for regulating the TCR-mediated stop signal and the control of immunological synapses(203,204). Thus, selective CD28 blockade has potential advantages over CTLA4-Ig,

but a direct comparison in pre-clinical transplantation model has not previously been performed.

In the current study, we compared FR104 with Belatacept maintenance therapy in a model of renal allograft in primates receiving short-term and suboptimal doses of tacrolimus. In contrast to belatacept-treated animals, which exhibited irreversible steroid-resistant acute rejection, only 40% of FR104-treated animals developed rejection, which was not steroid-resistant, and survived one year with a stable kidney function. In one month kidney protocol biopsies, using assessment of Treg-Specific-Demethylated-Region (TSDR) methylation status, we obtained a stronger Treg signal in FR104-treated animals. Furthermore, a lower expression of IL-21 (the main cytokine secreted by Tfh) in these animals suggest a better preexisting Tfh response control, a feature confirmed *in vitro* in human cells, as well as in a mouse model.

Results

CTLA4-Ig and FR104 block mixed lymphocyte reaction in baboon equally.

FR104 prevented in vitro proliferation of baboon mononuclear cells with an efficacy similar to Belatacept (**Figure 1**). *In vivo* we determined a dosing regimen allowing blood saturating concentrations of FR104 and CTLA4-Ig during transplantation (data not shown). These preliminary data indicated that baboon is a suitable preclinical model for comparing Belatacept and FR104.

CD28 selective blockade in the place of CTLA4-Ig prevents allograft steroid resistant rejection.

We designed a 1-year therapeutic protocol for kidney transplantation in baboons allowing direct comparison of CD28 selective blockade with FR104 and CD80-86 non-selective blockade with Belatacept. In order to reduce early rejection episodes, animals treated chronically with FR104 or Belatacept also received tacrolimus in low doses for one month, followed by tacrolimus discontinuation over two weeks. In case of biopsy-proven acute rejection, the animals received steroid boluses, as in clinical settings.

In the FR104 group (n=5), two animals developed acute rejection, after tacrolimus weaning (day 51, 58). It is worth noting, however, that these rejection episodes could be reversed simply using steroids. Two animals were lost from other causes than rejection: anesthetic complication and infection (septicemia). At one year post transplantation, the three remaining animals under FR104 exhibited a stable kidney function (**Figure 2A**). In the Belatacept group (n=5) four recipients developed acute rejection during or after tacrolimus weaning (day 17, 28, 49, 76) that proved to be steroid resistant. The fifth animal was lost through infection (pyelonephritis).

None of the animals exhibited DSA, assessed by flow cytometry, in either group (**Figure 2B**). In both groups, characterization of rejection by conventional pathology examination revealed T-Cell Mediated Rejection (TCMR), ranging from IA to IB as defined by the Banff classification(205), except for one belatacept recipient which exhibited an additional vascular injury without any C4d staining (grade IIA). Interestingly, on one-month protocol biopsies, all the animals, whatever their treatment, showed a significant interstitial infiltrate (ranging from i2 to i3) composed essentially of CD3+ T cells. Immunohistochemistry staining did not reveal significant differences in terms of B-lymphocyte or major T-lymphocyte populations (CD4+ and CD8+) (data not shown).

Thus belatacept-treated recipients show a higher rate of acute rejection (80% vs 40%) and the rejections are more severe and irreversible (**Figure 2C**). In addition after CNI discontinuation, FR104 as a single therapy allows prevention of acute rejection over at least one year.

More Treg in graft infiltrates of FR104-treated recipients.

To investigate why FR104 and Belatacept show differential rejection profiles, we first explored CTLA-4 extrinsic function through regulatory T cells. One animal in the FR104 group, had undetectable levels of CD25^{high} CD127^{low} CD4⁺ Treg cells in periphery at baseline and therefore was excluded from this analysis. No significant differences in the level of CD25^{high} CD127^{low} CD4⁺ Treg cells in the blood (**Figure 3A and B**) or in Foxp3 expression, assessed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR), in one month protocol biopsies (or earlier in case of rejection) were noted between the two groups of animals ($p=0.055$, **Figure 3C**). However, using TSDR methylation analysis, we obtained a significantly higher signal in

FR104 treated animals ($p = 0.015$, **Figure 3D**). In addition, we found higher TGFbeta gene expression in FR104-treated recipients ($p = 0.03$, **Figure 3C**), possibly related to the CTLA-4 extrinsic function on inhibitory cytokine(80).

No difference in CD28 negative T cells.

We also investigated other T-cell subsets suspected of being involved in Belatacept resistant rejection, in which turning off the CTLA-4 intrinsic inhibitory signaling can be deleterious. We monitored CD28 negative T cells, especially CD8+, usually regarded as high cytotoxic capacity cells. No difference in these particular cells between the two groups was noted in the blood (**Figure 4A and B**) or in perforin gene expression (to assess the cytotoxic function) in one month biopsies (**Figure 4C**).

IL-21 gene expression, but not Th17 genes, higher in CTLA4-Ig one month biopsies compared to FR104.

Beside classical cytotoxic CD8 T cells, Th17 polarized T cells can also be held responsible for belatacept-resistant rejections (175,176). No difference in the expression of ROR γ c, IL-17 and IL-23 in one month biopsies was observed (**Figure 5A**). In contrast IL-21 ($p = 0.016$) and, to a lesser extent IL-10 ($p = 0.07$) transcripts (main Tfh cells cytokines) were higher in CTLA4-Ig recipients compared to FR104 animals (**Figure 5B**). Paired correlation analysis indicates that three groups of genes are positively related to each other: the Th17 group with ROR γ c and IL-23, the Tfh group with Bcl6, IL-21 and IL-10 and finally the Treg group with Foxp3, TGF β

and TSDR. Of note, there was an indication of a negative correlation between the Th17 and Tfh groups and between the latter and the Treg group (**Figure 5C**).

In addition no difference was evidenced in the co-inhibitory receptor 2B4 gene expression, reportedly higher in the case of CD28 selective blockade(197) in rodent, or for other PD1 and BTLA co-inhibitory receptors (**Figure 4D**).

Thus, the relative increase of Tfh related genes in CTLA4-Ig treated animals could support the involvement of alloreactive Tfh in the rejection process observed in our protocol.

Graft infiltrating lymphocytes include some Tfh-like cells.

We investigated Tfh among graft infiltrating lymphocytes in one month biopsies. We performed immunohistochemistry staining using anti-PD-1 antibodies, the main marker employed to identify Tfh (206) associated with anti-IL-21 antibodies. Interestingly, we found many CD4+ T cell co-expressing PD-1 and IL-21, a phenotype compatible with the presence of Tfh-like cells (**Figure 6**).

Since the observed difference in IL-21 gene expression could be explain by a differing regulation of infiltrating Tfh between the two groups, which is impossible to prove in this model, we further investigated Tfh sensitivity to both drugs in an *in vitro* as well as in an *in vivo* model.

CD28 selective blockade is more effective in controlling proliferation of human primed Tfh in vitro.

In order to have access to antigen-primed Tfh (only present in secondary lymphoid organs), we used human pediatric tonsils and sorted CD4⁺ pre-Tfh and Tfh cells expressing CXCR5 and, respectively, intermediate and high levels of ICOS (**Figure 7A**). We then tested their proliferative responses after co-culture with autologous B cells in the presence of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) superantigens and both drugs, as previously described(207). After 8 days, FR104 had decreased proliferation more intensively and significantly than CTLA4-Ig on pre-Tfh and Tfh (n = 10, p = 0.02 and 0.03; **Figure 7B**). Thus, the selective CD28 blockade controlled Tfh responses better *in vitro* and might explain the difference in IL-21 gene expression observed between the two groups.

Secondary Tfh response to KLH in mice, as opposed to primary response, is better inhibited by CD28 selective blockade.

In order to back-up the *in vitro* experiments, we used an *in vivo* experimental model of primary and secondary Tfh response during KLH immunization in mice. Animals were immunized s.c. with KLH and LPS and treated with monovalent fragments of the PV1 antibody (an anti-mouse CD28 antagonist antibody) or CTLA4-Ig (abatacept, since Belatacept does not cross-react with mouse CD80-86). Treatment and immunization were performed on day 0 to study primary responses or one month after a first immunization to study recall responses (**Figure 8A**). Tfh responses were evaluated in popliteal draining lymph nodes where Tfh levels were determined (**Figure 8B**). As expected, a time course performed under control conditions revealed that, in

a memory setting the Tfh response occurred earlier after the second immunization (maximum on day 3 versus on day 10 during primary response) (**Figure 8C**). As expected, treatment with monovalent PV1 and CTLA4-Ig were equally effective at controlling primary Tfh responses (n = 5; **Figure 8D**). In contrast only monovalent PV1 could significantly control the secondary Tfh response (10,7% vs 31.6%, n = 5, p < 0.05) (**Figure 8E**).

Discussion

Our data demonstrate for the first time *in vivo*, in a preclinical model, the superiority of selective CD28 blockade over CD80-86 blockade approaches in preventing allograft rejection, supporting previous data reported in rodent(197). We performed this direct comparison in a sub-optimal protocol of immunosuppression in order to avoid a double pitfall: the risk of severe early acute rejection in case of initial single therapy and the possibility of an absence of rejection in case of over-immunosuppression by blocking signal 1 and 2.

We observed severe irreversible acute rejection in belatacept-treated recipients in contrast to FR104 treated-recipients. These rejections were strictly cell-mediated, and not antibody-mediated, since there was no DSA and complement involvement. This is compatible with previous data showing that costimulation blockade with CTLA4-Ig is efficient at inhibiting primary Tfh and antibody responses(121,208). In addition after CNI discontinuation, FR104 used as a single therapy prevented acute rejection for at least one year.

First, we investigated the CTLA-4 extrinsic function, mainly mediated by regulatory T cells. TSDR methylation status evaluation revealed a stronger Treg signal in FR104-treated animals in contrast to Foxp3 expression. Foxp3, can be transiently upregulated in activated T cells, while TSDR demethylation ensures stable Foxp3 expression (209,210). This lack of specificity could explain the discrepancy observed in our data. An upregulation of Treg in graft infiltrates has also been reported after selective CD28 blockade and kidney transplantation(193,195), whereas CTLA4-Ig has been shown to have a negative effect on different Treg-dependent transplantation models(130,131) and Foxp3 levels in patient biopsies(134). Of note, CTLA4-Ig, by blocking CD80-86, mimics to some extent the CTLA-4 extrinsic function involving the removal of CD80-86 on APC by transendocytosis (87). However, Tregs mediate other CTLA-

4 extrinsic functions, in particular through secretion either of IDO by APC(83) or TGFbeta(80), whose expression was found to be higher in FR104 treated-animals.

One explanation for the occurrence of belatacept resistant rejection could be the cross reactivity of some antigen-experienced T cells, supposed to have lost the CD28 costimulation requirement for their activation, with alloantigen, a phenomenon known as heterologous immunity(150,211). In addition, blocking the CTLA-4 pathway in these cells could be deleterious by turning off the intrinsic inhibitory signaling. Recent advances in understanding the mechanism of action of checkpoint inhibitors demonstrate that blocking CTLA-4 could reactivate preexisting experienced tumor specific T cells(101–103). Increasing evidence suggests that the cells involved in costimulation blockade resistance are mature, highly differentiated, with effector capacities, such as CD28 negative T cells(155,168,170). We did not observe a significant difference in CD28 negative T-cell frequencies. Beyond the maturation stage, both the threshold of CD28 requirement and the intrinsic regulation by CTLA-4 pathway can differ between various T-cell subsets. For example, Th17-polarized T cells have been suspected of being the main culprit for belatacept-resistant rejection, since clinical association has been reported(176) and Th17 cells might be particularly sensitive to regulation by CTLA-4(104,175). We did not observe any difference in levels of Th17 genes. In contrast, expression of IL-21 and IL-10 genes, the main cytokines secreted by Tfh, was higher in CTLA4-Ig recipients. Il-21 and Il-10 can also be produced respectively by Th17 and Treg cells. However, paired correlation analysis supported a positive relationship between IL-21, IL-10 and Bcl6, the Tfh master regulator, and not with Th17 and Treg related genes, suggesting a “Tfh gene signature”.

Antigen-primed Tfh lose the CD28 costimulation requirement for their activation(58) and at this stage, CTLA-4 becomes instrumental in the control of their function in a cell intrinsic manner(89). In addition Tfh-like cells expressing ICOS and PD-1 have been described in graft infiltrate of ABMR and TCMR biopsies(212). Recently, Venner et al, using expression microarrays to characterize the changes most specific to TCMR compared to other diseases including ABMR in human kidney graft biopsies, revealed that IL-21R is among the 30 transcripts most associated with TCMR(213). In this respect, pre-existing Tfh, cross-reacting with alloantigen as a part of heterologous immunity, might not act by helping B cells to mount a humoral response but could take an active part in TCMR through IL-21 secretion itself or other effector mechanisms. This tallies with our preclinical data showing that FR104 and Belatacept are equally efficient at controlling primary Tfh response relating to the development of DSA. In our case, pre-existing Tfh could be differentially regulated between the two groups, explaining the difference in IL-21 gene expression. *In vitro*, co-culture of human experienced Tfh and experimental model of Tfh response to KLH immunization in mice, associated with various modalities of costimulation blockade, supported this assumption. Indeed, while primary Tfh response is equally inhibited by both CD28 selective blockade and CD80-86 blocking strategy, only CD28 blockade reduces Tfh recall response significantly.

In a model of islet transplantation, mIL21R-Fc combined with CTLA4-Ig resulted in transplant tolerance in 100% of the mice versus 55% in a CTLA4-Ig monotherapy group(214). In this model, it was demonstrated that IL-21 acted as an antitolerogenic cytokine by preventing Treg generation and by inhibiting Treg function. Therefore, it is possible that in our study as well, IL-21 blocked Treg function in the belatacept-treated group, resulting in severe acute

rejections. The trend toward a negative correlation between Tfh related genes and Treg related genes supports this hypothesis.

Although in clinical practice rejection occurring under belatacept is most often steroid sensitive, some refractory acute cellular rejection has been described (Trobaugh et al, ATC 2015). In our experimental protocol, the animals did not receive induction therapy, in contrast with clinical practice. Interestingly, clinical manifestations due to Treg dysfunction observed in some autoimmune diseases are known to be insensitive to steroids(215,216). In a recent study, using graft biopsies, Matignon et al(217) performed a retrospective molecular analysis of the T cell immune response of patients with acute TCMR. They demonstrated that IL-21, but not IL-17, ROR γ t or T-bet was significantly higher in the group of patients who did not experience a successful reversal of acute TCMR after anti-rejection therapy, suggesting a potential role for Il-21 in steroid resistance.

Our study demonstrates that in a preclinical model of kidney transplantation in NHP, CD28 selective blockade, in combination with a suboptimal immunosuppression, is superior to blockade of CD80-86 in preventing acute rejection. Indeed, belatacept-treated animals exhibit irreversible rejection episodes in contrast with FR104-treated animals, which did not. These rejections occur in the high risk period and after CNI discontinuation. Thus, a CD28 selective agent could combine the advantages of CTLA4-Ig (absence of nephrotoxicity, optimal control of humoral response), while preventing CTLA4-Ig resistant rejection, suggesting that it could represent the next generation of costimulation blocking agents.

Concise methods

Mixed lymphocyte reactions

PBMC were isolated from whole baboon blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio). Freshly isolated PBMC were incubated with allogeneic irradiated PBMC (10^5 cells/well of each cell type) for 5 days at 37°C, 5% CO₂, in complete medium (RPMI 1640, 5% human or baboon pooled serum, 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 5mM HEPES; all from Sigma–Aldrich). Cells were pulsed with 1 mCi of ³H-thymidine during the final 8 h of culture and then recovered and counted in a scintillation counter.

Animals

Baboons (*Papio anubis*; 8–13 kg) were obtained from the Centre National de la Recherche Scientifique Primatology Center (Rousset, France). The animals were housed at the large animal facility of our laboratory and all experiments were performed in accordance with our institutional ethical guidelines. The donor–recipient combinations were chosen according to blood group compatibility, MHC mismatching by DRB MHC class II locus typing.

Renal transplantation in baboons

Renal allotransplantation was performed on nephrectomized recipients, as described(193). Twenty-four hour diuresis was monitored daily, as well as blood urea nitrogen. Graftectomies were performed when plasma creatinine levels rose to 500 µmol/L. Protocol biopsies were performed one month post transplantation and surgical biopsies before euthanasia for histological examination. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin—

blinded histological examination by a pathologist. A second fragment was snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA

Extraction, and a third fragment was placed in Tissue-Tek (Sakura Finetek) for immunohistochemical staining. All recipients received steroids (Solumedrol; Pfizer) intravenously (i.v.) 1 mg/kg/day (day 0-7) and tacrolimus (Prograf; Astellas) at 0.05 mg/kg/day (intramuscular (i.m.), adjusted to maintain trough levels between 5 and 10 ng/mL, considered as low in baboons) from day 0 to day 30 then a weaning was performed (dose reduced by half every week for three weeks then stopped). In addition they received either FR104 (Effimune) or Belatacept (Bristol-Myers Squibb) intravenously at 10 mg/kg at days 0, 7, 14 and then every 2 weeks. In cases of biopsy proven rejection animals received steroid (i.v. at 5, 4, 3, 2, 1 mg/kg at days 1, 2, 3, 4, 5 respectively then a weaning performed i.m. over three weeks).

Phenotyping Analysis

Fluorescent mAbs against human CD3 (SP34-2), CD4 (L200), CD8 (RPA-T8), CD25 (MA251), CD28 (28.6), CD95 (DX2), CD127 (hIL-7R-M21) were from BD Biosciences. Polyclonal antibody against human IgG was from DAKO. Samples were acquired on a BD FACSCANTO™ flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC).

Immunohistochemistry

Frozen sections (7 µm) were prepared from surgical or protocol renal biopsies. Slides were air-dried at room temperature for 1 h before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were saturated with phosphate-buffered saline containing 10% baboon serum, 2%

normal goat serum and 4% bovine serum albumin. Sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, followed by fluorescent secondary antibodies. Tfh infiltration was determined by triple staining using mouse anti-human CD4 (clone 4B12, DAKO), goat polyclonal anti-human PD-1 (R&D Systems Inc), and rabbit polyclonal anti-human IL-21 (AbD Serotec). The slides were mounted using Prolong Gold Antifade reagent with DAPI (Life Technologies) and images were recorded using a Nikon A1 RSi confocal microscope (60× NA 1.40 oil). Images processing was carried out using FIJI software.

Messenger RNA analysis

Messenger RNA was extracted from snap-frozen renal biopsies with Trizol reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of mRNA were controlled by infrared spectrometry (NanoDrop; Thermo Scientific). Messenger RNA was amplified and retrotranscribed with the OmniscriptRT kit (Qiagen) and real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was then performed, as previously described(193), with a ViiA™ 7 real-time PCR system (Life-Technologies). Amplification was performed for Foxp3 (Hs00203958_m1, Applied Biosystems), TGFβ (Hs00171257_m1), RORγc (*Hs01076112_m1*), *IL-17F* (Hs00369400_m1), IL-23 (Hs00372324_m1), Bcl6 (Rh01115889_m1), IL-21 (Rh02879198_m1), IL-10 (Hs00174086_m1), 2B4 (Rh02871839_m1), BTLA (Rh02889477_m1), PD-1 (Rh03418231_m1), perforine (Hs00169473_m1).

TSDR analysis

Genomic DNA was isolated from frozen tissue. After RNA extraction from Trizol buffer, 300µl of TNES-6U back extraction buffer was added (10mM Tris-HCl, pH 7,5; 125mM NaCl; 10mM EDTA, pH 8; 1% SDS; 6U urea) to the organic phase. After shaking, the mixture was incubated at RT for 10 min. Samples were then centrifuged at 18000g for 15 min at 4°C. The upper phase was removed, an equal volume of isopropanolol was added, and the samples were incubated 2 hours at -80°C. Then samples were centrifuged at 18000g for 15 min at 4°C. The supernatant was removed, and the pellets washed 3 times with 70% ethanol (incubated 3 min, then centrifuged at 18000g for 5 min). Finally samples were re-dissolved in Tris-EDTA buffer (10mM Tris; 0,1 mM EDTA, pH 8). The quality and quantity of DNA were controlled by infrared spectrometry (NanoDrop). Bisulfite treatment of genomic DNA was performed with the EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. We adapt the protocol described by Wieczorek et al(141) to P. Anubis as described(208). Real-time PCR was performed on a final reaction volume of 20µl using Roche LightCycler 480 Probes Master (Roche Diagnostics) containing 15 pmol each of methylation or nonmethylation-specific forward and reverse primers for TSDR, 5 pmol of hydrolysis probe, 200 ng of lambda-DNA (New England Biolabs) and 60 ng of bisulfite-treated genomic DNA template. Each sample was analyzed in duplicate using a LightCycler 480 System (Roche Diagnostics). Cycle conditions consisted of a 95°C preheating step for 10 min and 50 cycles of 95°C for 15 s followed by 1 min at 61°C. The proportion of unmethylated DNA was computed as the ratio of unmethylated TSDR and methylated TSDR.

Cell isolation

Tonsils samples were obtained from young patients (3-10 years) undergoing tonsillectomy. Single cells were collected by material disruption of tonsils samples. B cells were first positively selected with CD19 MACS microbeads (Miltenyi Biotech). For the isolation of Tfh populations, the CD19 negative fraction were stained with mAbs against human CD4 (L200), CD8 (RPA-T8) from BD Biosciences, CD20 (2H7), ICOS (C398.4A) from BioLegend and CXCR5 (MU5UBEE) from eBiosciences. Pre-Tfh (CXCR5+ICOS+) and Tfh (CXCR5^{high}ICOS^{high}) were sorted with FACSAria (BD Biosciences) according to the expression of ICOS and CXCR5 within the CD4⁺CD20⁻CD8⁻ cell population.

Cell culture

Sorted Th populations were cocultured with B-cell (2×10^4 cells/well each) in RPMI medium 1640 (GIBCO) supplemented with 1% L-glutamine (Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Sigma), 1% sodium pyruvate (Sigma), 1% nonessential amino acids (Sigma), 50 μ M β -mercaptoethanol (Sigma), 50 μ g/mL gentamycin (GIBCO), and 10% heatinactivated FCS (Eurobio) in the presence of SEB (1 μ g/mL, Sigma-Aldrich) in U-bottomed 96-well plates. In the blocking experiment, the following reagents were added to the co-cultures: FR104 (10 μ g/ml; Effimune) and Belatacept (10 μ g/ml; Bristol-Myers Squibb). At 8 days cultured cells were stained with anti-human CD3 (SP34-2; BD Biosciences) and the number of T cell per well assessed using CountBright Absolute Counter Beads (Life Tcechnologies).

Statistics.

Graft survival times were plotted with the Kaplan–Meier representation, and survival time between different groups was evaluated with a log-rank test. Continuous variables were expressed as the mean +/- SEM, and compared with the Mann–Whitney nonparametric test. Paired observations were analyzed with Wilcoxon matched-paired signed rank test. Multiple comparisons were analyzed with a one-way ANOVA and a Kruskal–Wallis test. Pairwise correlation analysis were performed using the Spearman’s rank correlation coefficient. Differences were considered significant if the p value was less than 0.05. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Software).

Study approval.

Animal studies were approved by the French national ethical committee (CEEA-2010-17). All donors were informed of the final use of their biologic sample and signed an informed consent.

Acknowledgments

The authors thank Olivier Malard and Julie Boyer from otorhinolaryngology department of the Centre Hospitalier Universitaire of Nantes.

