

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

**COMPLEXITÉ DES MÉCANISMES LIÉS À LA TOLÉRANCE
ET AU REJET CHRONIQUE EN ALLOTRANSPLANTATION**

THESE DE DOCTORAT

Ecole doctorale de CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Caroline BALLET

Le 19 mai 2008 devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs

Jacques PIRENNE, Professeur, Leuven

Thomas FEHR, Docteur, Zurich

Examineur

Olivier THAUNAT, Docteur, Lyon

Directeur de thèse

Jean-Paul SOULILLOU, Professeur, Nantes

Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire.....	4
Liste des figures et tableaux.....	6
Avant-propos.....	8
Introduction	10
I. L'allotransplantation	11
II. Alloreconnaissance T et rejet de greffe	13
A. Le complexe TCR/CMH peptide et activation du lymphocyte T.....	13
B. Les cellules T alloréactives	16
C. Alloreconnaissance par voie de présentation directe.....	17
D. Alloreconnaissance par la voie de présentation indirecte.....	22
E. Alloreconnaissance semi-directe	26
F. Rôle des lymphocytes T « autoréactifs ».....	27
G. Reconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité	29
III. Composante humorale du rejet d'allogreffe	31
A. Diagnostics du rejet humoral de greffe de rein.....	31
B. Diagnostics du rejet humoral de greffe de coeur	34
C. Importance des anticorps dans la détérioration du greffon.....	34
D. Rejets combinés cellulaires et humoraux	35
IV. La tolérance en transplantation.....	36
A. Stratégies d'induction de tolérance par administration d'antigènes du donneur avant la greffe ...	39
B. Stratégies d'induction de tolérance par Blocage de la co-stimulation.....	44
C. Stratégies d'induction de tolérance par des protocoles déplétants	47
D. Stratégies d'induction de tolérance par injection de cellules suppressives.....	49
V. Modèles expérimentaux d'induction de survie à long terme par transfusion de sang du donneur	54
A. Evènements dans les premiers jours suivant la transplantation.....	54
B. Devenir du greffon à long terme : régulation et rejet chronique	60
VI. Barrière à l'induction de tolérance en clinique.....	62
A. Immunité hétérologue	63
B. Prolifération homéostatique	63
VII. Apport de l'étude des patients « opérationnellement » tolérants.....	65
A. Cas de tolérance « opérationnelle ».....	65
B. Mécanismes impliqués dans la tolérance opérationnelle.....	67
C. Marqueurs de la tolérance	69
D. Stabilité de la tolérance « opérationnelle ».....	70
Résultats	71
I. La transfusion de sang du donneur avant la greffe chez le rat : un modèle de rejet chronique humoral (CAMR).....	72
A. Objectifs de l'étude	72
B. Article I	73
C. Conclusions et perspectives	107
II. Etude du statut immunitaire des patients tolérant spontanément une greffe de rein par la vaccination anti-grippale	112
A. Objectifs de l'étude.....	112
B. Article II	113
C. Conclusions et perspectives	120
Conclusion	123
Bibliographie.....	126
Annexes.....	139
ANNEXE I : Chronic rejection of human kidney allografts	140
ANNEXE II : Revisiting tolerance by donor cell priming	156

ANNEXE III : Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: Marginally delayed rejection but
strong alteration of graft infiltration..... 162

Liste des figures et tableaux

<i>Figure 1. Principales voies de costimulation.</i>	16
<i>Figure 2. Bases moléculaires de la reconnaissance directe.</i>	18
<i>Figure 3. Présentation indirecte.</i>	22
<i>Figure 4. Reconnaissance semi-directe des alloantigènes.</i>	27
<i>Figure 5. Activation des lymphocytes T par la reconnaissance de peptides du soi.</i>	28
<i>Figure 6. Principaux agents immunosuppresseurs et leurs cibles.</i>	37
<i>Figure 7. Potentiel des cellules régulatrices dans l'induction de tolérance au greffon chez l'homme.</i>	53
 Tableau 1. Principales cellules suppressives jouant un rôle en transplantation.	49

Liste des abréviations

AICD : Activation Induced Cell Death
ATG : AntiThymocyte Globulin
BAFF : B cell Activating Factor
BDV : Borna Virus
CAMR : Chronic Antibody Mediated Rejection
CAN : Néphropathie Chronique d'Allogreffe
CD : Cluster de Différenciation
CDR : Complementary Determining Region
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA4 : Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein 4
DSG : DéoxySperGualine
DST : Donor Specific Transfusion
DTH : Delayed Type Hypersensitivity
FoxP3 : Forkhead box P3
GITR : Glucocorticoïd-Induced Tumor necrosis factor Receptor
HLA : Antigène Leucocytaire Humain
HSP : Heat Shock Protein
IDO : Indoléamine 2,3 DiOxygénase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
LEW : Lewis
MnHC : Minor HistoCompatibility
NFAT : Facteur Nucléaire d'Activation T
NKT : Natural Killer T
NO : Nitric Oxyde
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1 : Program Death 1
PSMB10 : Proteasome Subunit Beta 10
RAG : Gène d'Activation de la Recombinase
RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction
SCID : Déficit Immunitaire Combiné Sévère
TCR : Récepteur du lymphocyte T
Teff : Lymphocytes T effecteurs
TGF : Transforming Growth Factor
TNF : Tumor Necrosis Factor
Treg : Lymphocytes T régulateurs

Avant-propos

La transplantation est le traitement privilégié et parfois le seul recours dans le cas de pathologies terminales altérant les fonctions de certains organes. Pour prévenir du rejet par le système immunitaire de l'hôte, la transplantation implique néanmoins l'administration de traitements immunosuppresseurs au long cours, sources de complications infectieuses, tumorales ou métaboliques, qui ne prévient pas l'apparition de la dysfonction chronique du greffon [1]. L'objectif majeur dans le domaine de la transplantation est donc de permettre une tolérance spécifique du greffon en l'absence d'immunosuppression.