Conflict of interest statement

N. P., S.P., C.M. and B. V. are employees of Effimune, a company developing CD28 antagonists.

Figures

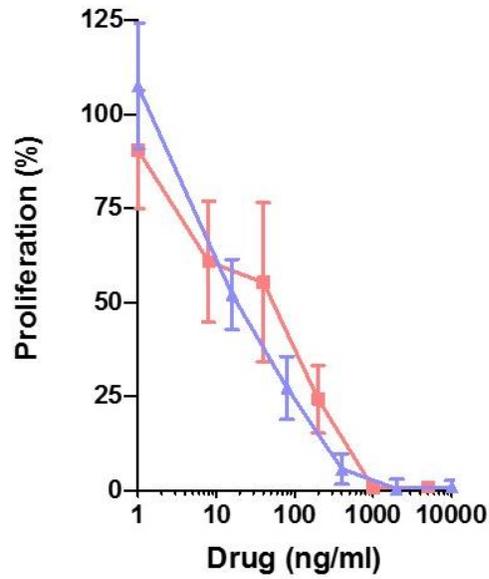


Figure 1. **FR104 and Belatacept inhibit equally *in vitro* T cell proliferation.** FR104 (blue triangle) and Belatacept (red square) dose response on baboon (n=4) peripheral blood mononuclear cells mixed lymphocyte proliferation assay at day 5, assessed by ^3H -thymidine uptake.

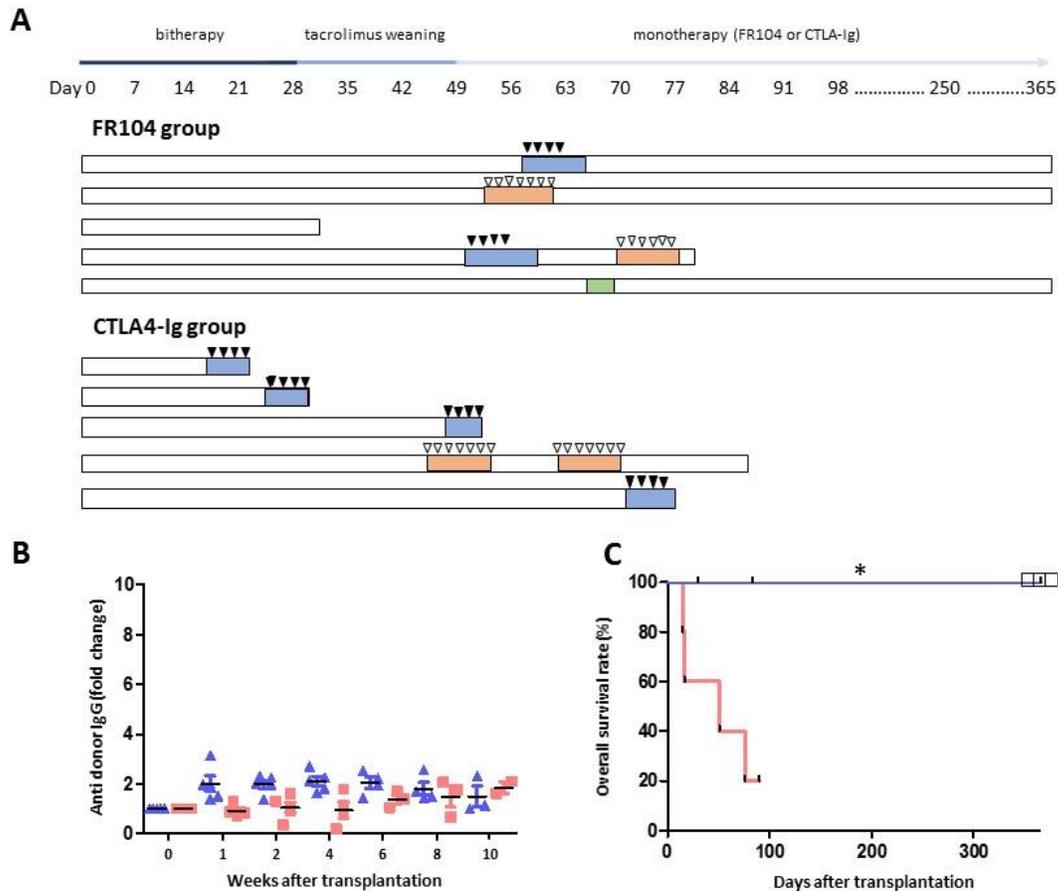


Figure 2. **Kidney allograft survival under treatment with FR104 or belatacept plus short term suboptimal CNI** (A) Description of immunosuppressive regimens, clinical interventions and outcomes in FR104 and CTLA4-Ig treated groups. Highlighted rectangles represent acute episodes of renal failure, in blue caused by rejection, in red by infection and in green by obstruction. Black triangles represent steroid bolus, and open triangles antibiotics use. (B) IgG donor specific alloantibodies (DSA) as detected by flow cytometry after transplantation in baboons treated with FR104 (blue triangle) or with CTLA4-Ig (red square). (C) Kaplan-Meier plot of overall survival, for baboons treated with 1 month of tacrolimus low dose + chronic FR104 (blue line, n = 5) or 1 month of tacrolimus low dose + chronic CTLA4-Ig (red line, n = 5), open square represent animals still alive one year post transplantation, death by other cause than rejection have been censored, black mark represent recipient death. Survival time was evaluated with a log-rank test, differences were considered significant if the p value was less than 0,05.

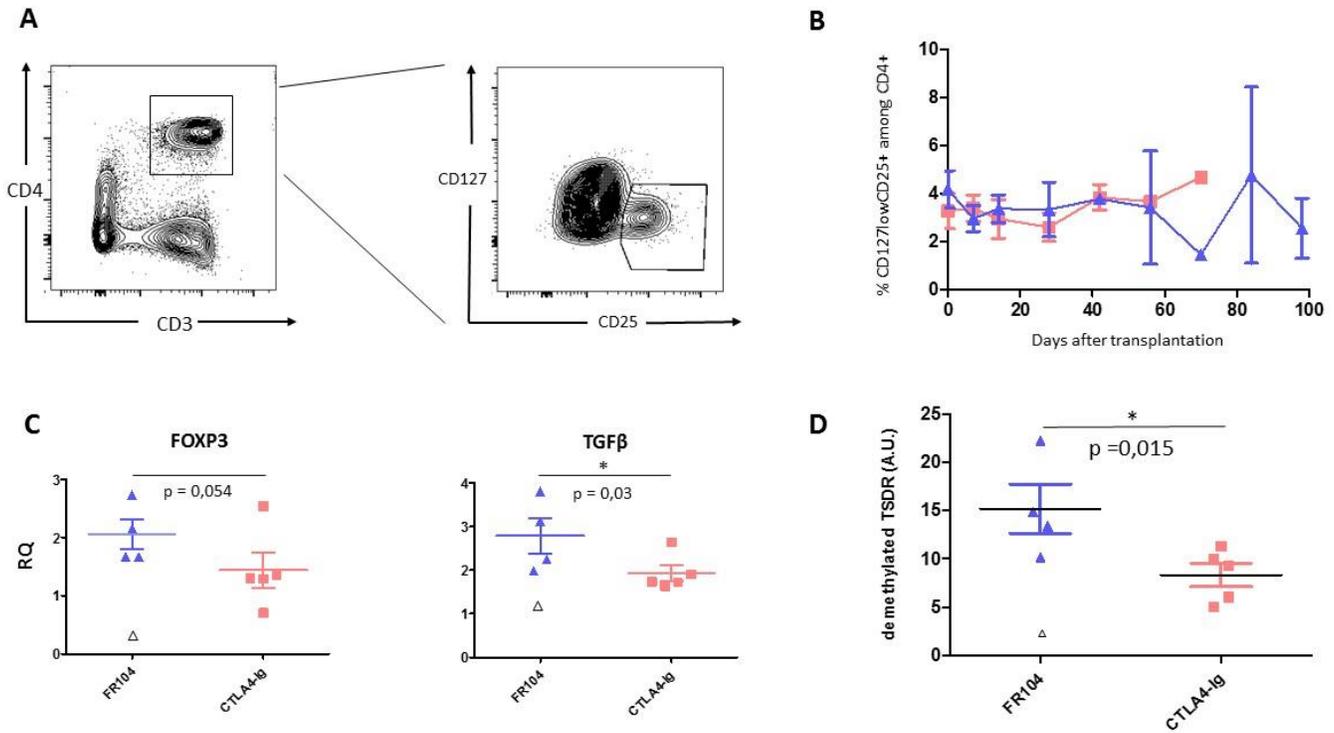


Figure 3. **Treg assessed by unmethylated TSDR cells, are higher in FR104-treated animals.** (A) Flow cytometry contour plot showing gates used to assess percentage of CD4+ CD25high CD127low Treg cells. (B) Kinetics of Treg cells post transplantation in FR104-treated recipients (blue triangle, n=5) and in CTLA4-Ig treated recipients (red square, n = 5).(C) Quantitative real-time PCR measurement of Foxp3 and TGFβ gene expression in one month protocol biopsy, or earlier biopsy in case of rejection, from animals treated with FR104 (blue triangle, n=5) or CTLA4-Ig (red square, n=5). Graph show expression level of genes relative to HPRT, data are mean +/- SEM.

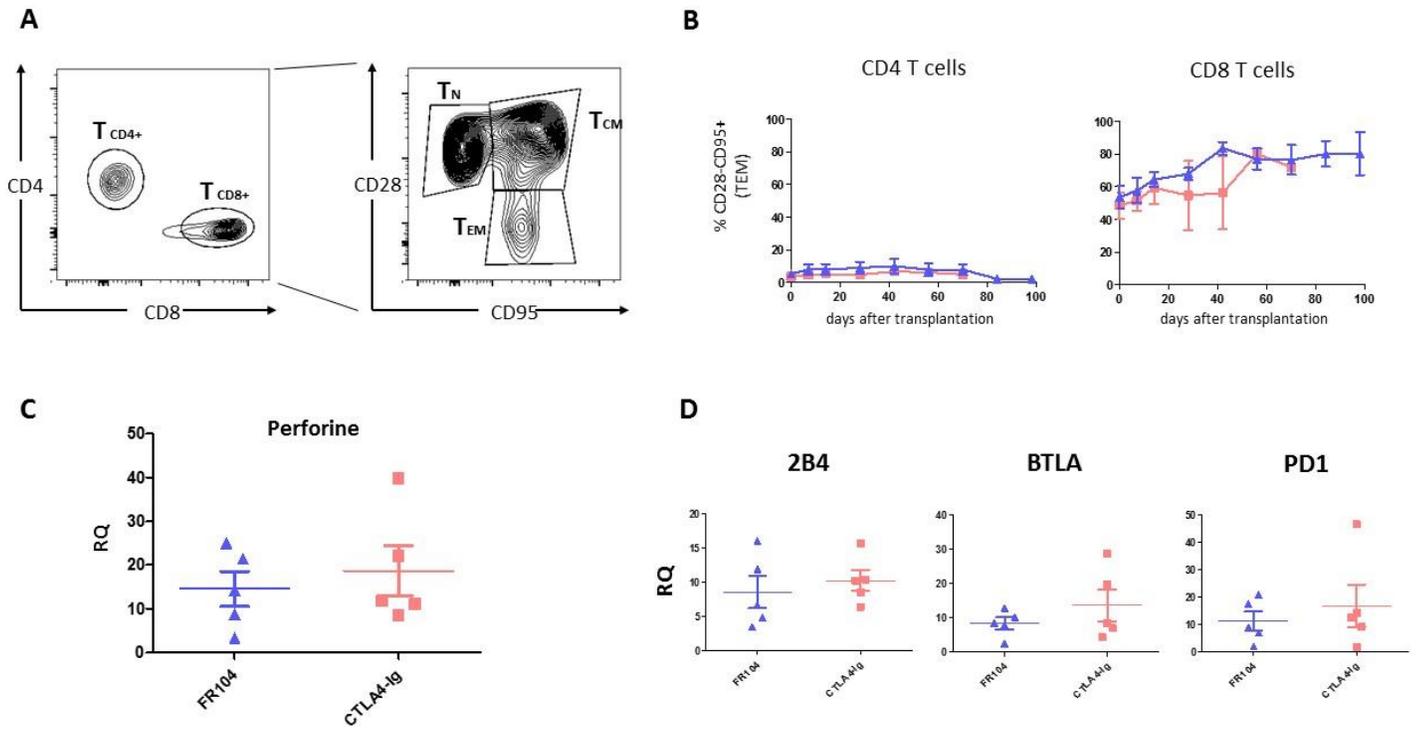


Figure 4. No difference in peripheral blood CD28 negative T-cell and co-inhibitory receptor 2B4 expression.

(A) Flow cytometry contour plot showing gates used to assess percentage of naïve T cells (T_N , CD28⁺CD95⁻), central memory T cells (T_{CM} , CD28⁺CD95⁺) and effector memory T cells (T_{EM} , CD28⁻CD95⁺) among CD4⁺ and CD8⁺. (B) Kinetics, in the CD4⁺ and CD8⁺ compartments of TEM cells post transplantation in FR104-treated recipients (blue triangle, n=5) and in CTLA4-Ig treated recipients (red square, n = 5). (C, D) Quantitative real-time PCR measurement of gene expression in one month protocol biopsies or earlier in case of rejection, from animals treated with FR104 (blue triangle, n=5) or CTLA4-Ig (red square, n=5). Graph show expression level of genes relative to HPRT, data are mean +/- SEM.

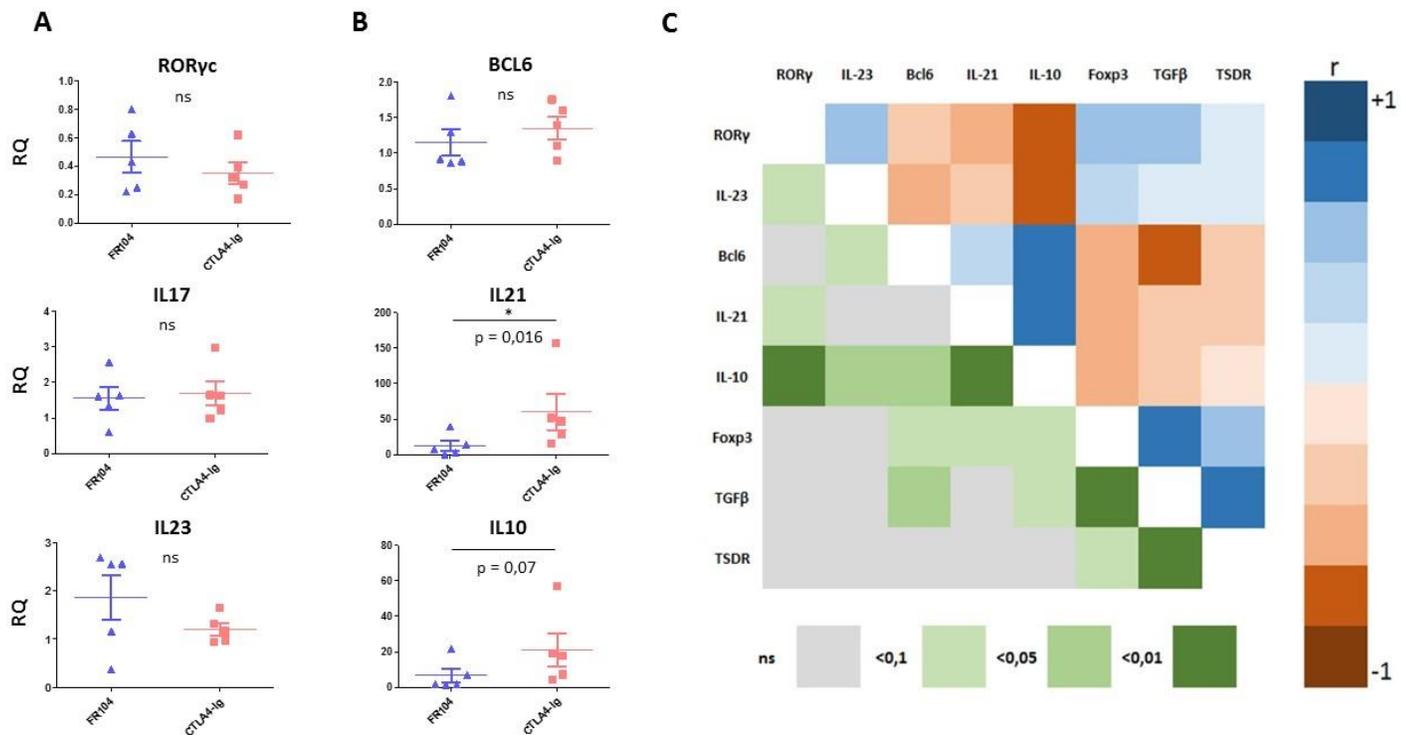


Figure 5. IL-21 gene expression, but not Th17 gene expression signature is increased in CTLA4-Ig treated recipients. (A, B) Quantitative real-time polymerase chain reaction measurement of mRNA expression on one month protocol biopsies or earlier in case of rejection, from animals treated with FR104 (blue triangle, n=5) or CTLA4-Ig (red square, n=5), graphs show expression levels of the indicated target gene relative to HPRT, data are mean +/- SEM. Mann-Whitney nonparametric test was used, p values greater than 0.05 are considered non-significant. **(C)** Pairwise correlation analysis to determine the direction and the strength of the linear relationships between genes. The upper right half of the matrix is the color map of correlations. Bright colors indicate the pairs of variables closely related using the Spearman's rank correlation coefficient (r), faded colors encode for decreasing r values. The lower left half of the matrix is the color map of p values.

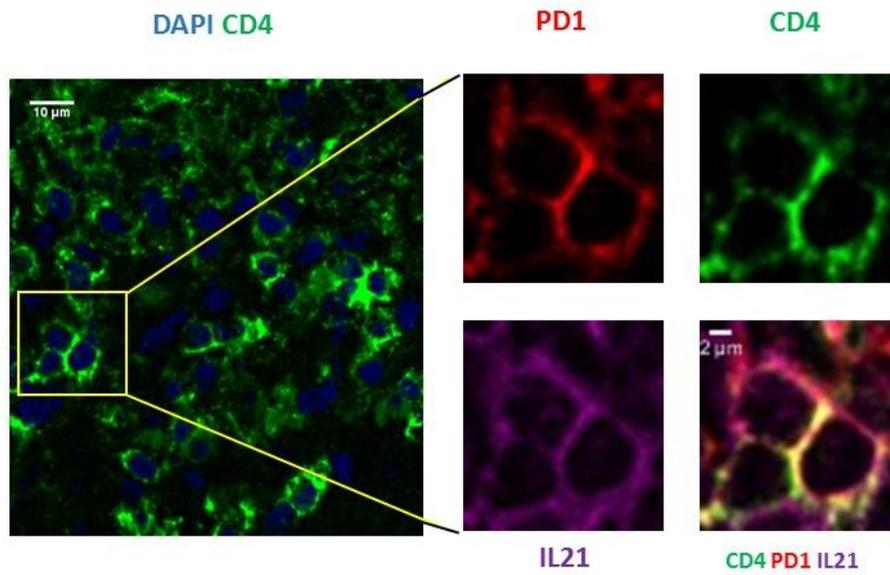


Figure 6. Immunostaining of a one month protocol biopsy from CTLA4-Ig treated recipient showing CD4 T cell co-expressing PD-1 and IL-21, taken to be follicular helper T cells.

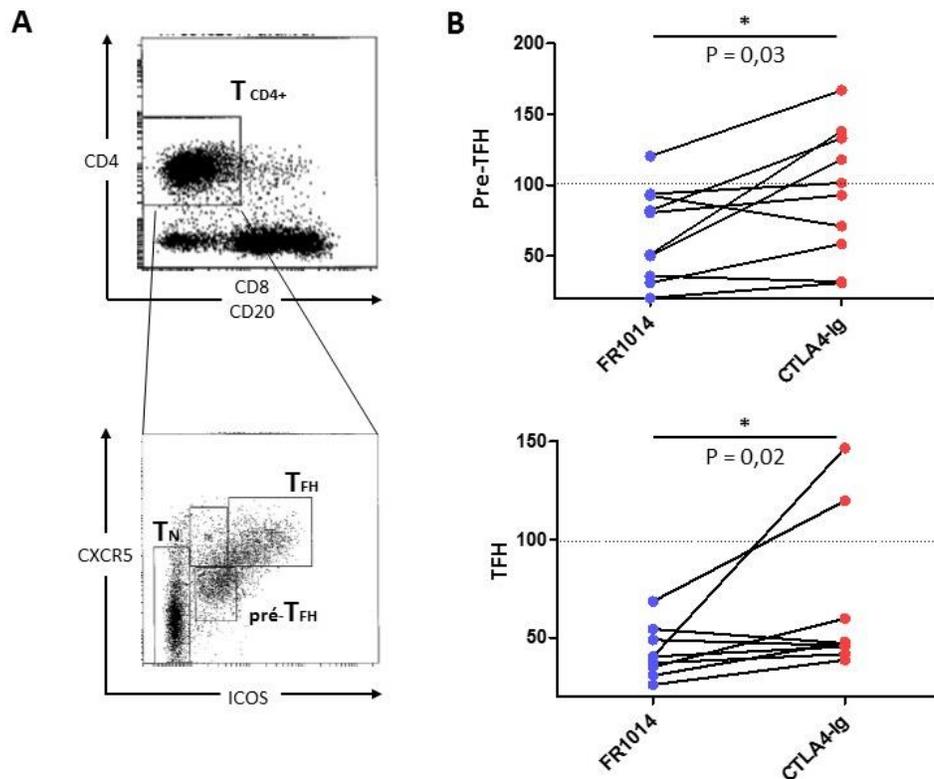


Figure 7. **CD28 selective blockade more effectively controls Ag experienced TFH compared to CTLA4-Ig *in vitro* with sorted cells from human tonsils.** (A) Flow cytometry plot representative of human tonsil cell suspension showing gates used to sort pre-Tfh (CD4+CXCR5+ICOS+) and Tfh (CD4+CXCR5highICOShigh), (B) proliferative response to autologous B cell plus SEB after 8 days presented as percentage of pre-Tfh and Tfh compared to control condition, under either FR104 (blue circle) or CTLA4-Ig (red circle), each pair of points connected represent a paired experiment (n=10). Wilcoxon matched-paired signed rank test was used.