Dans l'introduction, j'aborderai particulièrement les mécanismes cellulaires impliqués dans le rejet de greffe, et essaierai de décrire comment une meilleure compréhension de cette composante immunologique a conduit au développement de stratégies d'induction de tolérance efficaces chez l'animal, mais parfois vaines dans la prévention du rejet chronique ou dans l'établissement d'une tolérance chez l'homme. J'évoquerai alors la nécessité de poursuivre les efforts dédiés à l'étude des patients greffés tolérant spontanément leur greffon dans la quête de nouvelles stratégies d'induction d'un état de tolérance ou de moyens de détection de cet état chez des patients greffés sous traitement immunosuppresseur.

Dans la partie « Résultats », je présenterai les données acquises lors de l'étude des mécanismes cellulaires et humoraux en jeu dans un modèle d'induction de survie à long terme d'une greffe cardiaque après transfusion de sang du donneur chez le rat où coexistent phénomènes de régulation et lésions de rejet chronique. Je discuterai également les résultats obtenus lors d'une étude ayant fait l'objet d'une publication, qui visait à déterminer, par le biais d'une stimulation immune connue, la vaccination anti-grippale, le statut immunitaire de patients tolérant spontanément leur greffon rénal.

Introduction

I. L'allogreffe

La greffe se définit comme le transfert de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu, le donneur, chez un autre individu, le receveur. Si le donneur est lui-même le receveur, on parle d'autogreffe (lors de greffe de moelle osseuse par exemple). Dans le cas où donneur et receveur sont deux individus génétiquement différents mais appartenant à la même espèce, on parle d'allogreffe (le plus fréquent en greffe d'organe chez l'homme). Si les espèces sont différentes, on parle de xéngreffes. Les premières greffes de reins réalisées avec succès ont eu lieu à Boston en 1954 [2]. Quelques années plus tard ont suivi les greffes de foie en 1967 [3], puis de cœur en 1968 [4].

Un des obstacles à la greffe est la survenue de rejets entraînant la destruction de l'organe greffé. Il existe plusieurs types de rejets qui résultent de la reconnaissance des alloantigènes portés par le greffon par le système immunitaire du receveur.

Le rejet hyper aigu, d'une part, intervient dans les premières heures suivant la greffe. Les anticorps préformés contre les antigènes de groupes sanguins [5], et contre les molécules de CMH à la suite de présensibilisations (transfusions de sang, grossesses, greffes antérieures) sont à l'origine de la réaction immunitaire conduisant à la nécrose du greffon [6]. Ce rejet est désormais évité grâce à la recherche systématique des anticorps préformés dirigés contre le donneur (technique du cross-match).

Le rejet cellulaire aigu, d'autre part, peut survenir dès la première semaine après la greffe. Il est dû à l'activation des lymphocytes T spécifiques d'alloantigènes portés par le greffon (voir chapitre II).

La perte du greffon à long terme quant à elle reste encore mal définie. Elle serait d'origine multifactorielle incluant des phénomènes immunologiques ou non-immunologiques. Lorsque les causes immunologiques du rejet à long terme sont avérées par des marqueurs

diagnostiques spécifiques, notamment dans le domaine de la transplantation rénale, on parle de rejet chronique. Il peut être médié par les anticorps, cellulaire, ou mixte [7].

L'utilisation d'agents immunosuppresseurs pris au long cours permet de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte contre le greffon et ainsi de prévenir le rejet. Si l'introduction dans les années 1990 de nouvelles molécules immunosuppressives a considérablement diminué les taux de rejets aigus, une telle amélioration n'a pas été observée dans la prévention de la perte du greffon à long terme [1].

II. Alloreconnaissance T et rejet de greffe

En transplantation, l'alloreconnaissance fait référence au phénomène par lequel le système immunitaire est capable de reconnaître les antigènes du donneur, considérés comme du non-soi, et de conduire, en l'absence d'immunosuppression, au rejet de greffe. La reconnaissance des alloantigènes, en particulier du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), par les lymphocytes T est l'événement central [8] responsable de l'induction de mécanismes cellulaires et humoraux conduisant au rejet.

A. Le complexe TCR/CMH peptide et activation du lymphocyte T

Les lymphocytes T reconnaissent classiquement par leur récepteur (TCR : T Cell Receptor) des antigènes présentés sous forme de peptides par des molécules du CMH du soi. Le concept de restriction du TCR par les molécules du CMH a été découvert en 1974 par Zinkernagel et Doherty : les lymphocytes T spécifiques d'un virus lysent préférentiellement les cellules infectées si ces dernières présentent les même molécules de CMH qu'eux [9].

1) Les molécules de CMH

Les molécules de CMH se répartissent en deux classes :

Les molécules de classe I, formées par l'association d'une chaîne légère, la $\beta 2$ microglobuline et d'une chaîne lourde polymorphique α ($\alpha 1, \alpha 2$ et $\alpha 3$). Les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont impliqués dans la liaison au peptide (7 à 10 acides-aminés), et le domaine $\alpha 3$ dans la liaison au corécepteur et à la $\beta 2$ microglobuline. Elles correspondent chez l'homme aux Antigènes leucocytaires Humains (HLA) HLA-A, -B et -C. Elles sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules nucléées et présentent classiquement des peptides dérivés de

protéines intracellulaires (protéines endogènes, virales ou bactériennes) aux lymphocytes T CD8⁺. En fait, elles peuvent également être associées à des peptides dérivés de protéines exogènes grâce au phénomène de présentation croisée [10].

Les molécules de CMH de classe II sont constituées de l'association d'une chaîne α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$ non polymorphique) et d'une chaîne β ($\beta 1$ et $\beta 2$ polymorphique). Les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ forment le site de liaison du peptide (13-29 acides-aminés). Elles correspondent chez l'homme aux HLA-DR, -DQ et -DP. Leur expression est restreinte à certaines cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, lymphocytes B, monocytes et macrophages ou les cellules endothéliales en condition inflammatoire [11]). Classiquement, elles présentent des peptides exogènes aux lymphocytes T CD4⁺.

2) Le récepteur des lymphocytes T (TCR)

Le récepteur des lymphocytes T est composé de deux chaînes, α et β (TCR $\alpha\beta$) ou γ et δ (TCR $\gamma\delta$). Il est associé au complexe CD3 qui est impliqué dans l'expression du TCR à la surface des lymphocytes T et dans la transduction du signal. C'est le complexe TCR/CD3/CD8 ou CD4 qui interagit avec les molécules de CMH de classe I ou II respectivement.

Au niveau de certains domaines du TCR, il existe des boucles hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 (Complementary Determining Region) qui interagissent avec le complexe CMH/peptide [12]. Des études cristallographiques ont montré que la boucle CDR2 interagissait principalement avec les molécules du CMH tandis que la boucle CDR3 se lie au peptide [13]. La région CDR1 peut interagir à la fois avec la molécule de CMH et le peptide [14] [12] [15]. De plus, alors que les contacts entre la molécule de CMH et le TCR sont multiples, seul un petit nombre d'acides-aminés, parmi ceux constituant le peptide antigénique, appelés « résidus d'ancrage », permettent la fixation sur la molécule de CMH

[16].

La boucle CDR3 peut modifier sa conformation afin d'entrer en contact avec le peptide, ce qui donne une flexibilité structurelle au TCR et lui permet de reconnaître, par réactivité croisée, un nombre important d'épitopes différents (le nombre d'épitopes de 9 acides aminés reconnus par un seul TCR est estimé entre 10^4 et 10^7). Un seul épitope peut donc également être reconnu par différents TCR (50 à 10^5 TCR différents) [17].

3) *Activation des lymphocytes T naïfs*

L'activation du lymphocyte T, pour être totale, requiert un premier signal constitué de l'interaction du TCR avec le CMH/peptide, au niveau d'une cellule spécialisée dans la présentation antigénique (cellules présentatrices d'antigènes ou CPA), mais aussi d'un second signal, dit de co-stimulation, qui met en jeu des molécules à la surface du lymphocyte T et de la CPA. Elles sont multiples et se répartissent entre la famille CD28 et la famille des TNF récepteurs (figure 1).

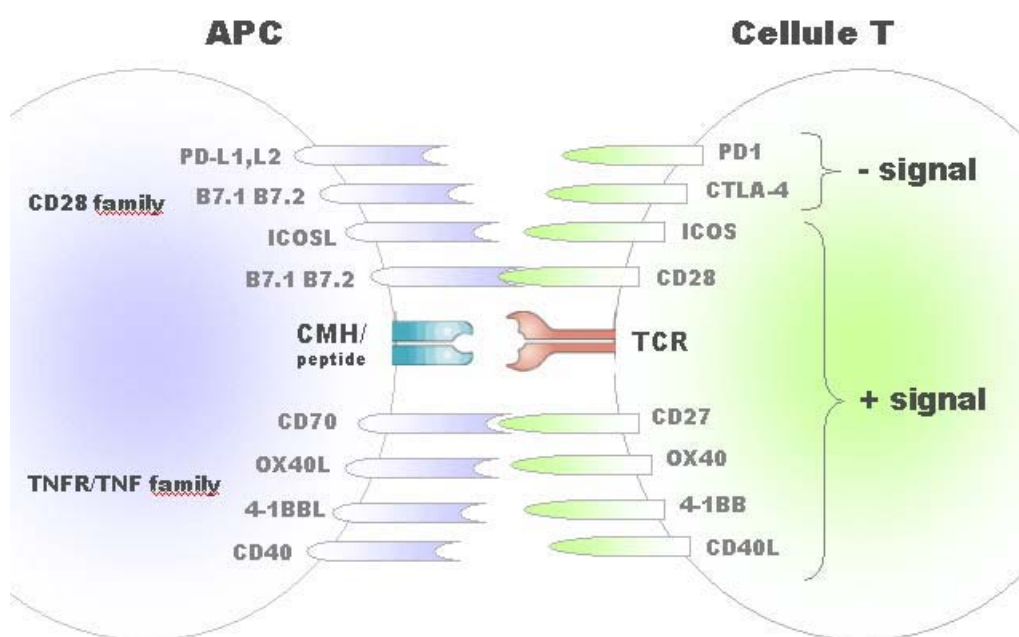


Figure 1. Principales voies de costimulation.