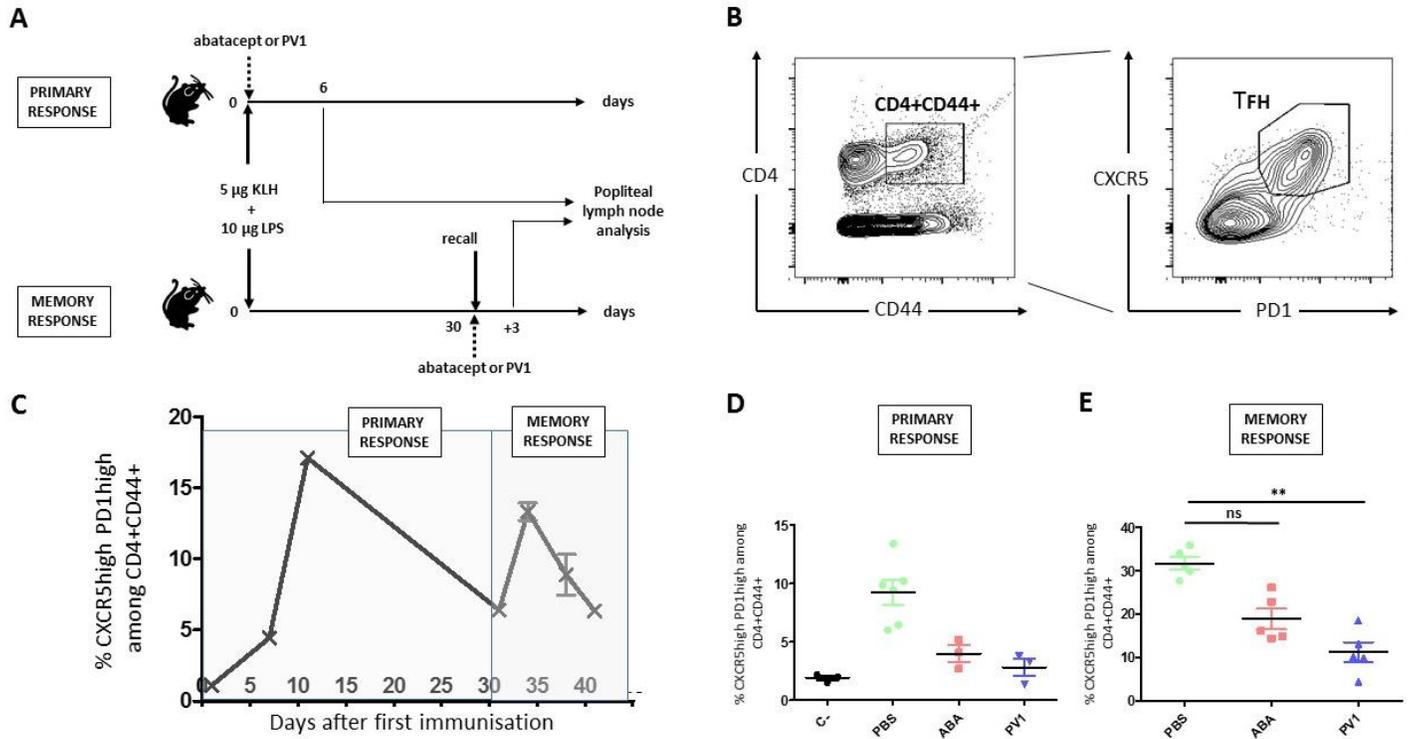


Figure 8. CD28 selective blockade more effectively controls Tfh recall response to KLH immunization in mice than CTLA4-Ig (A) Mice were immunized with KLH and LPS in footpad, and treated with CTLA4-Ig or PV1 an anti-CD28 antagonist efficient in mice either on day 0 to study primary response or one month after a first immunization to study memory response. Post immunization draining popliteal lymph nodes were collected and levels of Tfh (CXCR5+PD1+) among CD4+ or CD4+CD44+ assessed by flow cytometry as represented in flow cytometry contour plot (B). (C) Time course under control condition (n=3). (D) Percentage of Tfh among CD4+CD44+, on day 6 post immunization, or 3 days after re-immunization (E) according to condition indicated on X axis (n= 5 in each group), data are mean +/- SEM. One-way ANOVA and Kruskal–Wallis test were used, *p < 0.05, **p < 0.01

5.2 DISCUSSION DES RESULTATS

Notre protocole d'immunosuppression sub-optimal, a permis de mettre en évidence une supériorité du blocage sélectif de CD28 par rapport au CTLA4-Ig. D'une part l'incidence de rejet aigu a été plus faible dans le groupe des animaux FR104 (50% contre 80% avec le Belatacept) de plus, le profil des rejets était différent, cortico-sensible sous FR104 et résistant avec le Belatacept. Sur les biopsies diagnostics du rejet, faites très précocement après la dégradation de la fonction rénale, la sévérité, évaluée par la classification de Banff, était comparable entre les deux groupes (IA et IB) en dehors d'un animal sous Belatacept qui présentait des lésions vasculaires (IIA). En revanche, les biopsies chirurgicales réalisées lors de l'euthanasie des animaux sous Belatacept et donc après l'échec de la corticothérapie, présentaient d'importantes lésions vasculaires (IIB). A noter que sur ces mêmes biopsies, le marquage par le C4d était faiblement positif mais dans des zones de nécroses, ce qui peut correspondre à une fausse positivité. Par ailleurs, aucun allo-anticorps n'a été mis en évidence. Ce qui confirme l'efficacité du blocage de CD28, quel que soit sa modalité, sur de la réponse humorale primaire, qui peut être expliqué, comme mentionné précédemment, par l'importance des signaux médiés par CD28 pour l'initiation de la réponse Tfh primitive.

Les rejets que nous avons observés sous Belatacept sont donc des rejets cellulaires sévères. Au vu des résultats de BENEFIT cela n'est pas surprenant. En effet, alors que les patients recevaient, contrairement à nos animaux, une induction par anti-IL2R et des corticoïdes au long cours, environ 1/3 des rejets dans le groupe Belatacept était des rejets de stade IIB avec pour conséquence un traitement par SAL d'emblée, et environ 1/3 des rejets traités par corticoïdes en première intention était cortico-résistant, alors même que ces rejets n'avait pas de composante humorale (115).

Les biopsies protocolaires à 1 mois post-transplantation, dans les deux groupes, présentaient un important infiltrat interstitiel, qui bien que similaire pour les marquages classiques en immunohistochimie (CD3, CD4, CD8, CD20), nous a permis d'explorer les causes de cet effet différentiel. Nous avons supposé que celui-ci était dépendant du maintien des fonctions de CTLA-4 qui constitue la principale différence théorique entre le FR104 et le Belatacept.

Pour explorer les fonctions extrinsèques de CTLA-4 nous avons évalué la quantité et la fonction des lymphocytes Treg. Nous avons observé une quantité significativement plus importante de Treg dans l'infiltrat des biopsies des animaux traités par FR104 en comparaison

de ceux sous Belatacept en utilisant l'évaluation du statut de méthylation du TSDR. La différence n'était pas significative avec l'expression de Foxp3 ce qui peut s'expliquer par le manque de spécificité de Foxp3, qui comme nous l'avons vu dans l'article 1 ne corrèle pas avec le TSDR en particulier en situation inflammatoire. Cet effet différentiel sur la quantité de Treg au sein de l'infiltrat, en dehors d'une situation de rejet, est concordant avec la littérature. En effet, bien que CD28 soit nécessaire à la survie des Treg, le blocage sélectif de CD28 semble moins les impacter. L'analyse des biopsies protocolaires à 12 mois de BENEFIT révélait une diminution significative de l'expression de Foxp3 dans les groupes Belatacept en comparaison du bras MMF / ciclosporine (134), de plus l'ajout de CTLA4-Ig s'opposait à l'induction de la tolérance dans 2 modèles dépendant des Treg (130,131). En revanche les études avec le sc28AT chez le primate (193) et le α 28scFv (195) chez la souris ont montré une augmentation des cellules T régulatrices chez les animaux traités par un anti-CD28 sélectif en comparaison des groupes contrôles (ciclosporine ou anti-CD40 en monothérapie). Par ailleurs nous avons vu dans l'article 1, qu'avec le FR104 bien qu'on ne retrouvait pas l'augmentation des Treg décrites avec le sc28AT, elles étaient à un niveau similaire par rapport aux groupes monothérapie. Cela pourrait s'expliquer par un effet intrinsèque de CTLA-4 sur les Treg, qui deviendrait prépondérant en absence de signaux médié par CD28.

Par ailleurs au niveau de la fonction des Treg l'expression de TGF β , dont la sécrétion a été montré dépendre en partie de l'engagement de CTLA-4 (80,81), était augmenté dans les biopsies protocolaires des animaux traités par le FR104. En revanche, aucune différence n'était constatée concernant l'expression d'IDO, pourtant également dépendante de l'engagement de CTLA-4.

Comme nous l'avons vu en introduction l'autre effet potentiellement attendu d'une préservation de la voie CTLA-4 est de maintenir les signaux intrinsèques inhibiteurs particulièrement au niveau des cellules mémoires / effectrices, comme démontré pour les cellules T Th17 (104), et dont l'activation peut être indépendante de CD28 comme démontré pour les Tfh (58). Alors que ROR γ T, l'IL-17 et l'IL-23 n'était pas exprimé différemment entre les deux groupes, les transcrits de l'IL-21 et dans une moindre mesure ceux de l'IL-10, les principales cytokines exprimées par les cellules T Tfh, étaient plus nombreux dans les biopsies des animaux traités par le Belatacept. Bcl6 le facteur de transcription dominant des Tfh n'était pas différemment exprimé entre les deux groupes, mais le fait qu'il est exprimé par d'autres types cellulaires dont certaines cellules B peut expliquer un manque de puissance. L'IL-21 peut également être produite par les cellules T Th17, et l'IL-10 par les Treg. Néanmoins en observant

la matrice de corrélations entre l'expression des différents gènes on observe que ROR γ T et l'IL23 aussi bien qu'un groupe composé de Foxp3, TGF β et du TSDR, ont tendance à être inversement corrélés à un groupe constitué de Bcl6, IL-21 et IL-10, ce qui semble accréditer l'hypothèse d'une « signature » Tfh exacerbée dans les biopsies des animaux traités par Belatacept.

Comme nous l'avons vu, les cellules Tfh effectrices / mémoires ont les caractéristiques « requises » pour provoquer des rejets résistants au Belatacept en vertu du principe d'immunité hétérologue. En effet alors qu'à ce stade leur activation est indépendante de CD28 (58), des signaux intrinsèques inhibiteurs, dépendant de l'engagement de CTLA-4, régulant leur fonction ont été décrit (89). Bien que ces cellules soient habituellement localisées dans les organes lymphoïdes périphériques, une récente étude portant sur des biopsies rénales de patients lupiques et de rejet cellulaire ou mixte, a révélé que ces cellules sont très fréquemment présentes au sein de l'infiltrat lymphoïde dans toutes ces situations (212). Nous avons pu constater en immunohistochimie au moyen d'un triple marquage CD4, PD-1 (le principal marqueur utilisé avec ICOS, pour discriminer les cellules T Tfh) et IL-21 que des cellules pouvant être identifiées comme des Tfh sont présentes dans l'infiltrat des biopsies de nos animaux.

Etant donné la difficulté d'une analyse quantitative au vu de la densité de l'infiltrat chez tous les animaux, nous avons évalué l'effet d'un blocage sélectif de CD28 ou d'un blocage de CD80/86 sur des cellules Tfh :

- (1) *In vitro* sur des cellules pré-Tfh ou Tfh humaines, issues d'amygdales.
- (2) *In vivo* chez la souris, dans un modèle d'immunisation peptidique par la KLH, qui permettait de distinguer la réponse primaire de la réponse secondaire.

En dehors de la réponse Tfh primaire ou comme attendu, aucune différence n'était constatée entre les deux modalités de blocage de la triade CD28 / CD80/86 / CTLA-4, dans les situations impliquant des cellules Tfh expérimentées, le blocage sélectif de CD28 était supérieur pour contrôler leur activation.

Récemment Venner *et Al* (213), à partir d'une large série de biopsies rénales, ont analysé les caractéristiques transcriptomiques spécifiques du rejet cellulaire vis-à-vis, entre autre, du rejet humoral. Il est intéressant de constater que l'IL-21R fait partie des 30 gènes identifiés. Ainsi dans la situation inhabituelle de la réponse allo-immune, les cellules Tfh n'agiraient pas en optimisant la réponse humorale (leur fonction physiologique) mais au travers d'autres

mécanismes effecteurs non spécifiques comme par exemple la sécrétion d'IL-21. L'IL-21 a en effet d'autres fonctions que la participation à la coopération T/B dans le cadre de la réponse humorale. L'IL-21 a été décrite comme cruciale dans la balance entre réponse effectrice et régulatrice. En particulier elle a montré dans la cadre de la réponse allo-immune à une greffe d'îlots pancréatiques chez la souris, un effet anti-toléro-gène en inhibant l'induction et la fonction des cellules T régulatrices (214).

Au vue de nos données il n'est pas possible d'affirmer que la différence du nombre de Treg constatée entre nos deux groupes implique un effet de l'IL-21. Il est néanmoins intéressant de constater que dans l'étude cité ci-dessus, la résistance au blocage de la costimulation par du CTLA4-Ig, constatée dans 50% des greffes était reversée dans tous les cas par l'ajout d'un antagoniste de l'IL-21.

De la même façon le mécanisme de la résistance aux corticoïdes ne peut pas être lié directement au déficit en Treg ou à l'inflation en IL-21. Cependant les maladies auto-immunes impliquant une dysfonction des Treg sont réputées résister aux stéroïdes (216). Par ailleurs, Matignon *et al* (217) ont récemment comparé le profil d'expression de gènes d'intérêts entre des rejets cellulaires sensibles ou résistant à un traitement conventionnel par corticoïdes : seule l'expression d'IL-21 et pas celle de T-bet, ROR γ T et de l'IL-17 était significativement supérieure dans les rejets corticorésistants.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Modèle développemental et balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4

La dépendance vis-à-vis des signaux de costimulation et de co-inhibition varie en fonction du statut des lymphocytes T. La nécessité d'un second signal médiés par CD28 pour activer les cellules T naïves ne fait pas de doute. En revanche, classiquement les cellules mémoires sont réputées pouvoir passer outre le second signal médié par CD28. Cette caractéristique est considérée comme un atout, attribué au cours d'une réponse immunitaire, aux cellules ayant répondu avec succès à l'antigène, devenues des cellules mémoires, afin de favoriser une réponse anamnésique en cas de nouvelle exposition à l'antigène. Cette vision s'inscrit dans le schéma classique quant à l'origine des cellules mémoires. En effet, le modèle dominant considère que les cellules mémoires spécifiques d'un antigène, sont issues de la différenciation de cellules effectrices, survenant lors de la contraction de la réponse immunitaire.

Récemment une nouvelle théorie a émergé, selon laquelle les cellules effectrices sont issues des cellules mémoires et pas l'inverse (218,219). Ce modèle est nommé développemental car il assimile la différenciation des lymphocytes T au cours d'une réponse immunitaire, à ce qui se passe dans d'autres systèmes biologiques. Par exemple, dans l'épiderme, les cellules basales prolifèrent et se différencient progressivement en kératinocytes selon un cycle permanent. Ainsi, sous l'influence de l'exposition à un antigène spécifique, les cellules T naïves spécifiques, proliféreraient et se différencieraient selon un processus linéaire et unidirectionnel, d'abord en cellules mémoires centrales, qui elles même se différencieraient en cellules mémoires effectrices puis en cellules effectrices « terminales ». Tout au long de ce processus, telles des pierres dévalant une colline, les cellules T perdraient leur potentiel de prolifération (assimilé à de l'énergie potentielle de pesanteur), maximal pour les cellules naïves mais limité dans les cellules effectrices, tout en gagnant des capacités effectrices et de homing (assimilé à de l'énergie cinétique) (cf **Figure 11**, partie du haut). Le modèle classique nécessite que l'expression des gènes impliqués dans la réponse effectrice soit éteinte lors de la différenciation des cellules effectrices en cellules mémoires puis rallumée lors d'une réponse mémoire (220) (ce modèle est ainsi parfois qualifié de ON – OFF – ON). Cela implique des modifications massives de la structure de la chromatine, alors que dans le modèle développemental les

modifications épigénétiques suivraient un cheminement progressif, comme cela a déjà été décrit dans de nombreux systèmes biologiques (221).

Dans le modèle développemental la perte du marqueur de surface CD28, est décrite comme un des événements les plus tardifs du processus de différenciation (222). Comme nous l'avons vu les cellules T CD28 négatives sont en effet des cellules très différenciées, avec des capacités effectrices très développées mais un faible potentiel de prolifération et exprimant de nombreuses molécules de co-inhibition dont CTLA-4, les faisant parfois qualifier de cellules épuisées (exhausted).

Les prédictions de ces deux modèles concernant l'importance relative de la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4 pour les cellules T mémoires et effectrices sont très différentes.

Dans le modèle classique la perte de la dépendance vis-à-vis de CD28 serait acquise par les cellules effectrices et transmise aux cellules mémoires.

Dans le modèle développemental la perte de la dépendance vis-à-vis de CD28 serait un processus évolutif, le seuil d'activation de la cellule T s'abaissant progressivement au cours de la maturation, et parallèlement des mécanismes de régulation, comme la voie CTLA-4, seraient mis en place. Ainsi la véritable indépendance vis-à-vis de CD28 serait restreinte à des cellules parvenues à un stade avancé de maturation, avec des capacités effectrices et de homing, mais avec un faible potentiel de « nuisance » (risque d'auto-immunité). Cela limiterait la prise de risque consentie en leur attribuant une indépendance vis-à-vis du second signal (qui pourrait néanmoins être bénéfique pour répondre à un antigène en périphérie, dans un environnement dénué de CPA professionnelles).

Les avancées récentes de l'immunologie s'accordent avec les prédictions du modèle développemental. Comme nous l'avons vu en introduction, des modèles pertinents d'immunité anti-infectieuses ont démontré l'importance du respect des signaux médiés par CD28 pour la mise en œuvre d'une réponse mémoire optimale (55), contredisant les résultats des études initiales menées *in vitro* et chez la souris CD28 déficientes. Il est à noter que dans la cadre de la réponse allo-immune, l'intensité de la stimulation antigénique pourrait dépasser le seuil d'activation des lymphocytes T et donc rendre indépendante des signaux médiés par CD28, des cellules qui ne le seraient pas avec un antigène conventionnel. Néanmoins, l'examen approfondi de la résistance au blocage de la costimulation, a montré que les cellules impliquées dans le rejet (via le phénomène d'immunité hétérologue) et donc supposées indépendantes de CD28, sont des cellules effectrices, plutôt que mémoires.

Ces études ont été menées avec du CTLA4-Ig bloquant CD28 mais également CTLA-4. Or comme nous l'avons dit ci-dessus, les signaux intrinsèques inhibiteurs médiés par des molécules de co-inhibition sont essentiels pour les cellules matures. Ainsi, alors que pour des cellules naïves, qui n'expriment CTLA-4 qu'après activation, le blocage de CD28 quelle que soit sa modalité sera efficace, pour des cellules effectrices matures (avec un seuil d'activation et donc une dépendance vis-à-vis de CD28 abaissée mais régulée par CTLA-4) un effet différentiel pourrait être observé entre le CTLA4-Ig et un anti-CD28 antagoniste. En effet, le blocage des signaux intrinsèques inhibiteurs médiés par CTLA-4 pourrait revigorer les cellules « exhausted » et entraîner des rejets, alors qu'une antagonisation sélective de CD28 en préservant ces signaux inhibiteurs limiterait leur activation. Le cas des cellules mémoires représente probablement une situation intermédiaire dans laquelle l'intensité de la stimulation antigénique est certainement un des paramètres décisifs quant à l'issue de la réponse (cf **Figure 11**, partie du bas).

Comme nous l'avons vu selon leur polarisation (223) au cours de leur maturation, l'importance relative de CD28 et de CTLA-4 varie entre les sous populations de cellules T. Cette donnée est donc également à prendre en considération pour analyser les conséquences d'une modulation de la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4. Nous avons vu que les cellules Th17 et Tfh présentaient les caractéristiques « requises » à la mise en œuvre d'un effet différentiel entre le CTLA4-Ig et le FR104 (relative indépendance vis-à-vis de CD28 et régulation par des signaux intrinsèques inhibiteurs médiés par CTLA-4), ce que semble confirmer nos données objectivant un profil de rejet associé à une expression d'IL-21 augmentée dans les greffons des animaux traités par le CTLA4-Ig.

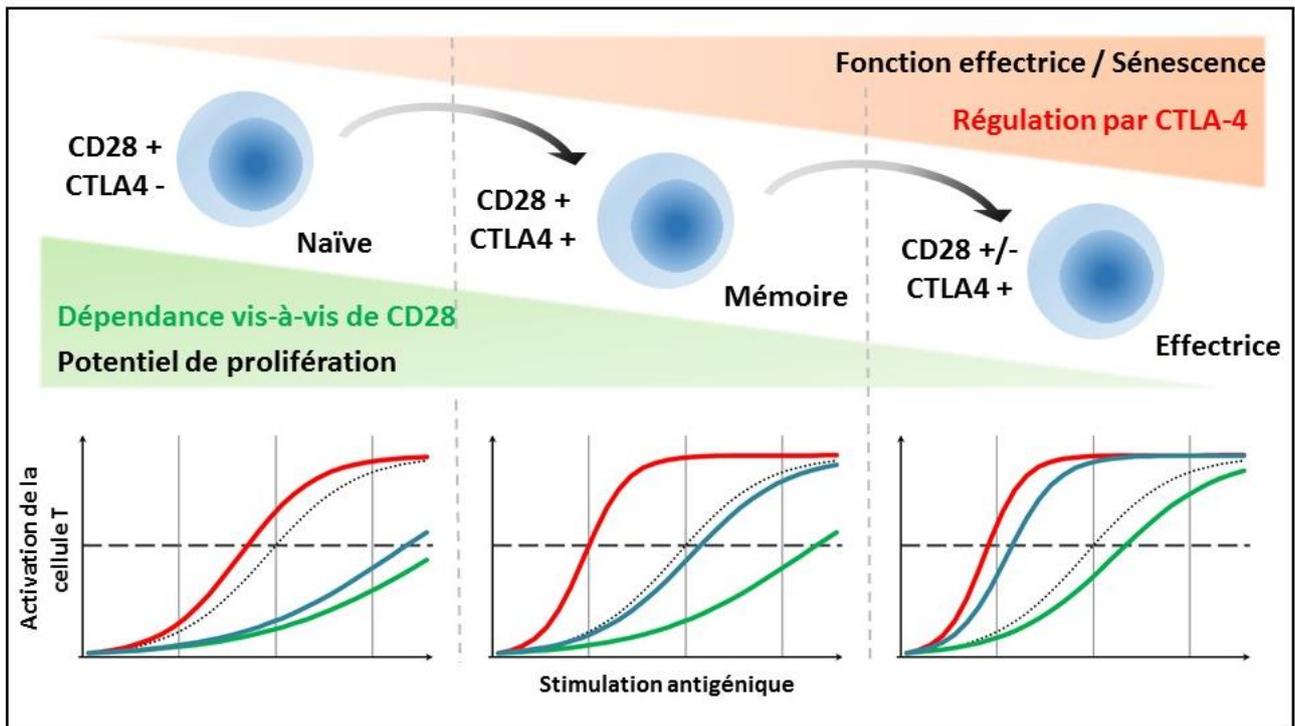


Figure 11 : la dépendance vis-à-vis de CD28 et la régulation médiée par CTLA-4 varient tout au long de la maturation des cellules T. soulignant les conséquences des différentes stratégies ciblant la balance CD28 / CD80-86 / CTLA-4.

Ligne pointillé : condition contrôle.

Ligne rouge : blocage de CTLA-4.

Ligne verte : blocage de CD28.

Ligne bleue : blocage de CD80-86.

Barre horizontale : seuil d'activation de la cellule T.

IL-21 et transplantation

Parmi les cytokines qui ont pour récepteur la chaîne γ c commune (IL-2, IL-7 et IL-15), l'IL-21 est celle qui a été découverte le plus récemment en 2000 (224). Les études initiales ont montré que l'IL-21 est produite par les lymphocytes T CD4+ activés et pas par les CD8+. Bien que toutes les cellules T CD4+ activées sécrètent de l'IL-21, sa source principale est constituée des Th17 et des Tfh (225). Il a été montré que l'engagement d'ICOS via le facteur de transcription c-Maf contrôle l'expression de l'IL-21 (226).

Le récepteur de l'IL-21 est largement exprimé par les cellules lymphoïdes. L'IL-21 a donc des effets pléiotropes qui s'exercent sur de nombreux type cellulaire.

L'IL-21 est cruciale pour la réponse humorale puisqu'elle favorise d'une part la génération des lymphocytes Tfh sur un mode autocrine, et qu'elle induit la prolifération des cellules B et leur différenciation en cellules productrices d'immunoglobulines (206).

L'IL-21 a également un effet sur les cellules T régulatrices à différents niveaux (227). L'IL-21 s'oppose à la différenciation des cellules naïves en Treg, autrement dit à l'induction d'iTreg, aussi bien dans des protocoles *in vitro*, qu'*in vivo* puisque les souris IL-21 déficientes ont un nombre accru de Treg. De plus l'IL-21 s'oppose à l'activité suppressive des Treg. En effet l'ajout d'IL-21 rend résistant des cellules CD4+CD25- humaine à l'action suppressive des Treg.