Les molécules de costimulation se répartissent entre la famille CD28 et la famille des TNFR..

Certaines interactions donnent un signal positif d'autres négatif aux lymphocytes T.

En l'absence de co-stimulation efficace, un lymphocyte T naïf ne s'active pas complètement et devient anergique, état transitoire pouvant être levé par l'interleukine 2 (IL2) [18]. Comme nous le verrons plus loin, le blocage de la co-stimulation est une stratégie souvent employée dans des protocoles visant à induire la tolérance au greffon.

B. Les cellules T allo-réactives

Les cellules T allospécifiques, capables de reconnaître l'antigène du donneur, représentent chez un individu 0.1% à 10% du répertoire T chez la souris [19], une fréquence très élevée en comparaison de celle dédiée aux antigènes nominaux (1/100 000) [20]. Ce sont les descriptions des structures cristallographiques du CMH [21] et du récepteur des cellules T (TCR) [22] qui ont permis une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à

l'établissement d'un répertoire T capable de répondre si vigoureusement aux tissus étrangers.

La présence de deux types de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), du donneur ou du receveur, permet de distinguer le rejet de greffe des autres réactions immunitaires. La stimulation des cellules T par les molécules de CMH allogéniques à la surface des CPA du donneur, non classique, s'effectue par la voie « directe » de présentation des antigènes tandis que la reconnaissance des peptides antigéniques du CMH du donneur, présentés par les CPA du receveur, classique, est dite « indirecte ».

C. Alloreconnaissance par voie de présentation directe

1) Bases moléculaires de l'alloreconnaissance directe

En contradiction avec la règle de restriction de reconnaissance de l'antigène par les molécules de CMH du soi, l'activation des cellules T par la voie directe implique la reconnaissance des molécules de CMH allogéniques (du non-soi) intactes à la surface des cellules du donneur (figure 2). Cette reconnaissance semble néanmoins similaire à celle restreinte au soi [23] : Le TCR se fixe au complexe CMH/peptide avec la même orientation, le long du site de fixation du peptide. Les régions CDR1 et CDR2 du TCR reconnaissent des motifs d'ancrage au niveau du CMH, tandis que l'affinité de la région CDR3 assure la spécificité de reconnaissance du peptide.

Pour expliquer l'existence de l'alloreconnaissance directe, deux hypothèses sont communément avancées [24] :

La première suggère une reconnaissance des acides-aminés polymorphiques des molécules de CMH allogéniques par le TCR, indépendamment du peptide logé dans le sillon. Cette hypothèse est soutenue d'une part par le fait que des cellules T sont capables de reconnaître la molécule de CMH en l'absence de peptide [25] et d'autre part par le fait qu'un

clone spécifique d'une molécule de CMH associé à un peptide peut réagir avec la même molécule de CMH associée à un peptide différent [26].

La deuxième hypothèse propose un modèle où la molécule de CMH allogénique, présentant de fortes similarités avec les autres molécules de CMH [27] est reconnue comme du soi [5] [28]. En revanche, le jeu de peptides provenant de protéines cellulaires normales, présentés par les molécules de CMH allogéniques n'est pas semblable au jeu de peptides présentés par les molécules de CMH du soi, en raison de différences entre les allèles au niveau des poches peptidiques [5]. Tout se passe donc comme si un peptide étranger était présenté par la voie classique de présentation indirecte, restreinte au soi, et où chaque peptide présenté est une cible potentielle. Ceci a pour conséquence la mobilisation de lymphocytes T de spécificités très variées, représentant une proportion importante du répertoire T.

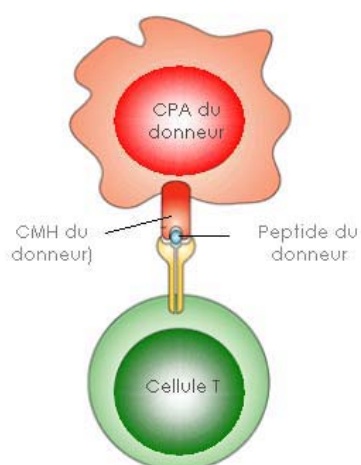


Figure 2. Bases moléculaires de la reconnaissance directe.

Le lymphocyte T alloréactif reconnaît la molécule de CMH du donneur indépendamment du peptide logé dans le sillon ou encore, la molécule de CMH du donneur est reconnue comme du soi. C'est le jeu de peptides présenté par la molécule de CMH du donneur qui diffère et est reconnu comme du non soi par le lymphocyte T alloréactif. Ce peptide peut être issu de protéines du CMH mais aussi de peptides non-polymorphiques ou du complexe mineur d'histocompatibilité. (figure adaptée de [29])

L'existence de l'allorecognition directe découle de la dégénérescence de reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR en principe restreinte au soi. Celle-ci résulte de la polyspécificité intrinsèque du TCR qui fait par ailleurs qu'une cellule T,

sélectionnée par des peptides du soi présentés sur l'épithélium thymique est capable d'une part, de réactivité croisée avec des peptides viraux ou bactériens [30], et d'autre part, de réactivité croisée avec des cibles allogéniques [31]. Finalement, il n'existe pas de ligand « vrai » mais un groupe de ligands pour chaque TCR. Cette dégénérescence pourrait être la conséquence de la capacité de flexibilité du TCR. Des études ont montré par exemple que le TCR 2C pouvait se fixer au même peptide présenté dans le contexte d'une molécule du soi H-2K^b ou du non-soi H2K^{bm3} en réarrangeant sa région CDR3 [23].

2) Importance de la voie de présentation directe dans le rejet d'allogreffe

Plusieurs expériences ont suggéré l'importance de l'alloreconnaissance directe dans le rejet d'allogreffe. Le groupe de Lafferty a observé une prolongation de survie d'allogreffes de thyroïde [32] ou d'îlots pancréatiques [33] déplétées en CPA du donneur (leucocytes « passager »), essentielles à la présentation par voie directe. Le groupe de Lechler et Batchelor ont ensuite obtenu une survie spontanée d'allogreffe de rein chez le rat après placement du greffon chez un hôte intermédiaire conduisant à la perte des leucocytes du donneur. Chez ces animaux, l'injection de cellules dendritiques du donneur rétablit le rejet de greffe [34].

La première preuve de l'implication de l'alloreconnaissance directe a été apportée par le groupe de Gill et *al.* [35]. Dans ces expériences, des lymphocytes T CD4⁺ injectés à des souris immunoincompétentes (SCID ou RAG^{-/-}) sont capables à eux seuls d'entraîner le rejet de greffes de cœurs, sauf si le greffon ne présente pas de molécules de CMH de classe II (CMH Classe II^{-/-}). La reconnaissance directe est donc nécessaire et suffisante pour induire le rejet.

La fréquence des cellules activées par voie directe est prépondérante dans les premiers jours suivant la greffe : 90 % des cellules alloréactives seraient de spécificité directe contre 1

à 5% de spécificité indirecte dans les ganglions lymphatiques [36] [37] [38], suggérant un rôle majeur de cette voie de présentation dans le rejet aigu.

Du fait de la destruction par le système immunitaire des cellules dendritiques du donneur après transplantation [39], et de donc de l'impossibilité pour les cellules de spécificité directe d'être activées à distance de la greffe, il est néanmoins peu probable qu'elles interviennent dans la dysfonction du greffon à long terme. Les cellules T CD4⁺ de spécificité directe peuvent induire le rejet aigu mais pas le rejet chronique de greffe de rein chez le rat [40]. Par ailleurs, on ne détecte pas d'alloréactivité directe dans le sang de patients greffés rénaux présentant une dysfonction chronique du greffon [41].

Cette vision schématique de l'absence de reconnaissance directe dans le processus conduisant au rejet chronique n'est pour autant pas figée (voir revue « Chronic rejection of human kidney allografts » en annexe). Premièrement, on trouve chez des patients greffés rénaux qui présentent un rejet chronique une fréquence plus élevée de cellules réagissant contre des cibles cellulaires tierce partie que chez des patients présentant une fonction stable du greffon, suggérant que des cellules de spécificité directe pourraient réagir de façon croisée avec les antigènes du donneur [42]. Deuxièmement, le fait que les épisodes de rejets aigus soient un facteur de risque du rejet chronique [43] suppose que des cellules mémoires activées pendant le rejet aigu, qui persistent longtemps après la transplantation, pourraient être réactivées à tout moment et conduire au rejet chronique. Troisièmement, les cellules endothéliales du greffon pourraient jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigène et activer les cellules de spécificité directe en l'absence de cellules dendritiques du donneur [44]. Dans un modèle de souris transgénique pour le TCR, des cellules T CD4⁺ de spécificité directe sont capables de médier le rejet chronique de greffe de cœur en l'absence d'autres cellules T ou d'anticorps. L'ajout dans le système de cellules du donneur conduit au rejet aigu de la greffe de cœur suggérant que le degré d'activation de ces cellules joue un rôle dans le

devenir du greffon [45].

3) Mécanismes effecteurs des cellules T allogéniques activées par voie directe

Les cellules T sont d'abord activées au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Lorsque ces derniers sont absents, le greffon est « ignoré » par le système immunitaire [46]. Au sein de ces organes, les CPA du donneur (en particulier les cellules dendritiques) en provenance du greffon [47], portant à la surface les molécules de co-stimulation, permettent une complète activation des lymphocytes T $CD4^+$ (L'activation des lymphocytes T $CD8^+$ nécessite quant à elle la présence de signaux d'activation supplémentaires de la part des $CD4^+$ « helper » [48] qui doivent se trouver dans un environnement proche). Il n'est cependant pas exclu que d'autres cellules puissent être à l'origine de l'activation des cellules T alloréactives. En effet, des $CD8^+$ cytotoxiques portant un TCR naïf ou transgénique de spécificité directe peuvent induire le rejet de greffe de cœurs dont les cellules dérivées de la moelle osseuse (comme les cellules dendritiques) n'expriment pas les molécules de CMH [44]. Dans ce contexte particulier, les cellules endothéliales du donneur pourraient être à l'origine du priming des cellules alloréactives. Le fait que les organes lymphoïdes secondaires ne soient pas absolument requis dans l'établissement de l'alloréponse [49] soutient cette hypothèse.