Bien qu'elle ne soit pas indispensable pour le développement et l'homéostasie des cellules T naïves, l'IL-21 est une des cytokines majeures intervenant dans l'entretien de la réponse immunitaire après la rencontre avec l'antigène. En effet en 2009 trois groupes ont rapporté simultanément (228–230), en utilisant le modèle d'infection chronique par le LCMV sur des souris déficientes en IL-21 ou en IL21R, que l'IL-21 est nécessaire au contrôle de l'infection chronique. Dans les souris déficientes, alors que lors de la phase aiguë les cellules CD8+ effectrices présentaient une prolifération et des capacités effectrices permettant de contrôler efficacement la charge virale, à distance, le virus persistait et une dysfonction des cellules T CD8+ spécifiques du virus était constatée. Il semble donc qu'au cours de la réponse immunitaire l'IL-21 sécrétée par les lymphocytes T CD4+ activés s'oppose à l'exhaustion des cellules CD8+ en favorisant leur survie et leurs capacités effectrices.

Dans le contexte de la transplantation, l'IL-21R fait partie des 30 gènes identifiés comme les plus spécifiques du rejet cellulaire dans une étude analysant les caractéristiques

transcriptomiques d'une large série de biopsie rénale (213). McGuire *et al* (231) et Petrelli *et al* (214) ont montré l'efficacité de l'antagonisation de l'IL21 dans des modèles de transplantation d'ilots pancréatiques chez la souris. Petrelli *et al* retrouvaient une augmentation de l'IL-21 pendant la phase tardive de la réponse allo-immune. Alors que son antagonisation favorisait l'expansion des Treg en périphérie et dans l'infiltrat de la greffe, son induction dans une souris IL-21 transgénique favorisait l'expansion des cellules T effectrices.

Ces données arguent donc pour un rôle de l'IL-21 dans le rejet cellulaire. Sa source pourrait être les cellules CD4+ activées en particulier Th17 et/ou Tfh et ses effets, d'une part, une inhibition de l'induction d'iTreg et d'autre part un renforcement de la survie et des capacités effectrices des cellules T allo-réactives en particulier CD8+.

Y compris en cas de blocage de la costimulation, les cellules effectrices / mémoires préexistantes allo-réactives, Th17 et/ou Tfh, qui comme nous l'avons vu précédemment présentent les caractéristiques requises pour résister au blocage de la costimulation pourrait être des sources d'IL-21. Associer une antagonisation de l'IL21 à un blocage de la costimulation pourrait donc avoir un effet synergique. C'est précisément ce qu'ont montré Petrelli *et al* puisque dans leur modèle alors que 50% des animaux rejetaient leur greffon avec du CTLA4-Ig, aucun rejet n'était constaté en ajoutant un antagoniste de l'IL-21.

Dans notre protocole nous avons des arguments pour penser que l'IL-21 provient majoritairement de cellules Tfh allo-réactives. Dans cette perspective de rejet cellulaire, leur activation serait indépendante d'un processus de réponse humorale mais simplement le fait d'une reconnaissance directe des molécules du CMH du donneur. Cette hypothèse est accréditée par des données d'anatomopathologie ayant décrit la présence de nombreuses cellules Tfh au sein de l'infiltrat de rejet à médiation cellulaire (212,232).

Dans l'infiltrat des animaux traités par le CTLA4-Ig, nous avons montré une plus forte expression d'IL-21 alors que le nombre de Treg était moindre. Par ailleurs nous avons montré *in vitro* et *in vivo* qu'un blocage sélectif de CD28 contrôlait plus efficacement les cellules Tfh. Bien que nos données soient insuffisantes pour reconstituer l'ensemble du tableau, nous pouvons l'esquisser.

L'élément critique distinguant le FR104 du Belatacept pourrait être, avec ce dernier, un moins bon contrôle voir une exacerbation de l'activation des cellules Tfh allo réactives du fait du blocage des signaux intrinsèques inhibiteurs médiés par le CTLA-4. L'importante sécrétion d'IL-21 consécutive pourrait d'une part, renforcer la survie et les capacités effectrices d'autres

cellules T allo-réactives en particulier CD8⁺ (pouvant déjà être revigorées par le blocage de CTLA-4) et d'autre part, réduire l'induction d'iTreg (pouvant déjà être impactées par le blocage de CD28 alors que les fonctions suppressives des Treg pourrait l'être par le blocage de CTLA-4). L'ensemble de ces éléments aboutirait à un profond déséquilibre de la réponse immunitaire vers des mécanismes effecteurs au détriment des dispositifs de régulation, expliquant la survenue d'un rejet sévère (cf **Figure 12**).

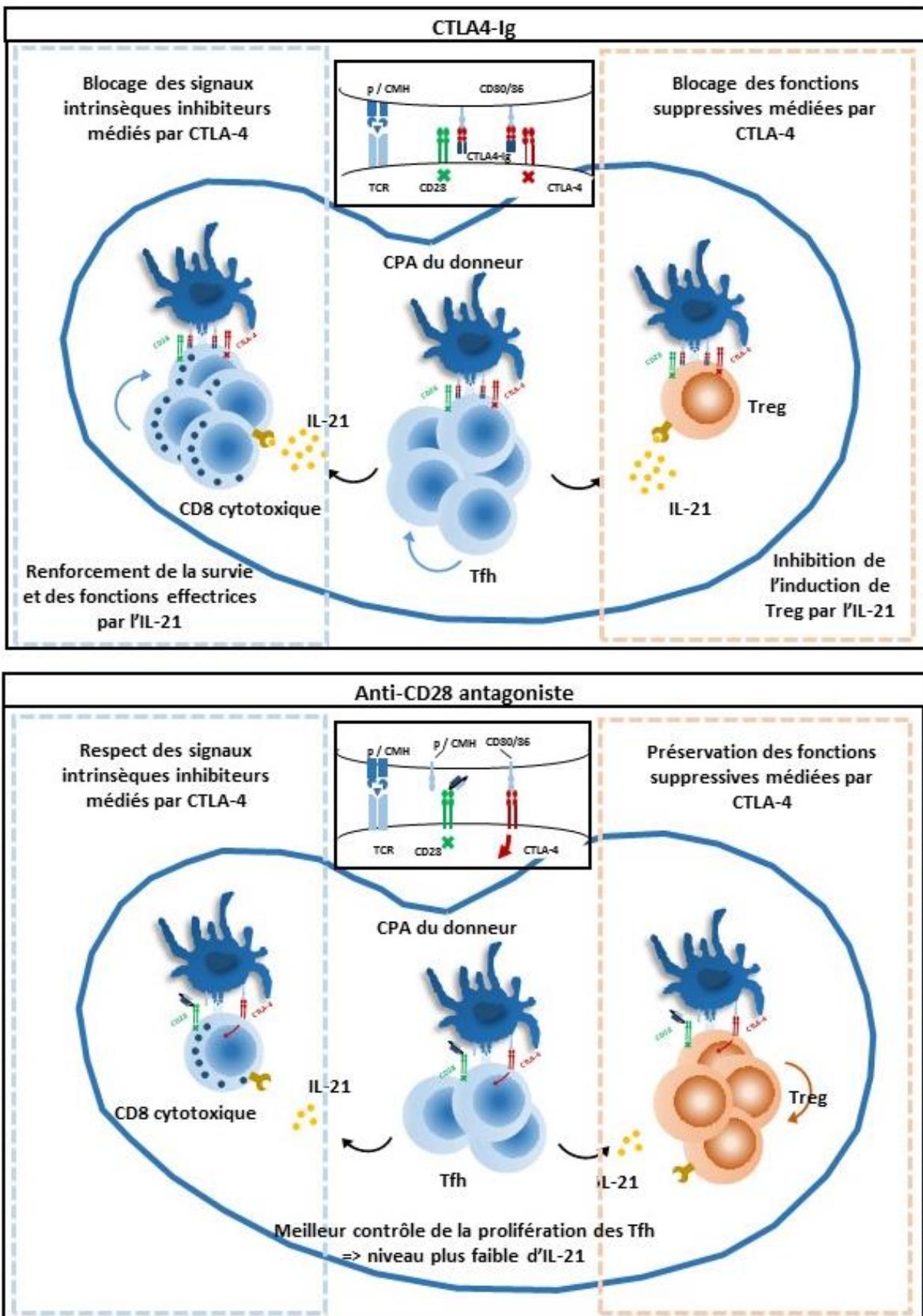


Figure 12 : Proposition d'explication de l'effet différentiel entre blocage sélectif et non sélectif de CD28.

Place du blocage de la triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4 dans la stratégie thérapeutique.

Le principal défaut du blocage de la triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4 serait donc « l'échappement » de cellules T effectrices / mémoires au blocage de CD28 en vertu du phénomène d'immunité hétérologue. Celui-ci survient du fait de l'interaction d'une cellule T expérimentée du receveur avec une CPA du donneur, en d'autre terme selon une reconnaissance directe. Si nous supposons que l'intensité de la stimulation antigénique durant une réponse allo-immune dépasse le seuil au-delà duquel les signaux de costimulation médiés par CD28 sont superflus, là encore cela passe par la reconnaissance directe.

A l'heure actuelle le principal écueil en transplantation rénale réside dans l'apparition d'une CAN dont la composante immunologique, le rejet chronique qui, contrairement au rejet aigu fortement dépendant de la reconnaissance directe, fait majoritairement intervenir la reconnaissance indirecte (5). Dans ce cas le seuil de CD28 « dépendance » est probablement plus physiologique. Le rejet chronique est dominé par le rejet humoral consécutif à la survenue d'allo-anticorps. Leur apparition est le fait de cellules B allo-réactives qui reçoivent l'aide des Tfh au sein de centres germinatifs. Il a été récemment démontré que cette interaction se fait sur le mode de la reconnaissance indirecte (233), c'est-à-dire, via la mise en œuvre d'une réponse Tfh primaire, dont on a vu qu'elle est fortement dépendante de CD28.

Les insuffisances du blocage de CD28 pourraient donc se restreindre à la période post-transplantation pendant laquelle la reconnaissance directe est dominante et s'estomper progressivement par la suite, en prévenant notamment l'apparition d'un rejet humoral, comme le suggère la très faible incidence d'immunisation sous Belatacept. Cela permettrait d'envisager une stratégie thérapeutique en deux temps (cf **Figure 13**)

- (1) une première phase associant un blocage de la costimulation avec une autre molécule immunosuppressive et/ou un traitement d'induction permettant de prévenir la survenue d'un rejet aigu, médié par des cellules mémoires / effectrices allo-réactives, via une reconnaissance directe.
- (2) une seconde phase avec un blocage de la costimulation en monothérapie ou en association avec de faible dose d'un autre immunosuppresseur, contrôlant efficacement le rejet chronique, permettant ainsi une épargne en CNI et donc de se prémunir de la composante non immunologique de la dysfonction chronique du greffon.

Comme nous l'avons vu le blocage sélectif de CD28, en comparaison du CTLA4-Ig, en préservant les signaux inhibiteurs médiés par CTLA-4 permettrait d'augmenter le seuil de dépendance à CD28 des cellules effectrices / mémoires allo-réactives et/ou d'éviter des phénomènes de levée d'exhaustion dans certaines populations T particulières, (cf **Figure 10**), ce qui diminuerait l'incidence des rejets observés sous Belatacept pendant la période post transplantation.

Ainsi, dans le cas de patients non immunisés, le blocage sélectif de CD28 pourrait conserver les atouts du Belatacept (absence de néphrotoxicité et efficacité du contrôle de la réponse humorale) tout en s'affranchissant de son principal défaut (le nombre élevé de rejet cellulaire sévère en post transplantation).

Les patients immunisés spécifiquement contre des molécules du CMH avant le greffe sont de plus en plus nombreux et présentent des rejets humoraux plus précoces et sévères. Dans ce cas la réponse humorale n'est plus une réponse primaire mais une réponse secondaire / mémoire, faisant intervenir des cellules B mémoires et certainement des Tfh mémoires. Dans ces situations le CTLA4-Ig n'est probablement pas une bonne molécule car nous avons vu que les Tfh une fois mature, deviennent indépendant de CD28 pour leur activation et que leur activation est régulée par des signaux inhibiteurs intrinsèques médiés par CTLA-4. En revanche le FR104 dont nous avons vu qu'il contrôle plus efficacement la prolifération des Tfh *in vitro* et une réponse Tfh secondaire *in vivo*, pourrait être intéressant dans ces situations, bien que des données expérimentales supplémentaires soient nécessaires pour le démontrer.

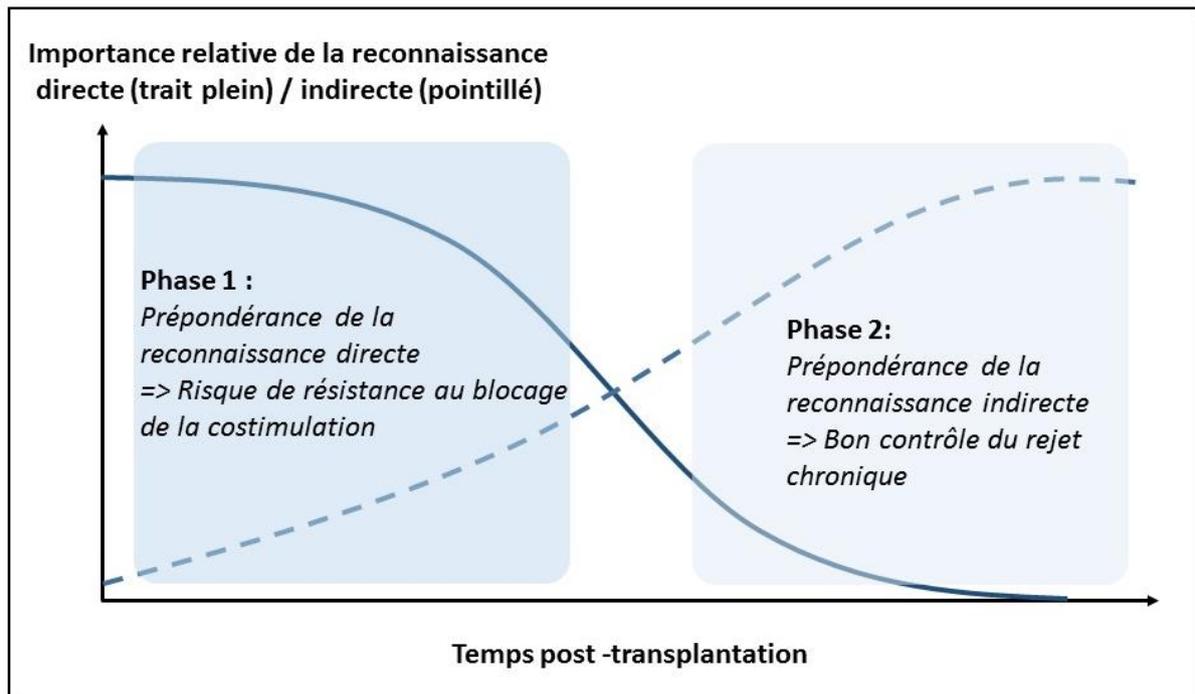


Figure 13 : différentes phases de la réponse allo-immune et blocage de la costimulation

CONCLUSIONS

Ces deux travaux sont l'aboutissement d'un long cheminement dont l'idée directrice a été de développer une molécule bloquant de façon sélective CD28 au sein de la triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4, dans le but d'améliorer les protocoles d'immunosuppression conventionnels qui bien qu'efficace ne s'affranchissent pas de la CAN. Cet objectif était particulièrement ardu du fait de l'antécédent malheureux de la phase I de l'anti-CD28 monoclonal TGN1412 qui a rendu méfiant l'ensemble de la communauté scientifique quant à la possibilité de cibler directement CD28.

La première étape a donc consisté, à faire la preuve *in vitro* de l'effet antagoniste d'un fragment monovalent d'anticorps anti-CD28 anti-humain, puis de confirmer son efficacité *in vitro* dans la prévention du rejet, dans un modèle pré-clinique de transplantation rénale chez le primate. Par la suite sans modifier son affinité pour CD28, une molécule dont la demi-vie est compatible avec son utilisation clinique, le FR104, a été développé et son efficacité confirmée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris humanisées qui a également permis de démontrer avant son injection à l'homme son absence d'effet agoniste.

La première partie de ce travail a permis de confirmer, dans un modèle pré-clinique, les propriétés pharmacocinétiques du FR104, et son efficacité d'une part pour prévenir le rejet (en particulier en association avec de faibles doses de CNI ou d'inhibiteurs du mTOR) et d'autre part pour empêcher la survenue d'allo-anticorps. Ces deux éléments font espérer un bénéfice pour la fonction rénale à long terme et plaident donc pour un transfert en clinique d'autant plus que depuis, sa première introduction chez l'homme dans le cadre d'un essai de phase I (actuellement en cours) a confirmé son absence d'effet agoniste.

L'histoire a voulu que le développement du CTLA4-Ig, dont nous avons vu que l'utilisation pour bloquer CD28 devance la découverte de la fonction de CTLA-4, précède celui d'un antagoniste sélectif de CD28. Dans la seconde partie de cette thèse nous avons comparé directement ces deux stratégies. Au-delà de son intérêt scientifique, cette comparaison était indispensable pour envisager la poursuite du développement clinique du FR104 dans un contexte où le développement d'une nouvelle molécule (en particulier dans cette indication) constitue un investissement majeur qui doit pouvoir se justifier par l'attente d'une plus-value.

Le blocage sélectif de CD28 a l'avantage théorique d'épargner la voie CTLA-4. Mais jusqu'à présent, la démonstration de sa supériorité sur le CTLA4-Ig reposait uniquement sur des arguments indirects : la préservation des fonctions intrinsèques et extrinsèques du CTLA-4 *in vitro*, l'induction de Treg *in vivo*, et des comparaisons avec le CTLA4-Ig dans des modèles murins ou de souris humanisées.

Dans un modèle préclinique de transplantation chez le primate, imaginé pour mettre en évidence une différence, nous avons ainsi pu montrer directement la supériorité d'un blocage sélectif de CD28 avec le FR104 sur le CTLA4-Ig. Cette molécule pourrait constituer à court terme la prochaine génération d'agent bloquant la costimulation.

Au-delà des données de rejet / survie, cette comparaison nous a permis d'explorer les caractéristiques de la réponse allo-immune selon la modalité du blocage de la triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une quantité significativement plus importante de lymphocytes T régulateurs dans l'infiltrat des biopsies protocolaires à 1 mois dans le groupe des animaux traités par le FR104 alors que les transcrits de l'IL-21 étaient supérieurs dans les biopsies des animaux traités par le CTLA4-Ig. Ainsi, bien que cela demande à être confirmé, le fondement de l'effet différentiel entre le blocage sélectif de CD28 et celui de CD80/86 pourrait être un moins bon contrôle de l'activation des lymphocytes T_{fh} allo-réactifs avec le Belatacept à l'origine d'un équilibre différent entre lymphocytes T effecteurs et régulateurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later—progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2761–6.
2. Powis S, Geraghty D. What is the MHC? *Immunol Today*. 1995;16(10):466–8.
3. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol*. 2004 Oct;16(5):550–7.
4. Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol*. 2007 Dec;7(12):942–53.
5. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition Pathways in Transplant Rejection and Tolerance: *Transplant J*. 2013 Oct;96(8):681–8.
6. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, Dejelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN- γ -producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol*. 1999;163(4):2267–75.
7. Macedo C, Orkis EA, Popescu I, Elinoff BD, Zeevi A, Shapiro R, et al. Contribution of Naïve and Memory T-Cell Populations to the Human Alloimmune Response. *Am J Transplant*. 2009 Sep;9(9):2057–66.
8. Matzinger P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*. 2002 Apr 12;296(5566):301–5.
9. Chong AS, Alegre M-L. The impact of infection and tissue damage in solid-organ transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2012 May 25;12(6):459–71.
10. Leventhal JS, Schröppel B. Toll-like receptors in transplantation: sensing and reacting to injury. *Kidney Int*. 2012;81(9):826–32.
11. Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG. Impact of Innate and Adaptive Immunity on Rejection and Tolerance. *Transplantation*. 2008 Oct;86(7):889–94.
12. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y. Immunologic “ignorance” of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med*. 2000;6(6):686–8.
13. Zhou P, Hwang KW, Palucki D, Kim O, Newell KA, Fu Y-X, et al. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *Am J Transplant*. 2003;3(3):259–66.
14. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2715–29.
15. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr;27(1):591–619.
16. Lafferty KJ, Jones MA. Reactions of the graft versus host (GVH) type. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1969 Feb;47(1):17–54.

17. Lafferty KJ, Misko IS, Cooley MA. Allogeneic stimulation modulates the in vitro response of T cells to transplantation antigen. *Nature*. 1974 May 17;249(454):275–6.
18. Baxter MA, Jones BD. Two-Component Regulators Control *hila* Expression by Controlling *fimZ* and *hile* Expression within *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Bäumler AJ, editor. *Infect Immun*. 2015 Mar;83(3):978–85.
19. Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Immunity*. 2011 Apr;34(4):466–78.
20. Matz M, Beyer J, Wunsch D, Mashreghi MF, Seiler M, Pratschke J, et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short-and long-term graft function. *Kidney Int*. 2006;69(9):1683–90.
21. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005 Dec;6(12):1182–90.
22. Halloran PF. T Cell-mediated Rejection of Kidney Transplants: A Personal Viewpoint. *Am J Transplant*. 2010 May;10(5):1126–34.
23. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int*. 2012;81(7):628–39.
24. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep 20;5(10):807–17.
25. Tarlinton DM, Batista F, Smith KGC. The B-Cell Response to Protein Antigens in Immunity and Transplantation: Transplantation. 2008 Jun;85(12):1698–704.
26. Hirohashi T, Chase CM, Della Pelle P, Sebastian D, Alessandrini A, Madsen JC, et al. A Novel Pathway of Chronic Allograft Rejection Mediated by NK Cells and Alloantibody: NK Cells in Antibody-Mediated Transplant Arteriopathy. *Am J Transplant*. 2012 Feb;12(2):313–21.
27. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, et al. Four Stages and Lack of Stable Accommodation in Chronic Alloantibody-Mediated Renal Allograft Rejection in Cynomolgus Monkeys. *Am J Transplant*. 2008 Aug;8(8):1662–72.
28. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jul;87(13):5031–5.
29. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature*. 1987 Jul 16;328(6127):267–70.
30. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991 Sep 1;174(3):561–9.
31. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985–8.
32. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*. 1996;273(5271):104–6.

33. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):12–26.
34. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013 Apr;13(4):227–42.
35. Butte MJ, Peña-Cruz V, Kim M-J, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol.* 2008 Aug;45(13):3567–72.
36. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity.* 2007 Jul;27(1):111–22.
37. Paterson AM, Brown KE, Keir ME, Vanguri VK, Riella LV, Chandraker A, et al. The programmed death-1 ligand 1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011 Aug 1;187(3):1097–105.
38. Yao S, Zhu Y, Zhu G, Augustine M, Zheng L, Goode DJ, et al. B7-H2 Is a Costimulatory Ligand for CD28 in Human. *Immunity.* 2011 May;34(5):729–40.
39. Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, et al. Functional Anatomy of T Cell Activation and Synapse Formation. *Annu Rev Immunol.* 2010 Mar;28(1):79–105.
40. Pagès F, Ragueneau M, Rottapel R, Truneh A, Nunes J, Imbert J, et al. Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature.* 1994 May 26;369(6478):327–9.
41. Zanin-Zhorov A, Dustin ML, Blazar BR. PKC- θ function at the immunological synapse: prospects for therapeutic targeting. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32(8):358–63.
42. Yokosuka T, Kobayashi W, Sakata-Sogawa K, Takamatsu M, Hashimoto-Tane A, Dustin ML, et al. Spatiotemporal Regulation of T Cell Costimulation by TCR-CD28 Microclusters and Protein Kinase C θ Translocation. *Immunity.* 2008 Oct;29(4):589–601.
43. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal Basis of CTLA-4 Costimulatory Molecule-Mediated Negative Regulation of T Cell Activation. *Immunity.* 2010 Sep;33(3):326–39.
44. Schneider H. Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science.* 2006 Sep 29;313(5795):1972–5.
45. Lu Y, Schneider H, Rudd CE. Murine regulatory T cells differ from conventional T cells in resisting the CTLA-4 reversal of TCR stop-signal. *Blood.* 2012 Oct 9;120(23):4560–70.
46. Metlay JP, Puré E, Steinman RM. Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J Exp Med.* 1989;169(1):239–54.
47. Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1994 Mar 15;152(6):2675–85.