Une fois activés, les lymphocytes de spécificité directe prolifèrent au niveau des ganglions lymphatiques puis de la rate, surexpriment les marqueurs d'activation CD69 et CD25, perdent l'expression des facteurs, comme CD62L, qui les retiennent au niveau des organes lymphoïdes secondaires, puis infiltrent le greffon, site de leur nouvelle rencontre avec l'antigène [50]. Les lymphocytes T $CD4^+$ helper reconnaissent alors l'antigène présenté par les CPA du donneur, produisent des cytokines pro-inflammatoires de type th1 [51] à l'origine de la réaction d'hypersensibilité retardée et de la lyse des cellules parenchymales (cellules tubulaires rénales ou myocytes cardiaques) par les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ de

spécificité directe. L'altération conjointe des cellules endothéliales du donneur par les CD8⁺ cytotoxiques [44] pourrait participer au phénomène de vasculopathie associé au rejet [52].

D. Alloreconnaissance par la voie de présentation indirecte

1) *Bases moléculaires de l'alloreconnaissance indirecte*

La présentation des alloantigènes par la voie indirecte est la voie classique de présentation des antigènes. Dans ce système les cellules T reconnaissent les déterminants du donneur, en particulier issus des molécules de CMH allogéniques, sous forme de peptides apprêtés et présentés dans le contexte des molécules de CMH du soi par les cellules présentatrices d'antigène du receveur (figure 2).

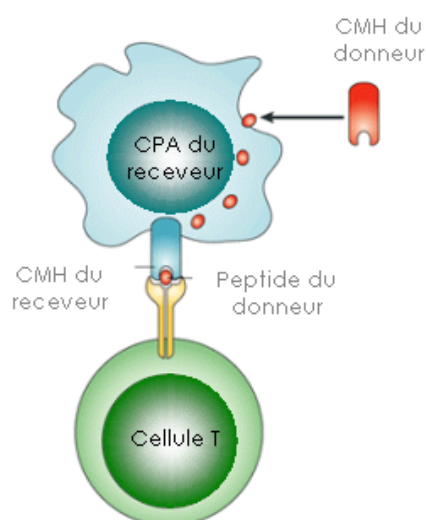


Figure 3. Présentation indirecte.

Les peptides issus des molécules de CMH du donneur sont présentés par une cellule présentatrice du receveur à un lymphocyte T alloréactif. Des peptides du soi cryptiques ou issus des molécules du complexe mineur d'histocompatibilité du donneur peuvent aussi être présentés par cette voie.

C'est le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre des complexes CMH-peptides particuliers qui a permis de montrer l'existence de peptides dérivés du CMH du donneur présentés par d'autres molécules de CMH. L'anticorps Y-Ae par exemple reconnaît un peptide dérivé de la chaîne α de la molécule H2-E présenté dans le contexte des molécules

H2-A^b. Lorsque des cellules dendritiques portant la molécule H2-E sont injectées à des receveurs H2-Ab, une certaine proportion de cellules dendritiques de l'animal receveur sont marquées par l'anticorps Y-Ae dans les ganglions lymphatiques [53].

La majorité des peptides reconnus lors d'une greffe provient des molécules de CMH du donneur et non des antigènes mineurs [36]. Ce phénomène peut être la conséquence des mécanismes conduisant à l'établissement du répertoire T allogénique pendant l'ontogénie. En effet un lymphocyte T, pour être sélectionné positivement, doit pouvoir reconnaître avec une affinité intermédiaire, un peptide du soi cryptique (généralisé en trop faible quantité pour entraîner l'élimination des cellules autoréactives [54] présenté dans le contexte des molécules de CMH autologues [55]. Or, la majorité des peptides présentés par l'épithélium thymique provient des molécules de CMH du soi elles-mêmes [56]. Une certaine fréquence de cellules reconnaissant des peptides du CMH du soi peut donc gagner la périphérie et réagir de façon croisée avec les peptides provenant de CMH allogéniques (c'est la réactivité croisée minimale).

Le fait que davantage de peptides issus des molécules de CMH de classe II soient présentés (Il existe une source importante de molécules de CMH de classe II instables, qui ne contiennent pas de peptides, susceptibles d'être dégradées et présentées par les molécules de classe II elles-mêmes dans le compartiment MIIC [57]) explique l'importance de la compatibilité des molécules de classe II dans la survie à long terme du greffon [58].

2) Rôle de la voie de présentation indirecte dans le rejet

Plusieurs expériences ont montré que l'alloréponse indirecte est une composante importante du rejet de greffe. Premièrement, en l'absence de réponse directe, la réponse indirecte peut conduire au rejet de greffe. En effet, dans un modèle où le receveur est déficient en lymphocytes T CD8⁺, le rejet d'une greffe de classe II-/- ne peut être que la conséquence

de la reconnaissance de peptides de classe I du donneur présentés aux lymphocytes T CD4⁺ du receveur par les CPA autologues [59]. Deuxièmement, une réponse indirecte contre des peptides issus des régions polymorphiques des molécules de CMH, dépendante de la souche répondeuse, est détectée chez des animaux sensibilisés par une greffe de peau [60], de cœur [61, 62] ou de rein [63] [64]. Le rejet de greffe peut par ailleurs être accéléré par une sensibilisation aux molécules de MHC allogéniques [65] ou aux peptides issus des régions polymorphiques des molécules de CMH du donneur [66] en l'absence de cellules dendritiques du donneur [67]. Si la voie de présentation indirecte n'avait pas d'importance dans le rejet, ces stratégies n'auraient pas d'effet sur la survie du greffon. Enfin, les effets bénéfiques de l'injection par voie tolérogène (orale, thymique ou veineuse) de peptides du donneur sur la survie du greffon (cf. chapitre sur l'induction de tolérance) sont autant de preuves de l'importance de la voie indirecte dans le rejet [68] [69].

Contrairement à la voie directe de présentation des antigènes, prédominante dans le rejet aigu, la voie indirecte serait impliquée dans le rejet chronique d'allogreffe. La présentation continue des antigènes en provenance du greffon par les cellules du receveur augmente la fréquence des cellules alloréactives. De plus les cellules de spécificité indirecte seraient peu sensibles aux traitements immunosuppresseurs conventionnels [70]. La réponse indirecte contre des antigènes nominaux (notamment viraux) est préservée chez des patients transplantés sous immunosuppression [71]. En outre, certaines cellules de spécificité indirecte sont détectées dans le sang de patients transplantés présentant une dysfonction chronique du greffon [41] [72] [73] [74] [75]. Enfin, le peu de cellules activées par la voie indirecte (leur fréquence est 100 à 1000 fois plus faible que celle des cellules activées par voie directe [38]) pourrait conduire à une atteinte faible mais progressive de l'organe greffé, caractéristique du rejet chronique.

Il existe une hiérarchie dans la reconnaissance des peptides allogéniques au cours de la

réponse immune. Lors du rejet aigu, les cellules alloréactives sont dirigées contre un ou quelques peptides dits immunodominants issus des régions polymorphiques des molécules de CMH [38] [76]. Malgré leur capacité à être apprêtés, présentés et à induire une réponse T après immunisation sous-cutanée, certains peptides allogéniques dits cryptiques, ne mobilisent pas de cellules alloréactives durant la première phase de rejet [77]. Cette hiérarchie dans la reconnaissance des peptides n'est pour autant pas figée. Il existe en effet une extension de la réponse indirecte à des peptides allogéniques issus d'autres régions hypervariables de la molécules de CMH (« intramolecular spreading ») ou à d'autres molécules du CMH (« intermolecular spreading ») lors d'épisodes de rejets multiples ou lors du rejet chronique chez des patients receveurs de cœurs [78].

3) Mécanismes effecteurs des cellules T activées par voie indirecte

Les cellules alloréactives de spécificité indirecte sont d'abord activées dans les organes lymphoïdes secondaires par les CPA autologues ayant capturé l'antigène dans le greffon [60]. Alors que les antigènes exogènes sont classiquement présentés sur les molécules de classe II aux lymphocytes T CD4⁺, il est maintenant clairement établi qu'ils peuvent être présentés de façon croisée (cross-priming) aux lymphocytes T CD8⁺ [10]. Néanmoins, comprendre comment des cellules activées par voie indirecte peuvent interagir avec les antigènes exprimés sur le greffon n'est pas chose simple. Il est possible que les cellules endothéliales vasculaires dérivées du receveur et ayant colonisé les vaisseaux du greffon soient les cibles de l'indirect, conduisant à la destruction ischémique du greffon [79] ou encore que la reconnaissance de monocytes ou macrophages de l'hôte présents dans le greffon induisent une réactivation des lymphocytes de spécificité indirecte à l'origine d'une réaction d'hypersensibilité retardée endommageant les tissus environnants (« bystander killing ») [80]. De plus cette interaction pourrait entraîner le relargage par les macrophages de TNF α , de

radicaux oxygénés ou de NO (Nitric oxyde), toxiques pour le greffon. Par ailleurs les lymphocytes $CD4^+$ de spécificité indirecte pourraient faciliter l'activation des $CD8^+$ de spécificité directe [81] ou la production d'IgG [82] et entraîner la lyse des cellules parenchymales du greffon.

E. Alloreconnaissance semi-directe

Il est admis que pour être tout à fait opérationnel, un lymphocyte T $CD8^+$ doit recevoir des signaux d'activation sous la forme de cytokines produites à proximité par un lymphocyte T $CD4^+$ « helper » [48]. Dans cette configuration dite de « linked help », les deux types cellulaires sont activés par la même CPA. L'amplification de la réponse médiée par des lymphocytes T $CD8^+$ de spécificité directe par des T $CD4^+$ de spécificité indirecte [81], ou « unlinked help », nécessite quant à elle la présence simultanée de CPA du donneur (pour activer les $CD8^+$) et du receveur (pour activer les $CD4^+$).