48. Suresh M, Whitmire JK, Harrington LE, Larsen CP, Pearson TC, Altman JD, et al. Role of CD28-B7 Interactions in Generation and Maintenance of CD8 T Cell Memory. *J Immunol*. 2001 Nov 15;167(10):5565–73.
49. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993;261(5121):609–12.
50. Zammit DJ, Cauley LS, Pham Q-M, Lefrançois L. Dendritic Cells Maximize the Memory CD8 T Cell Response to Infection. *Immunity*. 2005 May;22(5):561–70.
51. Belz GT, Wilson NS, Smith CM, Mount AM, Carbone FR, Heath WR. Bone marrow-derived cells expand memory CD8+ T cells in response to viral infections of the lung and skin. *Eur J Immunol*. 2006;36(2):327–35.
52. Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Goffe BS, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest*. 1999 May 1;103(9):1243–52.
53. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med*. 2003;349(20):1907–15.
54. Ndejemi MP, Teijaro JR, Patke DS, Bingaman AW, Chandok MR, Azimzadeh A, et al. Control of Memory CD4 T Cell Recall by the CD28/B7 Costimulatory Pathway. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7698–706.
55. Borowski AB, Boesteanu AC, Mueller YM, Carafides C, Topham DJ, Altman JD, et al. Memory CD8+ T Cells Require CD28 Costimulation. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):6494–503.
56. Eberlein J, Davenport B, Nguyen TT, Victorino F, Sparwasser T, Homann D. Multiple Layers of CD80/86-Dependent Costimulatory Activity Regulate Primary, Memory, and Secondary Lymphocytic Choriomeningitis Virus-Specific T Cell Immunity. *J Virol*. 2012 Feb 15;86(4):1955–70.
57. Ndlovu H, Darby M, Froelich M, Horsnell W, Lühder F, Hünig T, et al. Inducible Deletion of CD28 Prior to Secondary *Nippostrongylus brasiliensis* Infection Impairs Worm Expulsion and Recall of Protective Memory CD4+ T Cell Responses. Loke P, editor. *PLoS Pathog*. 2014 Feb 6;10(2):e1003906.
58. Linterman MA, Rigby RJ, Wong R, Silva D, Withers D, Anderson G, et al. Roquin Differentiates the Specialized Functions of Duplicated T Cell Costimulatory Receptor Genes *Cd28* and *Icos*. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):228–41.
59. Walker LSK, Wiggett HE, Gaspal FMC, Raykundalia CR, Goodall MD, Toellner K-M, et al. Established T Cell-Driven Germinal Center B Cell Proliferation Is Independent of CD28 Signaling but Is Tightly Regulated Through CTLA-4. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):91–8.
60. Hansen JD, Du Pasquier L, Lefranc M-P, Lopez V, Benmansour A, Boudinot P. The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Mol Immunol*. 2009 Jan;46(3):457–72.

61. Bernard D, Hansen JD, Du Pasquier L, Lefranc M-P, Benmansour A, Boudinot P. Costimulatory receptors in jawed vertebrates: conserved CD28, odd CTLA4 and multiple BTLAs. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(3):255–71.
62. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 2008 May;133(5):775–87.
63. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4⁺-CD25⁺ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431–40.
64. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, et al. Cutting Edge: CD28 Controls Peripheral Homeostasis of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3348–52.
65. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*. 2005 Feb;6(2):152–62.
66. Zhang R, Huynh A, Whitcher G, Chang J, Maltzman JS, Turka LA. An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest* [Internet]. 2013 Jan 2 [cited 2015 Jul 22]; Available from: <http://www.jci.org/articles/view/65013>
67. Gogishvili T, Lühder F, Goebbels S, Beer-Hammer S, Pfeffer K, Hünig T. Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *Eur J Immunol*. 2013 Jan;43(1):188–93.
68. Ito T, Hanabuchi S, Wang Y-H, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*. 2008 Jun;28(6):870–80.
69. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490–500.
70. Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:733–58.
71. Guo F, Iclozan C, Suh W-K, Anasetti C, Yu X-Z. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Aug 15;181(4):2285–91.
72. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*. 2007 Aug 6;204(8):1765–74.
73. Semple K, Nguyen A, Yu Y, Wang H, Anasetti C, Yu X-Z. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3096–103.
74. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Apr 1;184(7):3433–41.
75. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and Differences. *Immunol Rev*. 2014 May;259(1):88–102.

76. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One*. 2011;6(8):e24226.
77. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Mar 1;190(5):2001–8.
78. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405–13.
79. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271–5.
80. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med*. 1998 Nov 16;188(10):1849–57.
81. Oida T, Xu L, Weiner HL, Kitani A, Strober W. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Aug 15;177(4):2331–9.
82. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1206–12.
83. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1097–101.
84. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363–72.
85. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 2000 Jun;30(6):1538–43.
86. Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):505–11.
87. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600–3.
88. Wing JB, Ise W, Kurosaki T, Sakaguchi S. Regulatory T cells control antigen-specific expansion of Tfh cell number and humoral immune responses via the coreceptor CTLA-4. *Immunity*. 2014 Dec 18;41(6):1013–25.
89. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity*. 2014 Dec;41(6):1026–39.
90. Wang CJ, Heuts F, Ovcinnikovs V, Wardzinski L, Bowers C, Schmidt EM, et al. CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jan 13;112(2):524–9.

91. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
92. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 15;100(8):4712–7.
93. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–23.
94. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*. 2009 Aug 3;206(8):1717–25.
95. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol Res*. 2013 Jul 1;1(1):32–42.
96. Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, et al. Activating Fc receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*. 2013 Aug 26;210(9):1685–93.
97. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*. 2013 Aug 26;210(9):1695–710.
98. Chen H, Liakou CI, Kamat A, Pettaway C, Ward JF, Tang DN, et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ ICOS^{hi} T cell frequency and IFN- γ levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(8):2729–34.
99. Huang RR, Jalil J, Economou JS, Chmielowski B, Koya RC, Mok S, et al. CTLA4 Blockade Induces Frequent Tumor Infiltration by Activated Lymphocytes Regardless of Clinical Responses in Humans. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 15;17(12):4101–9.
100. Kvistborg P, Philips D, Kelderman S, Hageman L, Ottensmeier C, Joseph-Pietras D, et al. Anti-CTLA-4 therapy broadens the melanoma-reactive CD8⁺ T cell response. *Sci Transl Med*. 2014;6(254):254ra128–254ra128.
101. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med*. 2014;6(238):238ra70–238ra70.
102. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Noguchi T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. 2014 Nov 26;515(7528):577–81.
103. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature*. 2015 Mar 9;520(7547):373–7.
104. Ying H, Yang L, Qiao G, Li Z, Zhang L, Yin F, et al. Cutting Edge: CTLA-4-B7 Interaction Suppresses Th17 Cell Differentiation. *J Immunol*. 2010 Aug 1;185(3):1375–8.

105. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei R-Q, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89(22):11102–5.
106. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. *Science.* 1992 Aug 7;257(5071):789–92.
107. Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med.* 1998 Jun 18;338(25):1813–21.
108. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(16):8789–94.
109. Levisetti MG, Padrid PA, Szot GL, Mittal N, Meehan SM, Wardrip CL, et al. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. *J Immunol.* 1997;159(11):5187–91.
110. Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A, Batty DS, Berning JD, Colonna JO, et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for cd80 and cd86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates¹. *Transplantation.* 2001;72(3):377–84.
111. Bîrsan T, Hausen B, Higgins JP, Hubble RW, Klupp J, Stalder M, et al. Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation.* 2003 Jun 27;75(12):2106–13.
112. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005 Mar;5(3):443–53.
113. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blancho G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2005;353(8):770–81.
114. Vincenti F, Blancho G, Durrbach A, Friend P, Grinyo J, Halloran PF, et al. Five-Year Safety and Efficacy of Belatacept in Renal Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Sep 1;21(9):1587–96.
115. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, et al. A Phase III Study of Belatacept-based Immunosuppression Regimens versus Cyclosporine in Renal Transplant Recipients (BENEFIT Study). *Am J Transplant.* 2010 Mar;10(3):535–46.
116. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J, et al. A Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Kidney Transplants from Extended Criteria Donors (BENEFIT-EXT Study). *Am J Transplant.* 2010 Mar;10(3):547–57.
117. Medina Pestana JO, Grinyo JM, Vanrenterghem Y, Becker T, Campistol JM, Florman S, et al. Three-Year Outcomes From BENEFIT-EXT: A Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys: Three-Year Outcomes From BENEFIT-EXT. *Am J Transplant.* 2012 Mar;12(3):630–9.
118. Charpentier B, Medina Pestana JO, del C. Rial M, Rostaing L, Grinyó J, Vanrenterghem Y, et al. Long-Term Exposure to Belatacept in Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys: BENEFIT-EXT Long-Term Extension. *Am J Transplant.* 2013 Nov;13(11):2884–91.

119. Vitalone MJ, Ganguly B, Hsieh S, Latek R, Kulbokas EJ, Townsend R, et al. Transcriptional Profiling of Belatacept and Calcineurin Inhibitor Therapy in Renal Allograft Recipients: Belatacept: Transcriptional Analysis. *Am J Transplant*. 2014 Aug;14(8):1912–21.
120. Rostaing L, Vincenti F, Grinyó J, Rice KM, Bresnahan B, Steinberg S, et al. Long-Term Belatacept Exposure Maintains Efficacy and Safety at 5 Years: Results From the Long-Term Extension of the BENEFIT Study: BENEFIT Long-Term Extension. *Am J Transplant*. 2013 Nov;13(11):2875–83.
121. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, Hong JJ, Farris AB, Iwakoshi NN, et al. Costimulation Blockade Alters Germinal Center Responses and Prevents Antibody-Mediated Rejection: Costimulation Blockade Alters GC Response. *Am J Transplant*. 2014 Jan;14(1):59–69.
122. Vanrenterghem Y, Bresnahan B, Campistol J, Durrbach A, Grinyó J, Neumayer H-H, et al. Belatacept-Based Regimens Are Associated With Improved Cardiovascular and Metabolic Risk Factors Compared With Cyclosporine in Kidney Transplant Recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT Studies): Transplantation. 2011 May;91(9):976–83.
123. Rostaing L, Neumayer HH, Reyes-Acevedo R, Bresnahan B, Florman S, Vitko S, et al. Belatacept-versus Cyclosporine-Based Immunosuppression in Renal Transplant Recipients with Pre-existing Diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Nov 1;6(11):2696–704.
124. Wéclawiak H, Kamar N, Ould-Mohamed A, Cardeau-Desangles I, Rostaing L. Rationale for Using Belatacept in Combination With Sirolimus. *Transplant Proc*. 2010 Nov;42(9):S29–31.
125. Ferguson R, Grinyó J, Vincenti F, Kaufman DB, Woodle ES, Marder BA, et al. Immunosuppression with Belatacept-Based, Corticosteroid-Avoiding Regimens in De Novo Kidney Transplant Recipients: Belatacept in CNI- and Steroid-Avoiding Regimens. *Am J Transplant*. 2011 Jan;11(1):66–76.
126. Kirk AD, Guasch A, Xu H, Cheeseman J, Mead SI, Ghali A, et al. Renal Transplantation Using Belatacept Without Maintenance Steroids or Calcineurin Inhibitors: Alemtuzumab, Belatacept and Sirolimus. *Am J Transplant*. 2014 May;14(5):1142–51.
127. Rostaing L, Massari P, Garcia VD, Mancilla-Urrea E, Nainan G, Rial M d. C, et al. Switching from Calcineurin Inhibitor-based Regimens to a Belatacept-based Regimen in Renal Transplant Recipients: A Randomized Phase II Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Feb 1;6(2):430–9.
128. Grinyo J, Alberu J, Contieri FLC, Manfro RC, Mondragon G, Nainan G, et al. Improvement in renal function in kidney transplant recipients switched from cyclosporine or tacrolimus to belatacept: 2-year results from the long-term extension of a phase II study: Long-term results from belatacept switch study. *Transpl Int*. 2012 Oct;25(10):1059–64.
129. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med*. 2008 Jan;14(1):88–92.
130. Charbonnier L-M, Vokaer B, Lemaître PH, Field KA, Leo O, Le Moine A. CTLA4-Ig Restores Rejection of MHC Class-II Mismatched Allografts by Disabling IL-2-Expanded Regulatory T Cells: CTLA4-Ig Prevents Treg-Mediated Suppression. *Am J Transplant*. 2012 Sep;12(9):2313–21.
131. Riella LV, Liu T, Yang J, Chock S, Shimizu T, Mfarrej B, et al. Deleterious Effect of CTLA4-Ig on a Treg-Dependent Transplant Model: Deleterious Effect of CTLA4-Ig on Tregs. *Am J Transplant*. 2012 Apr;12(4):846–55.

132. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, Laszik ZG, Putnam A, Belingheri M, et al. The Effect of Costimulatory and Interleukin 2 Receptor Blockade on Regulatory T Cells in Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2008 Oct;8(10):2086–96.
133. Chavez H, Beaudreuil S, Abbed K, Taoufic Y, Kriaa F, Charpentier B, et al. Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28–CD80/86 blockade. *Transpl Immunol*. 2007 Jun;17(4):243–8.
134. Grimbert P, Audard V, Diet C, Matignon M, Plonquet A, Mansour H, et al. T-cell phenotype in protocol renal biopsy from transplant recipients treated with belatacept-mediated co-stimulatory blockade. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Mar 1;26(3):1087–93.
135. Zuber J, Grimbert P, Blancho G, Thaunat O, Durrbach A, Baron C, et al. Prognostic significance of graft Foxp3 expression in renal transplant recipients: a critical review and attempt to reconcile discrepancies. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2012 Dec 21;
136. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007 Apr;19(4):345–54.
137. Toker A, Huehn J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Sci Signal*. 2011;4(158):pe4.
138. Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37(9):2378–89.
139. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*. 2012 Nov 16;37(5):785–99.
140. Huehn J, Floess S, Ohkura N, Sakaguchi S. Comment on “cutting edge: epigenetic regulation of Foxp3 defines a stable population of CD4+ regulatory T cells in tumors from mice and humans.” *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Apr 15;194(8):3533.
141. Wieczorek G, Asemussen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V, et al. Quantitative DNA Methylation Analysis of FOXP3 as a New Method for Counting Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Solid Tissue. *Cancer Res*. 2009 Jan 15;69(2):599–608.
142. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, et al. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2008 Oct;19(10):2020–6.
143. Welsh RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Jun;2(6):417–26.
144. Burrows SR, Khanna R, Burrows JM, Moss DJ. An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 1994;179(4):1155–61.

145. Brehm MA, Markees TG, Daniels KA, Greiner DL, Rossini AA, Welsh RM. Direct Visualization of Cross-Reactive Effector and Memory Allo-Specific CD8 T Cells Generated in Response to Viral Infections. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4077–86.
146. Macdonald WA, Chen Z, Gras S, Archbold JK, Tynan FE, Clements CS, et al. T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry. *Immunity*. 2009 Dec;31(6):897–908.
147. Amir AL, D’Orsogna LJA, Roelen DL, van Loenen MM, Hagedoorn RS, de Boer R, et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3146–57.
148. Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A. T Cells Primed by *Leishmania major* Infection Cross-React with Alloantigens and Alter the Course of Allograft Rejection. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3686–93.
149. Valujskikh A, Pantenburg B, Heeger PS. Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *Am J Transplant*. 2002;2(6):501–9.
150. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest*. 2003 Jun 15;111(12):1887–95.
151. Nadazdin O, Boskovic S, Murakami T, Tocco G, Smith R-N, Colvin RB, et al. Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 2011;3(86):86ra51–86ra51.
152. Chalasani G, Dai Z, Konieczny BT, Baddoura FK, Lakkis FG. Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(9):6175–80.
153. Stapler D, Lee ED, Selvaraj SA, Evans AG, Kean LS, Speck SH, et al. Expansion of Effector Memory TCR V 4+CD8+ T Cells Is Associated with Latent Infection-Mediated Resistance to Transplantation Tolerance. *J Immunol*. 2008 Mar 1;180(5):3190–200.
154. Floyd TL, Koehn BH, Kitchens WH, Robertson JM, Cheeseman JA, Stempora L, et al. Limiting the Amount and Duration of Antigen Exposure during Priming Increases Memory T Cell Requirement for Costimulation during Recall. *J Immunol*. 2011 Feb 15;186(4):2033–41.
155. Xu H, Perez SD, Cheeseman J, Mehta AK, Kirk AD. The Allo- and Viral-Specific Immunosuppressive Effect of Belatacept, but Not Tacrolimus, Attenuates With Progressive T Cell Maturation: Belatacept Efficacy and T Cell Maturation. *Am J Transplant*. 2014 Feb;14(2):319–32.
156. Traitanon O, Gorbachev A, Bechtel JJ, Keslar KS, Baldwin WM, Poggio ED, et al. IL-15 Induces Alloreactive CD28⁻ Memory CD8 T Cell Proliferation and CTLA4-Ig Resistant Memory CD8 T Cell Activation: Alloreactive CD28⁻ Memory T Cell Activation. *Am J Transplant*. 2014 Jun;14(6):1277–89.
157. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 Negative T Cells: Is Their Loss Our Gain?: CD28 Negative T Cells. *Am J Transplant*. 2014 Nov;14(11):2460–6.
158. Weng N, Akbar AN, Goronzy J. CD28⁻ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol*. 2009 Jul;30(7):306–12.

159. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev.* 2005;205(1):158–69.
160. Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NH. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2011;80(2):208–17.
161. Crepin T, Carron C, Roubiou C, Gaugler B, Gaiffe E, Simula-Faivre D, et al. ATG-Induced Accelerated Immune Senescence: Clinical Implications in Renal Transplant Recipients: ATG and Immune Senescence in Transplanted Patients. *Am J Transplant.* 2015 Apr;15(4):1028–38.
162. Nanji SA, Hancock WW, Anderson CC, Adams AB, Luo B, Schur CD, et al. Multiple combination therapies involving blockade of ICOS/B7RP-1 costimulation facilitate long-term islet allograft survival. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2004 Apr;4(4):526–36.
163. Kosuge H, Suzuki J-I, Gotoh R, Koga N, Ito H, Isobe M, et al. Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation.* 2003 Apr 27;75(8):1374–9.
164. Salama AD, Yuan X, Nayer A, Chandraker A, Inobe M, Uede T, et al. Interaction between ICOS-B7RP1 and B7-CD28 costimulatory pathways in alloimmune responses in vivo. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2003 Apr;3(4):390–5.
165. Lo DJ, Anderson DJ, Song M, Leopardi F, Farris AB, Strobert E, et al. A pilot trial targeting the ICOS-ICOS-L pathway in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2015 Apr;15(4):984–92.
166. Setoguchi K, Schenk AD, Ishii D, Hattori Y, Baldwin WM, Tanabe K, et al. LFA-1 Antagonism Inhibits Early Infiltration of Endogenous Memory CD8 T Cells into Cardiac Allografts and Donor-Reactive T Cell Priming: Memory CD8 T Cells Use LFA-1 To Infiltrate Heart Allografts. *Am J Transplant.* 2011 May;11(5):923–35.
167. Kitchens WH, Haridas D, Wagener ME, Song M, Ford ML. Combined Costimulatory and Leukocyte Functional Antigen-1 Blockade Prevents Transplant Rejection Mediated by Heterologous Immune Memory Alloresponses: *Transplant J.* 2012 May;93(10):997–1005.
168. Badell IR, Russell MC, Thompson PW, Turner AP, Weaver TA, Robertson JM, et al. LFA-1–specific therapy prolongs allograft survival in rhesus macaques. *J Clin Invest.* 2010 Dec 1;120(12):4520–31.
169. Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP, et al. Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol.* 2009 Aug;10(8):816–24.
170. Weaver TA, Charafeddine AH, Agarwal A, Turner AP, Russell M, Leopardi FV, et al. Alefacept promotes co-stimulation blockade based allograft survival in nonhuman primates. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):746–9.
171. Lowe MC, Badell IR, Turner AP, Thompson PW, Leopardi FV, Strobert EA, et al. Belatacept and sirolimus prolong nonhuman primate islet allograft survival: adverse consequences of concomitant alefacept therapy. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2013 Feb;13(2):312–9.

172. Lo DJ, Anderson DJ, Weaver TA, Leopardi F, Song M, Farris AB, et al. Belatacept and Sirolimus Prolong Nonhuman Primate Renal Allograft Survival Without a Requirement for Memory T Cell Depletion: Belatacept in Nonhuman Primate Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2013 Feb;13(2):320–8.
173. Rostaing L, Charpentier B, Glyda M, Rigotti P, Hettich F, Franks B, et al. Alefacept combined with tacrolimus, mycophenolate mofetil and steroids in de novo kidney transplantation: a randomized controlled trial. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013 Jul;13(7):1724–33.
174. Burrell BE, Bishop DK. Th17 cells and transplant acceptance. *Transplantation*. 2010 Nov 15;90(9):945–8.
175. Krummey SM, Floyd TL, Liu D, Wagener ME, Song M, Ford ML. Candida-Elicited Murine Th17 Cells Express High CTLA-4 Compared with Th1 Cells and Are Resistant to Costimulation Blockade. *J Immunol*. 2014 Mar 1;192(5):2495–504.
176. Krummey SM, Cheeseman JA, Conger JA, Jang PS, Mehta AK, Kirk AD, et al. High CTLA-4 Expression on Th17 Cells Results in Increased Sensitivity to CTLA-4 Coinhibition and Resistance to Belatacept: Th17 Cells Have High CTLA-4 Expression. *Am J Transplant*. 2014 Mar;14(3):607–14.
177. Poirier N, Blancho G, Vanhove B. CD28-Specific Immunomodulating Antibodies: What Can Be Learned From Experimental Models? *Am J Transplant*. 2012 Jul;12(7):1682–90.
178. Poirier N, Blancho G, Vanhove B. A more selective costimulatory blockade of the CD28-B7 pathway. *Transpl Int*. 2011 Jan;24(1):2–11.
179. Lin C-H, Hünig T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol*. 2003 Mar;33(3):626–38.
180. Azuma H, Isaka Y, Li X, Hünig T, Sakamoto T, Nohmi H, et al. Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2008 Oct;8(10):2004–14.
181. Takabatake Y, Li X-K, Mizui M, Miyasato K, Matsui I, Kawada N, et al. A superagonistic monoclonal antibody for CD28 ameliorates crescentic glomerulonephritis in wistar-kyoto rats. *Mol Med Camb Mass*. 2011;17(7-8):686–96.
182. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med*. 2006;355(10):1018–28.
183. Nguyen DH, Hurtado-Ziola N, Gagneux P, Varki A. Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 16;103(20):7765–70.
184. Shiao SL, McNiff JM, Masunaga T, Tamura K, Kubo K, Pober JS. Immunomodulatory Properties of FK734, a Humanized Anti-CD28 Monoclonal Antibody With Agonistic and Antagonistic Activities: Transplantation. 2007 Feb;83(3):304–13.
185. Yu X-Z, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-Specific Antibody Prevents Graft-Versus-Host Disease in Mice. *J Immunol*. 2000 May 1;164(9):4564–8.

186. Yu X-Z, Albert MH, Martin PJ, Anasetti C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN- γ -dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest*. 2004 Jun 1;113(11):1624–30.
187. Dengler TJ, Szabo G, Sido B, Nottmeyer W, Zimmerman R, Vahl CF, et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation*. 1999 Feb 15;67(3):392–8.
188. Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ, Dong VM, Beato F, Taal M, et al. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(2):519–27.
189. Haspot F, Seveno C, Dugast A-S, Coulon F, Renaudin K, Usal C, et al. Anti-CD28 Antibody-Induced Kidney Allograft Tolerance Related to Tryptophan Degradation and TCR- Class II- B7+ Regulatory Cells. *Am J Transplant*. 2005 Oct;5(10):2339–48.
190. Tan P, Anasetti C, Hansen JA, Melrose J, Brunvand M, Bradshaw J, et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):165–73.
191. 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 Baltim Md 1950*. 1999 Aug 1;163(3):1704–10.
192. Vanhove B. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv- 1-antitrypsin fusion antibody. *Blood*. 2003 Mar 13;102(2):564–70.
193. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-Dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation. *Sci Transl Med*. 2010 Feb 3;2(17):17ra10–7ra10.
194. Hugues S, Fetler L, Bonifaz L, Helft J, Amblard F, Amigorena S. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol*. 2004 Dec;5(12):1235–42.
195. Zhang T, Fresnay S, Welty E, Sangrampurkar N, Rybak E, Zhou H, et al. Selective CD28 Blockade Attenuates Acute and Chronic Rejection of Murine Cardiac Allografts in a CTLA-4-Dependent Manner: Selective CD28 Blockade Requires CTLA-4. *Am J Transplant*. 2011 Aug;11(8):1599–609.
196. Poirier N, Mary C, Dilek N, Hervouet J, Minault D, Blancho G, et al. Preclinical Efficacy and Immunological Safety of FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody: Preclinical Efficacy and Safety of FR104. *Am J Transplant*. 2012 Oct;12(10):2630–40.
197. Liu D, Krummey SM, Badell IR, Wagener M, Schneeweis LA, Stetsko DK, et al. 2B4 (CD244) induced by selective CD28 blockade functionally regulates allograft-specific CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2014 Feb 10;211(2):297–311.
198. Liu D, Suchard SJ, Nadler SG, Ford ML. Inhibition of Donor-Reactive CD8+ T Cell Responses by Selective CD28 Blockade Is Independent of Reduced ICOS Expression. *PloS One*. 2015;10(6):e0130490.
199. Suchard SJ, Davis PM, Kansal S, Stetsko DK, Brosius R, Tamura J, et al. A Monovalent Anti-Human CD28 Domain Antibody Antagonist: Preclinical Efficacy and Safety. *J Immunol*. 2013 Nov 1;191(9):4599–610.

200. Tillou X, Poirier N, Le Bas-Bernardet S, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, et al. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. *Kidney Int.* 2010;78(2):152–9.
201. Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol.* 2011 Nov 25;11(12):852–63.
202. Krummey SM, Ford ML. Braking Bad: Novel Mechanisms of CTLA-4 Inhibition of T Cell Responses: An Updated Model of CTLA-4 Coinhibition. *Am J Transplant.* 2014 Dec;14(12):2685–90.
203. Schneider H. Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science.* 2006 Sep 29;313(5795):1972–5.
204. Dilek N, Poirier N, Hulin P, Coulon F, Mary C, Ville S, et al. Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 Costimulation Differentially Controls Immune Synapses and Function of Human Regulatory and Conventional T-Cells. Freitas AA, editor. *PLoS ONE.* 2013 Dec 23;8(12):e83139.
205. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions: Banff 2013 Meeting Report. *Am J Transplant.* 2014 Feb;14(2):272–83.
206. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1241–53.
207. Bentebibel S-E, Schmitt N, Banchereau J, Ueno H. Human tonsil B-cell lymphoma 6 (BCL6)-expressing CD4+ T-cell subset specialized for B-cell help outside germinal centers. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Aug 16;108(33):E488–97.
208. Poirier N, Dilek N, Mary C, Ville S, Coulon F, Branchereau J, et al. FR104, an Antagonist Anti-CD28 Monovalent Fab' Antibody, Prevents Alloimmunization and Allows Calcineurin Inhibitor Minimization in Nonhuman Primate Renal Allograft: FR104 Prevents Allograft Rejection. *Am J Transplant.* 2015 Jan;15(1):88–100.
209. Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3+ conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2378–89.
210. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007;5(2):e38.
211. Selin LK, Brehm MA. Frontiers in Nephrology: Heterologous Immunity, T Cell Cross-Reactivity, and Alloreactivity. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jun 28;18(8):2268–77.
212. Liarski VM, Kaverina N, Chang A, Brandt D, Yanez D, Talasnik L, et al. Cell Distance Mapping Identifies Functional T Follicular Helper Cells in Inflamed Human Renal Tissue. *Sci Transl Med.* 2014 Apr 2;6(230):230ra46–230ra46.
213. Venner JM, Famulski KS, Badr D, Hidalgo LG, Chang J, Halloran PF. Molecular Landscape of T Cell-Mediated Rejection in Human Kidney Transplants: Prominence of CTLA4 and PD Ligands: Molecular Phenotype of TCMR. *Am J Transplant.* 2014 Nov;14(11):2565–76.

214. Petrelli A, Carvello M, Vergani A, Lee KM, Tezza S, Du M, et al. IL-21 Is an Antitolerogenic Cytokine of the Late-Phase Alloimmune Response. *Diabetes*. 2011 Dec 1;60(12):3223–34.
215. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouvelekis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, et al. Global Impairment of CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Regulatory T Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Jun 15;179(12):1121–30.
216. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A Paradigm of Immunodeficiency with Autoimmunity. *Front Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2015 May 12];3. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00211/abstract>
217. Matignon M, Aissat A, Canoui-Poitrine F, Grondin C, Pilon C, Desvaux D, et al. Th-17 Alloimmune Responses in Renal Allograft Biopsies From Recipients of Kidney Transplants Using Extended Criteria Donors During Acute T Cell-Mediated Rejection: Th17 and Kidney Graft Rejection. *Am J Transplant*. 2015 May;n/a – n/a.
218. Restifo NP, Gattinoni L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2013 Oct;25(5):556–63.
219. Restifo NP. Big bang theory of stem-like T cells confirmed. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):476–7.
220. Youngblood B, Hale JS, Ahmed R. T-cell memory differentiation: insights from transcriptional signatures and epigenetics. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):277–84.
221. Zhu J, Adli M, Zou JY, Verstappen G, Coyne M, Zhang X, et al. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell*. 2013 Jan 31;152(3):642–54.
222. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets: HIGHLIGHTS. *Eur J Immunol*. 2013 Nov;43(11):2797–809.
223. Sallusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol*. 2009 Aug 11;39(8):2076–82.
224. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):57–63.
225. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. 2014 May;13(5):379–95.
226. Bauquet AT, Jin H, Paterson AM, Mitsdoerffer M, Ho I-C, Sharpe AH, et al. The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nat Immunol*. 2009 Feb;10(2):167–75.
227. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol*. 2008 Jun;29(6):290–4.
228. Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science*. 2009 Jun 19;324(5934):1569–72.

229. Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*. 2009 Jun 19;324(5934):1572–6.
230. Fröhlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, Weber J, et al. IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science*. 2009 Jun 19;324(5934):1576–80.
231. McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, Lee CMY, Webster KE, Sprent J, et al. Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes*. 2011 Mar;60(3):867–75.
232. De Graav GN, Dieterich M, Hesselink DA, Boer K, Clahsen-van Groningen MC, Kraaijeveld R, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin Exp Immunol*. 2015 May;180(2):329–40.
233. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal Center Alloantibody Responses Are Mediated Exclusively by Indirect-Pathway CD4 T Follicular Helper Cells. *J Immunol*. 2012 Mar 15;188(6):2643–52.

ANNEXE

Co-stimulatory blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 balance in transplantation: impact on memory T cells?

Simon Ville^{1,2}, Nicolas Poirier^{1,2,3}, Gilles Blancho^{1,2} and Bernard Vanhove^{1,2,3*}

¹Unité Mixte de Recherche, UMR_S 1064, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nantes, France, ²Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), Université de Nantes, Nantes, France, ³Effimune SAS, Nantes, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Zhenhua Dai,
Guangdong Provincial Academy of
Chinese Medical Sciences, China

Reviewed by:

Philippe Saas,
Etablissement Français du Sang
BFC, France
Zheng Jenny Zhang,
Northwestern University, USA

*Correspondence:

Bernard Vanhove,
INSERM UMR1064, 30 Bd Jean
Monnet, Nantes Cedex 01 44093,
France
bernard.vanhove@univ-nantes.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Alloimmunity and Transplantation, a
section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 June 2015

Accepted: 27 July 2015

Published: 10 August 2015

Citation:

Ville S, Poirier N, Blancho G and
Vanhove B (2015) Co-stimulatory
blockade of the CD28/CD80-86/
CTLA-4 balance in transplantation:
impact on memory T cells?
Front. Immunol. 6:411.
doi: 10.3389/fimmu.2015.00411

CD28 and CTLA-4 are prototypal co-stimulatory and co-inhibitory cell surface signaling molecules interacting with CD80/86, known to be critical for immune response initiation and regulation, respectively. Initial “bench-to-beside” translation, two decades ago, resulted in the development of CTLA4-Ig, a biologic that targets CD80/86 and prevents T-cell costimulation. In spite of its proven effectiveness in inhibiting allo-immune responses, particularly in murine models, clinical experience in kidney transplantation with belatacept (high-affinity CTLA4-Ig molecule) reveals a high incidence of acute, cell-mediated rejection. Originally, the etiology of belatacept-resistant graft rejection was thought to be heterologous immunity, i.e., the cross-reactivity of the pool of memory T cells from pathogen-specific immune responses with alloantigens. Recently, the standard view that memory T cells arise from effector cells after clonal contraction has been challenged by a “developmental” model, in which less differentiated memory T cells generate effector cells. This review delineates how this shift in paradigm, given the differences in co-stimulatory and co-inhibitory signal depending on the maturation stage, could profoundly affect our understanding of the CD28/CD80-86/CTLA-4 blockade and highlights the potential advantages of selectively targeting CD28, instead of CD80/86, to control post-transplant immune responses.

Keywords: CD28, CTLA-4, costimulation blockade, memory T cell, effector T cell, transplantation immunology, heterologous immunity, CTLA4-Ig

Introduction

The importance of costimulation to allo-immune response has been widely demonstrated. A comparative study of xeno- and allo-immune response by Lafferty et al. in the late 60s was at the origin of this concept (1, 2). To their surprise, they found that “as the genetic relationship between donor and recipient becomes more distinct, the degree of reactivity falls to an undetectable level.” They proposed that something more than antigens, with species compatibility, was required to stimulate an allograft response. They called this second signal the allograft stimulus. This became the costimulation signal, when extended to the entire T-cell response, within the second signal theory (3).

Later, CTLA-4, an inhibitory cell surface molecule with the same ligand on antigen-presenting cell (APC) as CD28, namely CD80/86, was discovered, defining the CD28/CD80/86/CTLA-4 balance. This pathway became an attractive focus in the transplantation field and has been the target of much

research over the past few decades, leading to the development of CTLA4-Ig (4). This fusion protein binds CD80 and CD86, preventing ligation of CD28 and also of CTLA-4. In spite of its proven effectiveness in inhibiting allo-immune responses, particularly in murine models, clinical experiences in kidney transplantation with belatacept (a high-affinity CTLA4-Ig molecule) have exhibited a high incidence of acute, cell-mediated rejection (5). The etiology of this belatacept-resistant rejection has been ascribed to heterologous immunity, i.e., the cross-reactivity of the pool of memory T cells from pathogen-specific immune responses, with alloantigens (6).

From the beginning, Lafferty et al. found that, once generated, activated cytotoxic T lymphocytes are able to kill any cell that expresses foreign antigens, that is, once activated the requirement for allogenic stimulus is lost (2). Based on a small number of studies, the idea that CD28 costimulation is unnecessary for CD4 + and CD8 + T-cell memory responses has become a generally accepted paradigm in immunology (7). This is consistent with the classic view that most T cells die after reacting to pathogens, but some of them, cells that are capable of destroying the pathogen, give rise to memory cells. Thus, the loss of the costimulation requirement is considered as a selective advantage to the memory T cells, which increases the efficiency of recall responses.

However, lines are shifting: in the memory field a new model, known as “developmental,” where naïve cells directly develop into memory cells without transitioning through an effector stage, is emerging. At the same time, data from experimental models, which are increasingly relevant to anti-infectious immune response, challenge the current paradigm of dispensable CD28 costimulation by memory T cells. Furthermore, advances in the field of cancer immunotherapy provide indication on the impact of CTLA-4 blockade, including on a preexisting immune response. This review delineates how this shift in paradigm could profoundly affect our understanding of the CD28/CD80/86/CTLA-4 blockade and highlights the potential advantages of selectively targeting CD28, instead of CD80/86, to control post-transplant immune responses.

What We Can Learn from CD28-Negative T Cells

A way to investigate the requirement of CD28 for antigen-experienced T cells is to focus on CD28-negative T lymphocytes, for which there is little doubt that activation is CD28 independent.

As noted above, usually the loss of CD28, and consequently of the costimulation requirement, is regarded as a special state, achieved following an immune response by the most efficient clones and generating the best protective anamnestic response due to memory cells (8).

CD28-negative T cells are absent from umbilical cord blood, then emerge over time and finally a majority of peripheral blood T cells become CD28 negative (9). The loss of CD28 is an immunological feature primarily observed in humans and primates. Substantial progress has been made in understanding the molecular, cellular, and functional features of CD28-negative T cells since their initial identification in the early 90s (9, 10). On the one hand, they gain cytolytic activities supported by elevated

expression of key molecules including perforin and granzyme, they have a low activation threshold, and in selected cases, render cell activation independent of the recognition of the appropriate antigenic peptide. On the other hand, they have a reduced capacity to proliferate and survive after TCR activation, displaying signs of lymphocyte exhaustion with dominant inhibitory receptors (8–10). Thus, their overall impact is negative, since their accumulation comes at the expense of an appropriate immune response and gives rise to the risk of autoimmunity.

CD28-negative T cells do not appear to be memory cells, whose function would be to improve a recall response, but terminally differentiated cells arising as a consequence of immunosenescence. This contradicts mainstream thinking, where loss of the costimulation requirement is considered as an advantage for memory cells.

The Developmental Model and Possible Prediction of Costimulation Requirement

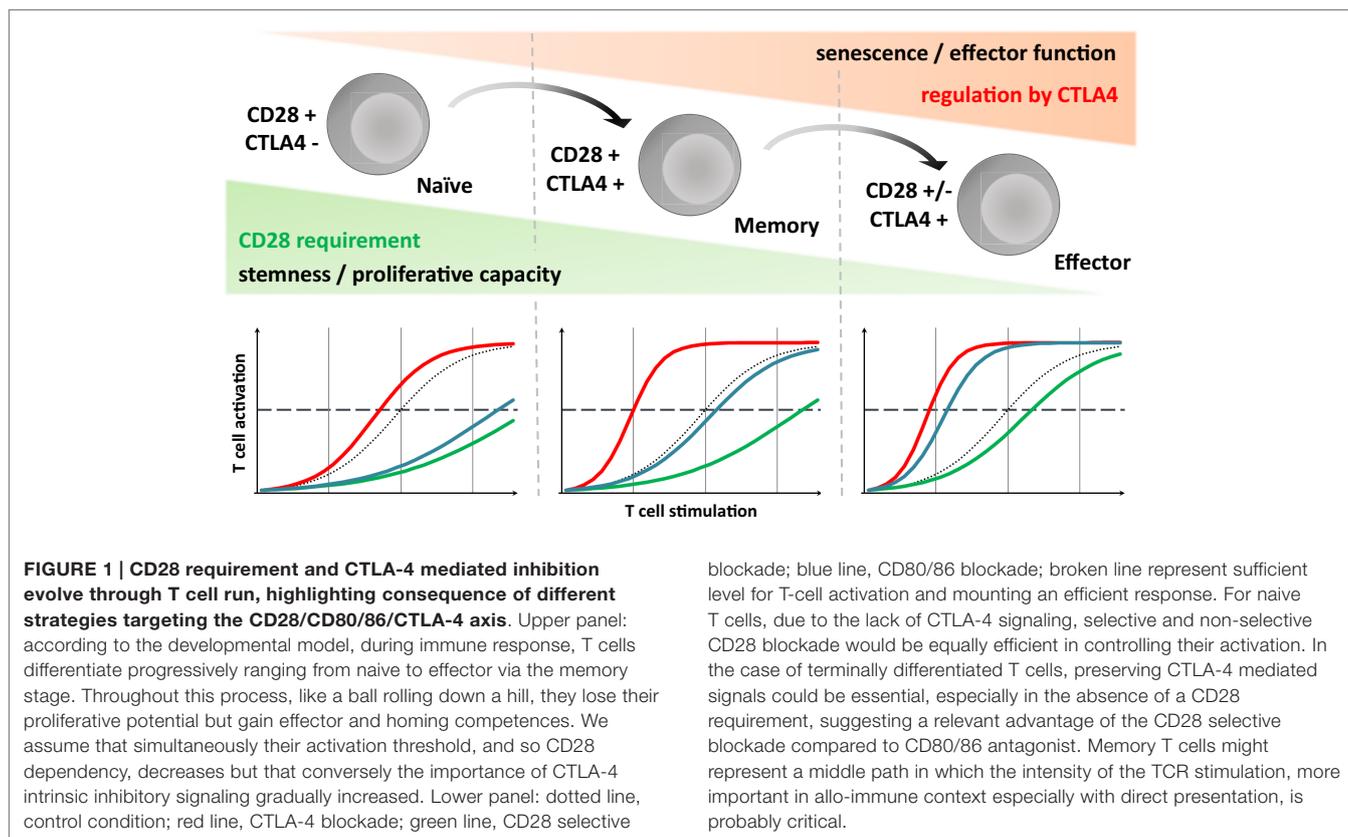
A new model for the lineage relationship of T-cell subsets suggests that less differentiated memory T cells give rise to effector cells, and not vice versa, so memory cells are derived directly from activated naïve cells that have never experienced an effector state (11–13).

This model is called developmental because it proposes that T-cell differentiation is largely a linear and unidirectional process, whose driving force is the cumulative history of antigenic stimulation, going from naïve cell to terminally differentiated effector T cell via a memory stage, with progressive chromatin change. Cell maturation has been likened to a ball rolling down a hill, with cells progressively losing potential energy, i.e., “stemness” and proliferative capacities, but gaining effector and homing capacities (Figure 1). This process is associated with progressive characteristic changes in cell surface molecule expression that allow us to classify cells into various subsets. The loss of CD28 is one of the last events occurring during maturation (13). This fits with the features of CD28-negative T cells described above (9, 10).

CD28 loss, and from a broader perspective, loss of the costimulation requirement, would not then reflect an advantage inherent to memory acquired following an immune response, incidentally with a risk of immunopathology by inappropriate reactivation, but a feature of cells reaching the end of a progressive maturation process with limited potential but with effector capacities, and restricted to peripheral tissues.

Origins of the Notion That Memory T Cells are Costimulation-Independent

The costimulation field has become much more complex since the publication of Lafferty’s allogenic stimulus hypothesis. Numerous activators and inhibitors of ligand/receptor interactions have been described on both sides of the immunological synapse and given the appellation cell surface signaling molecules. Their distribution is extremely variable according to their developmental stage, the localization of the different lymphocyte subsets and their propensity to impact on each other through



blockade; blue line, CD80/86 blockade; broken line represent sufficient level for T-cell activation and mounting an efficient response. For naive T cells, due to the lack of CTLA-4 signaling, selective and non-selective CD28 blockade would be equally efficient in controlling their activation. In the case of terminally differentiated T cells, preserving CTLA-4 mediated signals could be essential, especially in the absence of a CD28 requirement, suggesting a relevant advantage of the CD28 selective blockade compared to CD80/86 antagonist. Memory T cells might represent a middle path in which the intensity of the TCR stimulation, more important in allo-immune context especially with direct presentation, is probably critical.

feedback loops. The fate of each cell thus depends on the integration of signals derived from a large complex of stimulatory and inhibitory interactions (14). This framework, much more complex than the standard view of the second signal model, is required to interpret the results of the numerous studies that have been conducted over recent years on the CD28/CD80/86/CTLA-4 triad. Some conclusions, sometimes considered as “ground rules”, have to be tempered by the inevitable limitations of the particular experimental methodologies and model systems. One of these ground rules is the paradigm that memory T-cell activation is CD28 independent; an idea based on a small number of *in vitro* studies and ones on CD28-deficient mice.

CD28 signaling requirements in memory CD4 + and CD8 + T-cell responses have been much less well studied than those on primary response generation. A first experimental model used by Steinman 30 years ago was the mixed lymphocyte reaction (MLR) (15, 16). “Memory cells” resulting from primary MLRs were actually not true memory cells as defined today, but rather lymphoblasts. Unlike naïve T cells that proliferate only after stimulation with allogenic dendritic cells (DCs), these lymphoblasts proliferate regardless of the APC subset, including macrophage or B cell. The conclusion was that once activated, lymphocytes become independent of second signals.

These data were confirmed by Croft (17, 18). Adoptive transfer of TCR transgenic T cells, previously activated specifically *in vitro*, allowed exploration of antigen-specific memory responses. Indeed, after homeostatic proliferation in the host, they become memory-like, and, once harvested from spleen, they could be

specifically re-activated *ex vivo* with specific peptides exogenously loaded onto various cultured APCs. Then using APC from CD80/86-deficient mice or CTLA4-Ig, the CD28-independence of these memory T cells was demonstrated (19, 20).

We should stress that all the previously discussed *in vitro* studies have examined CD28 costimulation requirements under conditions where the T-cell stimulus was not equivalent to the stimulus received in physiological conditions. Peptide was exogenously loaded onto cultured APCs, and thus the requirement for costimulation may have been overcome due to the strength of TCR signaling (21). Indeed, even for a primary response, the costimulation requirement can be overcome if sufficiently high levels of TCR stimulation are obtained. Viola et al., showed *in vitro* that, independent of the nature of the TCR stimuli, if TCR stimulation exceeds a minimum threshold, complete activation is achieved and in the presence of CD28 costimulation, that threshold is significantly lower (22), especially in memory T cells (23). Thus, the costimulation requirement is a quantitative phenomenon and has to be investigated in the light of the strength of TCR stimulation.

However, evidence *in vivo* was provided in a report by Suresh et al. showing that, in lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infected CD28-deficient mice, memory LCMV-specific CD8 + T-cell response seems to be normally reactivated. Indeed when they were re-challenged with a lethal dose of LCMV, all the mice survived while all naive controls died (24).

At first sight, the use of CD28-deficient mice to investigate a memory response *in vivo* may seem questionable, since the

primary response, and consequently the establishment of memory cells in these animals, is greatly reduced (25). But initial studies using LCMV-infected mice revealed that, unlike for principle viruses, an efficient primary CD8 + T-cell response can be generated in the absence of CD28 costimulation (25). The reason for this discrepancy was ascribed to higher levels of TCR stimulation, which could overcome the need for costimulation. Therefore, using this model to explore the recall responses actually makes little sense. In addition, more detailed studies suggest a number of deficiencies in terms of the primary LCMV-specific T-cell response in CD28-deficient mice. In particular, the expansion of virus-specific CD4 T cells was reduced by about a factor of 10 (26) and results with B7-deficient mice indicate that B7 costimulation is required for induction and maintenance of LCMV-specific CD8 + T-cell memory (27). Finally, although CD28-deficient mice have normal levels of B- and T-cell populations, given the importance of CD28 costimulation in thymic T-cell development (28, 29), lack of CD28 induces a defect in regulatory T cells and could lead to defective mature T cells. Taken together, this complicates using these mice to study memory responses.

In the early 2000s, based on *in vitro* studies and models of LCMV infection in CD28-deficient mice, despite their methodological and technical limitation, the prevailing belief was that CD28 costimulation was not required for memory T-cell activation.

Revisiting the Concept

The accepted hypothesis began to be questioned with studies (30, 31) in which *in vivo* depletion systems were used to analyze the role of DCs in reactivating CD8 memory T cells during recall response to three different microbial infections. Without DCs during recall response, a profound decrease in the number of CD8 memory T cells was observed, suggesting that costimulation through DCs was required for optimal memory response.

More evidence against the proposition that costimulation is dispensable for memory T cells comes from successes in the treatment of autoimmune diseases, which by definition involve pre-existing auto-reactive T cells. CTLA4-Ig has proved effective both in experimental models (32, 33) and in the clinic with psoriasis (34) and rheumatoid arthritis (35).

Furthermore, except for the specific case of LCMV infection, a lack of costimulation by CD28 impaired secondary response in numerous other infectious models has been found (36–42). Whether these observations indicate requirements for CD28 costimulation during the initial priming or during the recall response is not clear and has not been investigated in detail.

In several more recent works (27, 43–50), reactivation of specific memory T-cell populations in immunized WT mice has been investigated using specific tetramers, or by adoptive transfer of labeled memory T cells. Assessment of a CD28 requirement was made through either adoptive transfer in CD80/86-deficient hosts or through costimulation blockade at the moment of recall, using CTLA4-Ig or anti-CD28 antagonist antibodies.

The essential function of CD28 for conferring host protection during secondary infection has been confirmed using the cre-lox

system allowing a CD28-inducible KO in a model of infection by *N. Brasiliensis* (51). Mice were infected a first time, then a second one after treatment with tamoxifen allowing an efficient CD28 deletion. Compared with WT, these mice had a delayed expulsion of adult worms in the small intestine.

Finally, a more recent study highlighted the critical importance of the CD28 pathway to memory T-cells homeostasis (52). Again in a context of LCMV infection, Kalia et al. demonstrated that without Tregs, memory T cells in a quiescent state proliferated and engaged terminal differentiation. CTLA-Ig by blocking CD80/86 interaction with CD28 rescued memory defects (maintaining a quiescent state) by mimicking Treg known to modulate the level of ligand available for CD28 through CD80/86 trans-endocytosis on APC mediated by CTLA-4 (53).

Thus, currently, extensive research using more relevant experimental models has demonstrated that the optimal elaboration of secondary T-cell immunity, as well as memory T-cell homeostasis, is dependent on productive CD28/CD80/86 interactions, in the setting of anti-infectious immune response.

Allo-Immune Response

As a starting point, we have to distinguish two dramatically different scenarios for the involvement of immune memory response in transplantation. First, recipients who are sensitized to HLA antigens, which occurs mainly through blood transfusions, pregnancy, or previous organ transplantation (54–56). To date, very little research has been done on use of T-cell-specific costimulation blockade strategies in HLA-sensitized recipients and as such it will not be addressed in this review. Second, there are recipients without HLA-specific immunization. In such case, memory T-cell involvement is not, at first sight, obvious.

In the early 90s, shortly after its discovery, the CD28/CD80/86 interaction blockade, later associated with CD40–CD40L blockade, raised great hopes in the transplantation field. In murine models, numerous studies demonstrated that blockade of these co-stimulatory pathways during transplantation was highly effective at tolerizing naive donor-reactive T cells and prolonging graft survival. This occurred irrespective of the blockade modality: CTLA4-Ig (57–59) or anti-CD80/86 antibodies (4). While treatment with CTLA4-Ig in rodents demonstrated high efficacy, experiments in non-human primates demonstrated much more modest prolongation of allograft survival (60–62).

Initially, a weak affinity of the first CTLA4-Ig for CD86, compared with CD80, was hypothesized as the source of this lack of effectiveness (4). Thus, a second generation of CTLA4-Ig, LEA29Y, with a better affinity for CD86, was developed. Translation of LEA29Y into non-human primate models of renal transplantation showed superior prolongation in graft survival compared to CTLA4-Ig as a monotherapy, and dramatically improved survival when used as part of a combined immunosuppressive regimen including either mycophenolate mofetil (MMF) and steroids or anti-IL-2R (basiliximab) (63). Based on these encouraging results, LEA29Y (belatacept) was moved into clinical trials as the principal component of an immunosuppressive regimen consisting of basiliximab, steroids, and MMF (5). As expected, this study showed improvement in renal function compared with

cyclosporine-treated recipients owing to reduced CNJ-related renal toxicities (5, 64). However, the incidence of biopsy-proven acute rejection was higher in belatacept-treated recipient, giving rise to a new concept: the “belatacept-resistant rejection,” its counterpart being resistance to tolerance induction in rodent experimental models.

As detailed above, based on studies *in vitro* and in CD28-deficient mice, the perception that memory cells did not require costimulation signaling by CD28 was deeply ingrained. Consequently, memory T cells were presumed to be the guilty party in belatacept-resistant rejection via heterologous immunity, the concept that without bystander activation, virus-specific memory T cells can become activated by unrelated viruses, through molecular mimicry (65). On the top of this, unexpected cross-reactivity between virus-specific CTL clones and uninfected allogenic targets has been demonstrated (66). This activity could be attributed to dual recognition of pathogen-peptide/self-CMH complexes as well as peptide/allo-CMH complexes (6, 67). The most famous example is in seminal studies by Burrows et al. demonstrating that CD8 + T cells specific to EBV-EBNA3A restricted by HLA-B8 were cross-reactive with HLA-B44 presenting a self-peptide. Recently, the molecular understanding of this phenomenon has improved (68, 69) and its magnitude in the transplantation context has been clarified (70).

Heterologous immunity was suspected of playing a major role in mediating costimulation blockade-resistant allograft rejection, observed in situations where transplant recipients have an immune history. Several studies argue for this hypothesis, showing that naive recipients that had previously been infected with different pathogens became refractory to the tolerance-inducing effects of costimulation blockade (71, 72). This resistance is transmitted by adoptive transfer of CD8 and/or CD4 from an immunized to a naive animal (73). Furthermore, in a more relevant model of kidney transplantation in NHP, where tolerance was induced by costimulation blockade combined with donor-specific transfusion (DST), it was revealed that the higher frequency of alloreactive memory cells (when measured by ELISPOST assay) correlated with the occurrence of acute rejection (74).

Collectively, these studies concluded that resistance to the tolerance-inducing effects of costimulation blockade in experimental models and belatacept-resistant rejection in the clinic were caused by heterologous immunity (75, 76). How can this conclusion be reconciled with the recent data showing that effective memory T-cell recall response actually requires CD28 costimulation? One explanation could be that in the non-physiologic context of transplantation, the strength of the antigenic challenge overcomes the costimulation threshold, particularly in Ag-experienced cells.

An Early and Only Cellular Rejection?

Heterologous immunity occurs through the interaction of a recipient Ag-experienced T cell with a donor APC, in transplant immunology this is called the direct recognition pathway. If we assume that the strength of the antigenic challenge during an allo-immune response overcomes the CD28 requirement threshold, it should again be through the direct recognition pathway. Yet the

main immunological issue in kidney transplantation concerns the late onset of kidney dysfunction caused by chronic rejection mainly driven by the indirect pathway (i.e., the interaction of a recipient T cell with a recipient APC exposing donor allogenic MHC peptides) (77), which presumably has a higher physiological CD28 requirement threshold. In addition, the onset of *de novo* DSA can explain a large proportion of chronic rejection. Its onset is dependent on allogenic B-cell response that receives help from a highly specialized subset of CD4 T cells in the germinal center (GC), the follicular helper T cells (Tfh) (78). A recent study revealed that help for a GC alloantibody response could only be provided by CD4 T cells by the indirect pathway (79). The fact that CD28 costimulation is greatly required for primary Tfh response probably explains the lack of DSA in experimental models and belatacept-treated recipients exhibiting remarkably low levels of DSA (64).

The above points suggest that costimulation blockade-resistant rejection should occur early, driven by the direct pathway and consequently without the development of specific alloantibodies, except, obviously, in the case of prior specific immunization.

Are Experienced-T-Cell Subsets on Equal Terms with Costimulation Blockade Resistance?

Even in cases involving the direct recognition pathway, it is likely that all Ag-experienced T cells are not equal in terms of CD28 requirement. Recent studies on tolerance induction by costimulation blockade (80–85) substantiate the view mentioned above that CD28 requirement loss would not reflect an inherent advantage to any memory response acquired following an immune response, but would be a feature confined to cells reaching the end of a progressive process of maturation.

When allo-specific CD8 T Central Memory (TCM) and T Effector Memory (TEM) cells were transferred into wild-type recipients, they were found equally effective at rejecting allografts. When transferred into aly-deficient recipient (aly-deficiency leads to an absence of secondary lymphoid organs), TEM cells were significantly better than TCM at rejecting allografts (86). This suggests that TCM, but not TEM, reactivation requires the presence of APC with costimulation molecules to proliferate and gain effector and homing capacities.

In line with this, in a model of heterologous immunity generated by a latent γ HV68 infection of WT mice, effector T cells (CD44^{high}CD127^{low}CD62L^{low}) and TEM (CD44^{high}CD127^{high}CD62L^{low-int}) were found to be responsible for resistance to tolerance induction by costimulation blockade, in contrast to TCM (80).

In a murine model, decreasing the amount/duration of antigen exposure during priming impacted the ability of donor-specific experienced T cells to mediate costimulation blockade-resistant rejection (81). Interestingly, only donor-specific T cells that were generated under conditions of reduced Ag exposure failed to mediate costimulation blockade (referring to as CD80/86 blockade) resistant rejection. Overall antigenic stimulation undergone by T cells during priming is proposed as predicting cell fate, ranging from unpolarized cells to terminally differentiated cells (87). Thus in the case of poor antigenic stimulation, the accumulation

of unpolarized cells could explain the success of the costimulation blockade.

The differential effects of belatacept on cell proliferation in response to either viral peptide processed on self APC or allogenic stimulation seem to confirm this proposition (82). Xu et al. showed that a large percentage of the repertoire proliferated in response to alloantigen, but contained few polyfunctional cells (advanced in their maturation and expressing IFN γ , TNF α , and IL-2). By contrast, the proportion of cells responding to a viral peptide was low and consisted predominantly of mature polyfunctional TEM. When belatacept was added to the cell culture medium, only the more mature cells escaped the costimulation blockade. This again demonstrates that only T cells that have reached a late maturation stage are independent of CD28.

Furthermore, this could explain the relative success of the association of belatacept and alefacept, a CD2 antagonist, in an experimental model of kidney transplantation in NHP (83). Indeed, CD8+CD2+ were the most differentiated in terms of cytotoxic molecule expression and polyspecificity.

Hence among experienced T cells, those liable for costimulation blockade resistance are mature cells, having completed the progressive process of differentiation, including the loss of the CD28 costimulation requirement for their activation.

Interestingly, recent data have revealed that end-stage renal disease patients, compared to healthy controls, have a significant greater number of memory T cells showing progressive terminal differentiation, similar to what is observed in old people with immune-senescence (88). Likewise, anti-thymocyte globulins (ATG)-treated recipient exhibit more late stage differentiated T cells, including CD28 negative (89). Hence, kidney transplant candidates, by definition with impaired renal function, could be especially affected by belatacept-resistant rejection.

Beyond having a CD28 requirement, CTLA-4 might also play a role in belatacept-resistant rejection. Halloran et al. have recently demonstrated that CTLA-4 transcripts dominate the molecular landscape of T-cell-mediated rejection (TCMR) (90), highlighting the possibility that an active negative regulation of T cells in tissue could explain the occurrence of robust TCMR in belatacept-treated recipients.

CD28 Selective Blockade

Up to now, "CD28 blockade" referred to inhibiting B7, either with a CTLA4-Ig or anti-CD80/86 antibody. Obviously, concomitant inhibition of the CTLA-4 pathway is the main drawback of this strategy. As suggested above, the selective blockade of CD28 signaling (i.e., blocking only CD28/CD80/86 interactions) should present the advantage of respecting the immune-modulatory signals mediated by CTLA-4. The recent development of monovalent antagonist anti-CD28 binders makes this strategy feasible and safe (91–95), clearly differentiating them from agonist or superagonist anti-CD28 antibodies (96–100).

CD28 antagonists prevent acute allograft rejection in mice (101) and primate (92). The potential benefit of preserving CTLA-4 pathways would be due to its extrinsic action, mainly through regulatory T cells. Indeed, use of CD28 antagonist is associated with Treg accumulation in the graft, where they most

likely modulate pathogenic T cells and promote prolonged allograft survival (92).

But CTLA-4 has also intrinsic, cell-autonomous roles (102). For experienced T cells, we would expect the advantages of a selective CD28 blockade compared with CTLA4-Ig, if two conditions are met: (i) cells independent of CD28 costimulation for their activation are at play in the context of allo-immune responses and (ii) that activation of these same cells is regulated by CTLA-4. We have seen above that CD28-independent alloreactive cells do exist even though this concerns probably only a few singular cell subsets. Whether experienced T cells are regulated by CTLA-4 is the focus of the following paragraph.

Are Experienced T Cells Regulated by CTLA-4?

Targeting CTLA-4 with ipilimumab for melanoma immunotherapy was the first clinical demonstration of the physiological role of CTLA-4 acting as an immune checkpoint that controls T-cell reactivity (103, 104). Initial work indicated that the maximal activity of anti-CTLA-4 treatment required the targeting of CTLA-4 on both effectors and Tregs (105). It has also been suggested that anti-CTLA-4 antibodies lead to the depletion of Tregs within the tumor microenvironment in a Fc γ receptor-dependent manner (106–108), concomitant with an increase in the number of activated T cells in peripheral blood (109–112) as well as the tumor site (113–115). Two non-mutually exclusive scenarios can explain this second observation. First, anti-CTLA-4 treatment could improve the priming, then expansion of tumor-specific naive T cells. Second, it could increase the magnitude of the preexisting memory/effector tumor reactive T cells by turning off inhibitory mechanisms (116). Recent advances argue for the latter. Cha et al. measured the frequency of individual rearranged TCR β genes after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. Clinical outcome was associated with maintenance of high-frequency clones present at the start of the treatment. The bulk of the change in clone frequency occurred in the effector/memory T-cell compartment rather than in the naive T-cell pool, suggesting that treatment boosted meaningful preexisting T-cell responses (117). More recently, it has been evidenced in mice that preexisting anti-tumor T-cell responses are amplified by checkpoint blockade therapy. Anti CTLA-4 and anti PD-1 in a sarcoma model regulated a subset of genes in CD8 tumor-specific infiltrating lymphocyte (TIL) (especially Granzyme B, IFN- γ , and TNF- α that are known to cause acute rejection), whose enhanced expression is similar to that observed in CD8 T cells from mice during acute secondary viral infection. The depressed genes were similar to those of exhausted CD8 T cells in chronic viral infection (particularly LAG-3 and TIM-3) (118). In a melanoma model, anti-CTLA-4 predominantly inhibits Treg cells in TIL but also reinvigorates exhausted PD-1 + Eomes + CD8 T cells (119).

In the context of rejection prophylaxis by CTLA4-Ig, CTLA-4 is also blocked (at least it cannot interact with CD80/86 anymore). It is tempting to speculate that, similar to that which is observed in tumors, some preexisting transplant infiltrating lymphocytes in an advanced stage of differentiation, which are supposed to be costimulation independent, could be reinvigorated by the

CTLA-4 blockade with belatacept. Indeed CTLA-4 might inhibit T cells even in the absence of CD28 (120) and data from clinical trials provide indirect evidence for such an “immune checkpoint inhibitory” effect of CTLA4-Ig. In inflammatory bowel disease (IBD), patients treated with CTLA4-Ig demonstrate minimal improvement and disease exacerbation was seen in some treatment groups (121). The development of IBD has also been reported in a patient treated with CTLA-4 Ig for rheumatoid arthritis (122).

Which Cells are Responsible for Belatacept-Resistant Rejection?

Regardless of maturation stage, we can assume that both the threshold of CD28 requirement and the intrinsic regulation by CTLA-4 pathway differ between various T-cell subsets.

Polarized Th17 could be responsible for Belatacept-resistant rejection, since an elevated level of Th17 memory cells has been associated with acute rejection with belatacept (85), and as mentioned above, in IBD, which is a Th17-mediated disease, CTLA4-Ig treatment has exhibited minimal efficacy and even, in a few cases, disease exacerbation (121). In addition, *Candida albicans* immunization of mice conferred resistance to costimulation blockade following transplantation. *C. albicans* polarizes the response toward Th17 cells and enhances expression of CTLA-4 on Th17 cells. *Mycobacterium tuberculosis*, which polarizes the response toward Th1 cells, does not confer such resistance (84). These data were verified using mice genetically deficient for hallmark T-cell transcription factors such as B6.ROR γ t KO and B6.T-bet KO (123). Thus, Th17 cells might be particularly sensitive to regulation by CTLA-4, and CTLA4-Ig might hamper this regulation.

Turning to Tfh, the initial priming instigating a Tfh response is CD28 dependent, including in the allo-immune response context (124). By contrast, primed Tfh lose their CD28 requirement when they secondarily interact with B cells (125). Furthermore, at that stage, CTLA-4 also regulates Tfh function in a cell-intrinsic manner (126). Again, like Th17, Tfh accumulates with immune history and has the features required to prompt resistance to CTLA4-Ig.

Potential Advantage of Targeting CD28 Instead of CD80/86

Recently (127), we performed a direct assessment of FR104 (93), a selective CD28 Fab antagonist, versus CTLA4-Ig (LEA26Y) in kidney allograft in baboon. The biologics were used *de novo* together with an initial 1-month treatment with a low dose of tacrolimus, weaned between months 1 and 2, after which the recipients were

under monotherapy with the biologics. Biopsy-proven acute rejection animals were treated with boluses of steroids. In the CTLA4-Ig group ($n = 5$), four out of the five recipients developed severe acute cellular rejection before, during or just after tacrolimus weaning and this proved to be corticoreistant. In the FR104 group ($n = 5$), only two animals developed an acute rejection episode, just after tacrolimus weaning, and this could be reversed by steroids. A transcriptional analysis of 1-month biopsies did not reveal any significant differences except the remarkable exception of IL-21, stronger in CTLA-4 treated animals, whose main source is Tfh cells. Immunohistochemistry revealed some CD4 T cells expressing PD-1, the main marker used to identify Tfh and IL-21. We then assessed *in vitro* proliferation of stimulated Tfh (CXCR5 + ICOS + PD-1 +) using human tonsil tissue and found that inhibition was more effective with FR104 than with CTLA4-Ig. This was confirmed in an experimental model of immunization with KLH in mice where, as expected, primary Tfh response was equally inhibited with both CD28 selective blockade and CTLA4-Ig, unlike the recall response in which the CD28 selective blockade was more efficient in controlling Tfh response. Of interest in a model of islet transplantation, mIL21R.Fc rescues CTLA-Ig-treated mice, resulting in tolerance in 100% of the mice versus 55% in a CTLA4-Ig monotherapy group, and it was demonstrated that IL-21 acted as an antitolerogenic cytokine by preventing Treg generation and inhibiting Treg function (128).

Summary

In the field of transplantation, the initial great hopes for CD28/CD80/86/CTLA-4 blocking strategy have been dashed in the confrontation with clinical reality. The presence of a complex repertoire of preexisting experienced T cells either free of a CD28 costimulation requirement and/or controlled by the CTLA-4 immune checkpoint is a likely explanation.

However, the picture might not be so dark. First, because primary Tfh response is strictly under the control of CD28, explaining why a costimulation blockade with belatacept prevents the induction of alloantibodies. Second, a loss of a CD28 requirement might not be exhibited by memory cells, but rather confined to terminally matured cells, to some extent exhausted. Although in the context of allo-immune response, these cells could cause severe rejection, the risk of a rescuing inhibitory signal mediated by CTLA-4 and of eliciting belatacept-resistant cellular rejection could be alleviated by the use of CD28-specific antagonists, which are currently in clinical development that will block CD28-mediated signals, without preventing CTLA-4 signals. This novel approach might have the potential advantage of controlling post-transplant immune responses more effectively.

References

- Lafferty KJ, Jones MA. Reactions of the graft versus host (GVH) type. *Aust J Exp Biol Med Sci* (1969) 47:17–54. doi:10.1038/icb.1969.3
- Lafferty KJ, Misko IS, Cooley MA. Allogeneic stimulation modulates the *in vitro* response of T cells to transplantation antigen. *Nature* (1974) 249:275–6. doi:10.1038/249275a0
- Baxter AG, Hodgkin PD. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:439–46. doi:10.1038/nri823
- Ford ML, Larsen CP. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol Rev* (2009) 229:294–306. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00776.x
- Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanche G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med* (2005) 353:770–81. doi:10.1056/NEJMoa050085
- Selin LK, Brehm MA. Frontiers in nephrology: heterologous immunity, T cell cross-reactivity, and alloreactivity. *J Am Soc Nephrol* (2007) 18:2268–77. doi:10.1681/ASN.2007030295

7. Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol* (2002) **20**:551–79. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100101.151926
8. Mou D, Espinosa J, Lo DJ, Kirk AD. CD28 negative T cells: is their loss our gain?: CD28 negative T cells. *Am J Transplant* (2014) **14**:2460–6. doi:10.1111/ajt.12937
9. Weng N, Akbar AN, Goronzy J. CD28 – T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* (2009) **30**:306–12. doi:10.1016/j.it.2009.03.013
10. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev* (2005) **205**:158–69. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00256.x
11. Restifo NP, Gattinoni L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Curr Opin Immunol* (2013) **25**:556–63. doi:10.1016/j.coi.2013.09.003
12. Restifo NP. Big bang theory of stem-like T cells confirmed. *Blood* (2014) **124**:476–7. doi:10.1182/blood-2014-06-578989
13. Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, Roederer M, Lugli E. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* (2013) **43**:2797–809. doi:10.1002/eji.201343751
14. Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* (2011) **34**:466–78. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.008
15. Inaba K, Steinman RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* (1984) **160**:1717–35. doi:10.1084/jem.160.6.1717
16. Metlay JP, Puré E, Steinman RM. Distinct features of dendritic cells and anti-Ig activated B cells as stimulators of the primary mixed leukocyte reaction. *J Exp Med* (1989) **169**:239–54. doi:10.1084/jem.169.1.239
17. Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* (1994) **152**:2675–85.
18. Croft M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* (1994) **6**:431–7. doi:10.1016/0952-7915(94)90123-6
19. London CA, Lodge MP, Abbas AK. Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells. *J Immunol* (2000) **164**:265–72. doi:10.4049/jimmunol.164.1.265
20. Bachmann MF, Gallimore A, Linkert S, Cerundolo V, Lanzavecchia A, Kopf M, et al. Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells. *J Exp Med* (1999) **189**:1521–30. doi:10.1084/jem.189.10.1521
21. Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol* (2009) **21**:69–77. doi:10.1016/j.smim.2009.02.005
22. Viola A, Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* (1996) **273**:104–6. doi:10.1126/science.273.5271.104
23. Kündig TM, Shahinian A, Kawai K, Mittrücker H-W, Sebзда E, Bachmann MF, et al. Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* (1996) **5**:41–52. doi:10.1016/S1074-7613(00)80308-8
24. Suresh M, Whitmire JK, Harrington LE, Larsen CP, Pearson TC, Altman JD, et al. Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J Immunol* (2001) **167**:5565–73. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5565
25. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* (1993) **261**:609–12. doi:10.1126/science.7688139
26. Christensen JE, Christensen JP, Kristensen NN, Hansen NJV, Stryhn A, Thomsen AR. Role of CD28 co-stimulation in generation and maintenance of virus-specific T cells. *Int Immunol* (2002) **14**:701–11. doi:10.1093/intimm/14.7.701
27. Grujic M, Bartholdy C, Remy M, Pinschewer DD, Christensen JP, Thomsen AR. The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* (2010) **185**:1730–43. doi:10.4049/jimmunol.0903894
28. Vacchio MS, Williams JA, Hodes RJ. A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28/B7 interactions increases positive selection. *Eur J Immunol* (2005) **35**:418–27. doi:10.1002/eji.200424918
29. Zheng X, Gao J-X, Chang X, Wang Y, Liu Y, Wen J, et al. B7-CD28 interaction promotes proliferation and survival but suppresses differentiation of CD4-CD8- T cells in the thymus. *J Immunol* (2004) **173**:2253–61. doi:10.4049/jimmunol.173.4.2253
30. Zammit DJ, Cauley LS, Pham Q-M, Lefrançois L. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* (2005) **22**:561–70. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.005
31. Belz GT, Wilson NS, Smith CM, Mount AM, Carbone FR, Heath WR. Bone marrow-derived cells expand memory CD8+ T cells in response to viral infections of the lung and skin. *Eur J Immunol* (2006) **36**:327–35. doi:10.1002/eji.200535432
32. Bluestone JA, St. Clair EW, Turka LA. CTLA4Ig: bridging the basic immunology with clinical application. *Immunity* (2006) **24**:233–8. doi:10.1016/j.immuni.2006.03.001
33. Khoury SJ, Akalin E, Chandraker A, Turka LA, Linsley PS, Sayegh MH, et al. CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* (1995) **155**:4521–4.
34. Abrams JR, Leibold MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Goffe BS, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* (1999) **103**:1243–52. doi:10.1172/JCI5857
35. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfield S, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* (2003) **349**:1907–15. doi:10.1056/NEJMoa035075
36. Bertram EM, Tafuri A, Shahinian A, Chan VS, Hunziker L, Recher M, et al. Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *Eur J Immunol* (2002) **32**:3376–85. doi:10.1002/1521-4141(200212)32:12<3376::AID-IMMU3376>3.0.CO;2-Y
37. Bertram EM, Lau P, Watts TH. Temporal segregation of 4-1BB versus CD28-mediated costimulation: 4-1BB ligand influences T cell numbers late in the primary response and regulates the size of the T cell memory response following influenza infection. *J Immunol* (2002) **168**:3777–85. doi:10.4049/jimmunol.168.8.3777
38. Bertram EM, Dawicki W, Sedgmen B, Bramson JL, Lynch DH, Watts TH. A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo. *J Immunol* (2004) **172**:981–8. doi:10.4049/jimmunol.172.2.981
39. Mittrücker H-W, Kursar M, Kohler A, Hurwitz R, Kaufmann SHE. Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8+ T lymphocytes during infection with listeria monocytogenes. *J Immunol* (2001) **167**:5620–7. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5620
40. Mittrücker H-W, Köhler A, Mak TW, Kaufmann SH. Critical role of CD28 in protective immunity against *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* (1999) **163**:6769–76.
41. Fuse S, Obar JJ, Belfly S, Leung EK, Zhang W, Usherwood EJ. CD80 and CD86 control antiviral CD8+ T-cell function and immune surveillance of murine gammaherpesvirus 68. *J Virol* (2006) **80**:9159–70. doi:10.1128/JVI.00422-06
42. Villegas EN, Elloso MM, Reichmann G, Peach R, Hunter CA. Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* (1999) **163**:3344–53.
43. Ndejemi MP, Teijaro JR, Patke DS, Bingaman AW, Chandok MR, Azimzadeh A, et al. Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway. *J Immunol* (2006) **177**:7698–706. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7698
44. Fuse S, Zhang W, Usherwood EJ. Control of memory CD8+ T cell differentiation by CD80/CD86-CD28 costimulation and restoration by IL-2 during the recall response. *J Immunol* (2008) **180**:1148–57. doi:10.4049/jimmunol.180.2.1148
45. Fuse S, Tsai C-Y, Rommereim LM, Zhang W, Usherwood EJ. Differential requirements for CD80/86-CD28 costimulation in primary and memory CD4 T cell responses to vaccinia virus. *Cell Immunol* (2011) **266**:130–4. doi:10.1016/j.cellimm.2010.09.008
46. Teijaro JR, Njau MN, Verhoeven D, Chandran S, Nadler SG, Hasday J, et al. Costimulation modulation uncouples protection from immunopathology in memory T cell responses to influenza virus. *J Immunol* (2009) **182**:6834–43. doi:10.4049/jimmunol.0803860
47. Prilliman KR, Lemmens EE, Palioungas G, Wolfe TG, Allison JP, Sharpe AH, et al. Cutting edge: a crucial role for B7-CD28 in transmitting T help from APC to CTL. *J Immunol* (2002) **169**:4094–7. doi:10.4049/jimmunol.169.8.4094

48. Borowski AB, Boesteanu AC, Mueller YM, Carafides C, Topham DJ, Altman JD, et al. Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. *J Immunol* (2007) **179**:6494–503. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6494
49. Eberlein J, Davenport B, Nguyen TT, Victorino F, Sparwasser T, Homann D. Multiple layers of CD80/86-dependent costimulatory activity regulate primary, memory, and secondary lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell immunity. *J Virol* (2012) **86**:1955–70. doi:10.1128/JVI.05949-11
50. Linterman MA, Denton AE, Divekar DP, Zvetkova I, Kane L, Ferreira C, et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *Elife* (2014) **3**:e03180. doi:10.7554/eLife.03180
51. Ndlovu H, Darby M, Froelich M, Horsnell W, Lühder F, Hünig T, et al. Inducible deletion of CD28 prior to secondary nippostrongylus brasiliensis infection impairs worm expulsion and recall of protective memory CD4+ T cell responses. *PLoS Pathog* (2014) **10**:e1003906. doi:10.1371/journal.ppat.1003906
52. Kalia V, Penny LA, Yuzefpolskiy Y, Baumann FM, Sarkar S. Quiescence of memory CD8+ T cells is mediated by regulatory T cells through inhibitory receptor CTLA-4. *Immunity* (2015) **42**:1116–29. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.023
53. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* (2011) **332**:600–3. doi:10.1126/science.1202947
54. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* (2005) **5**:807–17. doi:10.1038/nri1702
55. Smith RN, Kawai T, Boskovic S, Nadazdin O, Sachs DH, Cosimi AB, et al. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* (2008) **8**:1662–72. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02303.x
56. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions: Banff 2013 meeting report. *Am J Transplant* (2014) **14**:272–83. doi:10.1111/ajt.12590
57. Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Ledbetter JA, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* (1992) **257**:792–5. doi:10.1126/science.1496399
58. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* (1992) **257**:789–92. doi:10.1126/science.1323143
59. Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei R-Q, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) **89**:11102–5. doi:10.1073/pnas.89.22.11102
60. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) **94**:8789–94. doi:10.1073/pnas.94.16.8789
61. Kirk AD, Tadaki DK, Celniker A, Batty DS, Berning JD, Colonna JO, et al. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for cd80 and cd86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* (2001) **72**:377–84. doi:10.1097/00007890-200108150-00005
62. Levisetti MG, Padrid PA, Szot GL, Mittal N, Meehan SM, Wardrip CL, et al. Immunosuppressive effects of human CTLA4Ig in a non-human primate model of allogeneic pancreatic islet transplantation. *J Immunol* (1997) **159**:5187–91.
63. Larsen CP, Pearson TC, Adams AB, Tso P, Shirasugi N, Strobert E, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant* (2005) **5**:443–53. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00749.x
64. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P, et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant* (2010) **10**:535–46. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.03005.x
65. Welsh RM, Selin LK. No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* (2002) **2**:417–26. doi:10.1038/nri820
66. Burrows SR, Khanna R, Burrows JM, Moss DJ. An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *J Exp Med* (1994) **179**:1155–61. doi:10.1084/jem.179.4.1155
67. Brehm MA, Markees TG, Daniels KA, Greiner DL, Rossini AA, Welsh RM. Direct visualization of cross-reactive effector and memory allo-specific CD8 T cells generated in response to viral infections. *J Immunol* (2003) **170**:4077–86. doi:10.4049/jimmunol.170.8.4077
68. Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, Walters JJ, Gross ML, Suri A, et al. Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nat Immunol* (2007) **8**:388–97. doi:10.1038/ni1446
69. Macdonald WA, Chen Z, Gras S, Archbold JK, Tynan FE, Clements CS, et al. T cell allorecognition via molecular mimicry. *Immunity* (2009) **31**:897–908. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.025
70. Amir AL, D'Orsogna LJA, Roelen DL, van Loenen MM, Hagedoorn RS, de Boer R, et al. Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood* (2010) **115**:3146–57. doi:10.1182/blood-2009-07-234906
71. Pantenburg B, Heinzel F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A. T cells primed by *Leishmania* major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* (2002) **169**:3686–93. doi:10.4049/jimmunol.169.7.3686
72. Valujskikh A, Pantenburg B, Heeger PS. Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice. *Am J Transplant* (2002) **2**:501–9. doi:10.1034/j.1600-6143.2002.20603.x
73. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, et al. Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* (2003) **111**:1887–95. doi:10.1172/JCI17477
74. Nadazdin O, Boskovic S, Murakami T, Tocco G, Smith R-N, Colvin RB, et al. Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates. *Sci Transl Med* (2011) **3**:86ra51. doi:10.1126/scitranslmed.3002093
75. Adams AB, Pearson TC, Larsen CP. Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* (2003) **196**:147–60. doi:10.1046/j.1600-065X.2003.00082.x
76. Lakkis FG. Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance. *J Am Soc Nephrol* (2003) **14**:2402–10. doi:10.1097/01.ASN.0000085020.78117.70
77. Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance. *Transplantation* (2013) **96**:681–8. doi:10.1097/TP.0b013e31829853ce
78. Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (T_{FH}). *Annu Rev Immunol* (2011) **29**:621–63. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400
79. Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, Motallebzadeh R, Qureshi MS, Rehakova S, et al. Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. *J Immunol* (2012) **188**:2643–52. doi:10.4049/jimmunol.1102830
80. Stapler D, Lee ED, Selvaraj SA, Evans AG, Kean LS, Speck SH, et al. Expansion of effector memory TCR V 4+CD8+ T cells is associated with latent infection-mediated resistance to transplantation tolerance. *J Immunol* (2008) **180**:3190–200. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3190
81. Floyd TL, Koehn BH, Kitchens WH, Robertson JM, Cheeseman JA, Stempora L, et al. Limiting the amount and duration of antigen exposure during priming increases memory T cell requirement for costimulation during recall. *J Immunol* (2011) **186**:2033–41. doi:10.4049/jimmunol.1003015
82. Xu H, Perez SD, Cheeseman J, Mehta AK, Kirk AD. The allo- and viral-specific immunosuppressive effect of belatacept, but not tacrolimus, attenuates with progressive T cell maturation: belatacept efficacy and T cell maturation. *Am J Transplant* (2014) **14**:319–32. doi:10.1111/ajt.12574
83. Weaver TA, Charafeddine AH, Agarwal A, Turner AP, Russell M, Leopardi FV, et al. Alefacept promotes co-stimulation blockade based allograft survival in nonhuman primates. *Nat Med* (2009) **15**:746–9. doi:10.1038/nm.1993
84. Krummey SM, Floyd TL, Liu D, Wagener ME, Song M, Ford ML. Candida-elicited murine Th17 cells express high CTLA-4 compared with Th1 cells and are resistant to costimulation blockade. *J Immunol* (2014) **192**:2495–504. doi:10.4049/jimmunol.1301332
85. Krummey SM, Cheeseman JA, Conger JA, Jang PS, Mehta AK, Kirk AD, et al. High CTLA-4 expression on Th17 cells results in increased sensitivity to CTLA-4 coinhibition and resistance to belatacept: Th17 cells have high CTLA-4 expression. *Am J Transplant* (2014) **14**:607–14. doi:10.1111/ajt.12600
86. Oberbarnscheidt MH, Ng Y-H, Chalasani G. The roles of CD8 central and effector memory T-cell subsets in allograft rejection. *Am J Transplant* (2008) **8**:1809–18. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02335.x

87. Kalia V, Sarkar S, Ahmed R. Fine-tuning CD4+ central memory T cell heterogeneity by strength of stimulation. *Eur J Immunol* (2008) **38**:15–9. doi:10.1002/eji.200738044
88. Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NH. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* (2011) **80**:208–17. doi:10.1038/ki.2011.110
89. Crepin T, Carron C, Roubiou C, Gaugler B, Gaiffe E, Simula-Faivre D, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients: ATG and immune senescence in transplanted patients. *Am J Transplant* (2015) **15**:1028–38. doi:10.1111/ajt.13092
90. Venner JM, Famulski KS, Badr D, Hidalgo LG, Chang J, Halloran PF. Molecular landscape of T cell-mediated rejection in human kidney transplants: prominence of CTLA4 and PD ligands: molecular phenotype of TCMR. *Am J Transplant* (2014) **14**:2565–76. doi:10.1111/ajt.12946
91. Haspot F, Seveno C, Dugast A-S, Coulon F, Renaudin K, Usal C, 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**:2339–48. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.01018.x
92. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* (2010) **2**:17ra10. doi:10.1126/scitranslmed.3000116
93. Poirier N, Mary C, Dilek N, Hervouet J, Minault D, Blanche G, et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody: preclinical efficacy and safety of FR104. *Am J Transplant* (2012) **12**:2630–40. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04164.x
94. Poirier N, Dilek N, Mary C, Ville S, Coulon F, Branchereau J, et al. FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody, prevents alloimmunization and allows calcineurin inhibitor minimization in nonhuman primate renal allograft: FR104 prevents allograft rejection. *Am J Transplant* (2015) **15**:88–100. doi:10.1111/ajt.12964
95. Suchard SJ, Davis PM, Kansal S, Stetsko DK, Brosius R, Tamura J, et al. A monovalent anti-human CD28 domain antibody antagonist: preclinical efficacy and safety. *J Immunol* (2013) **191**:4599–610. doi:10.4049/jimmunol.1300470
96. Shiao SL, McNiff JM, Masunaga T, Tamura K, Kubo K, Pober JS. Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities. *Transplantation* (2007) **83**:304–13. doi:10.1097/01.tp.0000251426.46312.d5
97. Yu X-Z, Albert MH, Martin PJ, Anasetti C. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN- γ -dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* (2004) **113**:1624–30. doi:10.1172/JCI20940
98. Yu X-Z, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* (2000) **164**:4564–8. doi:10.4049/jimmunol.164.9.4564
99. Yu X-Z, Martin PJ, Anasetti C. CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation. *J Immunol* (2003) **170**:3002–6. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3002
100. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* (2006) **355**:1018–28. doi:10.1056/NEJMoa063842
101. Zhang T, Fresnay S, Welty E, Sangrampurkar N, Rybak E, Zhou H, et al. Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner: selective CD28 blockade requires CTLA-4. *Am J Transplant* (2011) **11**:1599–609. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03624.x
102. Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol* (2011) **32**:428–33. doi:10.1016/j.it.2011.06.002
103. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* (2010) **363**:711–23. doi:10.1056/NEJMoa1003466
104. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* (2011) **364**:2517–26. doi:10.1056/NEJMoa1104621
105. Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* (2009) **206**:1717–25. doi:10.1084/jem.20082492
106. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, et al. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* (2013) **210**:1695–710. doi:10.1084/jem.20130579
107. Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, et al. Activating Fc receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* (2013) **210**:1685–93. doi:10.1084/jem.20130573
108. Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, et al. Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* (2013) **1**:32–42. doi:10.1158/2326-6066.CCR-13-0013
109. Maker AV, Attia P, Rosenberg SA. Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* (2005) **175**:7746–54. doi:10.4049/jimmunol.175.11.7746
110. Comin-Anduix B, Lee Y, Jalil J, Algazi A, de la Rocha P, Camacho LH, et al. Detailed analysis of immunologic effects of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-blocking monoclonal antibody tremelimumab in peripheral blood of patients with melanoma. *J Transl Med* (2008) **6**:22. doi:10.1186/1479-5876-6-22
111. Ku GY, Yuan J, Page DB, Schroeder SEA, Panageas KS, Carvajal RD, et al. Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* (2010) **116**:1767–75. doi:10.1002/cncr.24951
112. Wang W, Yu D, Sarnaik AA, Yu B, Hall M, Morelli D, et al. Biomarkers on melanoma patient T cells associated with ipilimumab treatment. *J Transl Med* (2012) **10**:146–146. doi:10.1186/1479-5876-10-146
113. Huang RR, Jalil J, Economou JS, Chmielowski B, Koya RC, Mok S, et al. CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clin Cancer Res* (2011) **17**:4101–9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0407
114. Hamid O, Schmidt H, Nissan A, Ridolfi L, Aamdal S, Hansson J, et al. A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* (2011) **9**:204. doi:10.1186/1479-5876-9-204
115. Ji R-R, Chasalow SD, Wang L, Hamid O, Schmidt H, Cogswell J, et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* (2012) **61**:1019–31. doi:10.1007/s00262-011-1172-6
116. Yuan J, Adamow M, Ginsberg BA, Rasalan TS, Ritter E, Gallardo HF, et al. Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**:16723–8. doi:10.1073/pnas.1110814108
117. Cha E, Klinger M, Hou Y, Cummings C, Ribas A, Faham M, et al. Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci Transl Med* (2014) **6**:238ra70. doi:10.1126/scitranslmed.3008211
118. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, Caron E, Ward JP, Nogueira T, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* (2014) **515**:577–81. doi:10.1038/nature13988
119. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature* (2015) **520**:373–7. doi:10.1038/nature14292
120. Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med* (1998) **188**:205–10. doi:10.1084/jem.188.1.205
121. Sandborn WJ, Colombel J, Sands BE, Rugeerts P, Targan SR, Panaccione R, et al. Abatacept for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* (2012) **143**: 62–69. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.010
122. Amezcua-Guerra LM, Hernández-Martínez B, Pineda C, Bojalil R. Ulcerative colitis during CTLA-4Ig therapy in a patient with rheumatoid arthritis. *Gut* (2006) **55**:1059–60. doi:10.1136/gut.2006.095539

123. Sabet-Baktach M, Eggenhofer E, Renner P, Lantow M, Schlitt H, Geissler E, et al. Eomes-expressing CD8+ T cells and Th17 cells mediate costimulatory blockade-resistant allograft rejection in mice. *Am J Transplant* (2015) **15**(Suppl 3):S1.
124. Kim EJ, Kwun J, Gibby AC, Hong JJ, Farris AB, Iwakoshi NN, et al. Costimulation blockade alters germinal center responses and prevents antibody-mediated rejection: costimulation blockade alters GC response. *Am J Transplant* (2014) **14**:59–69. doi:10.1111/ajt.12526
125. Linterman MA, Rigby RJ, Wong R, Silva D, Withers D, Anderson G, et al. Roquin differentiates the specialized functions of duplicated T cell costimulatory receptor genes Cd28 and ICOS. *Immunity* (2009) **30**:228–41. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.015
126. Sage PT, Paterson AM, Lovitch SB, Sharpe AH. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity* (2014) **41**:1026–39. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.005
127. Ville S, Poirier N, Vanhove B, Blanche G. Selective blockade of the CD28/B7/CTLA4 pathway with monovalent anti-CD28 antibodies versus targeting of B7 With CTLA4-Ig, in non-human primate kidney allograft. *Am J Transplant* (2015) **15**(Suppl 3):S1.
128. Petrelli A, Carvello M, Vergani A, Lee KM, Tezza S, Du M, et al. IL-21 is an antitolerogenic cytokine of the late-phase alloimmune response. *Diabetes* (2011) **60**:3223–34. doi:10.2337/db11-0880

Conflict of Interest Statement: Nicolas Poirier and Bernard Vanhove are shareholders and employees in Effimune, a company developing CD28 antagonists. Simon Ville and Gilles Blanche have no conflict of interest to declare.

Copyright © 2015 Ville, Poirier, Blanche and Vanhove. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Thèse de Doctorat

Simon VILLE

Modulation de la triade de costimulation CD28 / CD80-86 / CTLA-4 en transplantation rénale.

Costimulation modulation through the CD28 / CD80/86 / CTLA-4 triad in kidney transplantation.

Résumé

En transplantation rénale, la durée de vie des greffons reste limitée par l'apparition d'une dysfonction chronique secondaire à la néphrotoxicité des CNI, mais aussi à la survenue d'un rejet chronique humoral. La triade CD28 / CD80-86 / CTLA-4, principale voie de costimulation, constitue une cible privilégiée. L'antagonisation de CD80-86, le ligand commun de CD28 et CTLA-4 par le Belatacept (CTLA4-Ig) a démontré améliorer la fonction du greffon tout en limitant l'apparition d'allo-anticorps, mais elle est associée à une augmentation du taux de rejet aigu faisant suspecter un effet délétère du blocage de CTLA-4. Préserver cette voie est le principal atout du FR104, un anti-CD28 Fab' pegylé, développé par notre équipe et ayant fait la preuve de son efficacité préclinique en transplantation rénale chez le primate. L'objectif de cette thèse était, après avoir évalué le FR104 en association avec d'autres immunosuppresseurs, de le comparer directement avec le Belatacept dans un protocole d'immunosuppression sous-optimal, dans lequel 80% des animaux sous Belatacept ont présenté des rejets cortico-résistants contrairement à ceux sous FR104 (40% de rejet, tous cortico-sensibles, avec une fonction rénale stable pendant 1 an). Cette supériorité pouvait être rapportée aux fonctions extrinsèques du CTLA-4 principalement dues aux Tregs, mais aussi aux signaux inhibiteurs directement médiés par CTLA-4. En effet la plus forte expression d'IL-21 dans les biopsies protocolaires des animaux sous CTLA4-Ig faisait suspecter un meilleur contrôle des Tfh (principale source d'IL-21), par le FR104, ce qu'ont confirmé des données in vitro chez l'homme et in vivo dans un modèle murin.

Mots clés

Costimulation, CD28, CTLA-4, transplantation rénale, primate, immunothérapie, lymphocyte T régulateur, Tfh.

Abstract

Kidney graft half-life remain limited by the development of a chronic dysfunction due to CNI nephrotoxicity, but also to the occurrence of a chronic antibody mediated rejection. The major costimulation pathway CD28 / CD80-86 / CTLA-4 triad, represent a new privileged target. Antagonizing CD80-86, the common ligand of CD28 and CTLA-4 with Belatacept (CTLA4-Ig) demonstrated an improvement of renal function associated with a low occurrence of allo-antibody. However Belatacept is associated with an increased risk of acute rejection, suggesting that CTLA-4 blockade could be deleterious. Preserving this pathway, is the main advantage of FR104, an anti-CD28 Fab' antibody pegylated, developed in our team, which proved preclinical efficacy in a model of allotransplantation in primate. The goal of this thesis was, after evaluating FR104 in association with major immunosuppressive drugs, to compare it in head to head with Belatacept in a protocol of suboptimal immunosuppression. In Belatacept group 80% of the animals presented steroid resistant rejection as opposed to animals under FR104 (40% of rejection ever steroid sensitive, followed by a stable renal function during one year). This superiority might be explain by CTLA-4 extrinsic function mainly due to Treg, but also by CTLA-4 intrinsic inhibitory signaling. Indeed IL-21 gene expression was stronger in protocol biopsies of CTLA4-Ig treated animals suggesting that follicular helper T cells, his main source, were better controlled by FR104, as supported by in vitro experiment and data in vivo in mice.

Key Words

Costimulation, CD28, CTLA-4, kidney transplantation, primate, immunotherapy, regulatory T cell, follicular helper T cell.