Une alternative à la présence des 4 types cellulaires pourrait venir de la présentation dite « semi-directe » de molécules de CMH de classe I du donneur par les CPA du receveur (voir pour revue [83]). Ce transfert de complexes moléculaires d'une cellule à l'autre pourrait se faire par l'intermédiaire des exosomes [84] [85]. Ainsi une même CPA du receveur pourrait présenter aux cellules T $CD8^+$ de spécificité directe les molécules de classe I allogéniques et aux cellules T $CD4^+$ les molécules de classe II.

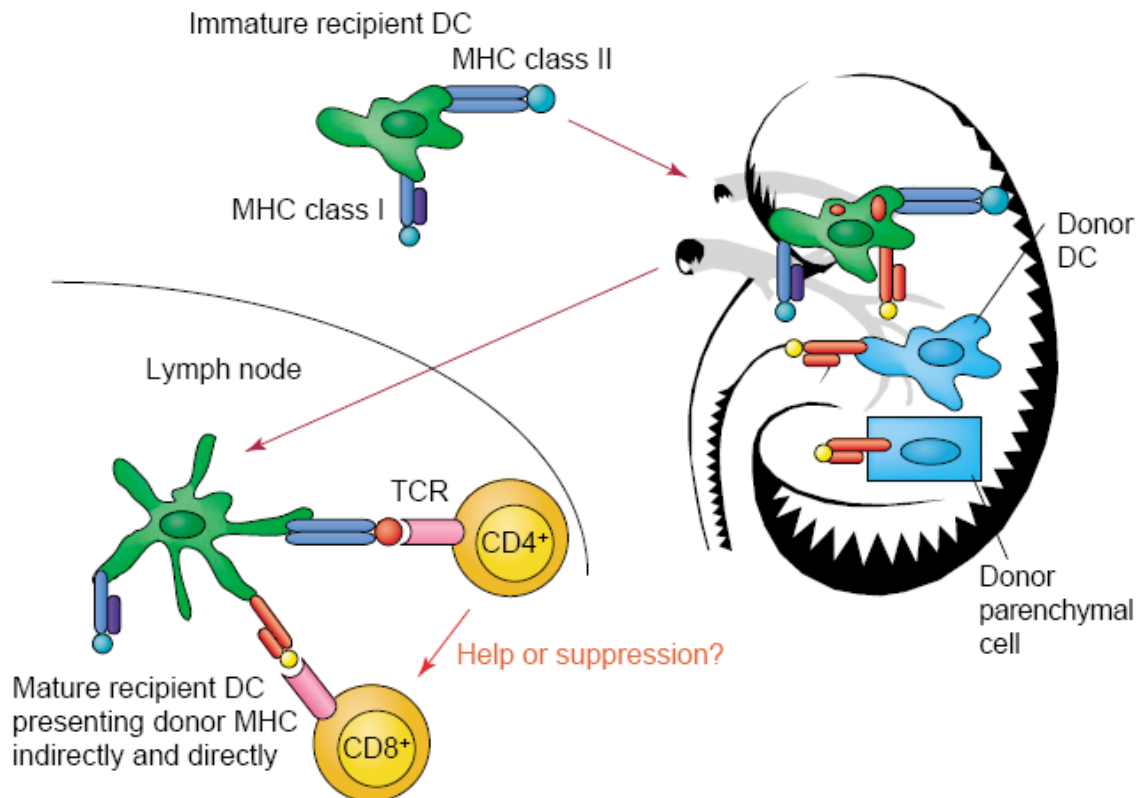


Figure 4. Reconnaissance semi-directe des alloantigènes.

La CPA du receveur acquiert à sa surface au niveau du greffon les molécules entières de CMH du donneur. Dans les organes lymphoïdes, elle présente à la fois l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ de spécificité indirecte et aux lymphocytes T CD8⁺ de spécificité directe. La proximité des deux types cellulaires rendue possible par la CPA permet alors aux CD8⁺ de recevoir l'aide auxiliaire nécessaire à leur activation ou régulation (D'après [83])

F. Rôle des lymphocytes T « autoréactifs »

1) Reconnaissance directe et indirecte du CMH autologue

Du principe de génération du répertoire T allogénique de spécificité indirecte dans le thymus découle l'hypothèse d'une réactivité T autoimmune durant la réponse immunitaire dirigée contre le greffon. En effet, certains lymphocytes T autoréactifs, spécifiques de

peptides du soi cryptiques ou des lymphocytes T résiduels, spécifiques de peptide du soi dominant et ayant échappé à la sélection négative durant l'ontogénie, pourraient être activés lors du rejet de greffe du fait du contexte inflammatoire. Ils pourraient ensuite reconnaître de façon croisée le CMH allogénique de façon directe ou indirecte. L'immunisation d'une souris receveuse avec un peptide du soi induit une réactivité croisée contre un déterminant issu d'une molécule de CMH allogénique [86]. Ceci pourrait aussi entraîner des réactions d'autoimmunité lors du rejet. Cette hypothèse est soutenue par une étude du groupe de Fedeseyova *et al* qui montre qu'après une greffe, la réponse T indirecte dirigée contre un peptide issu des molécules de CMH allogéniques peut rompre la tolérance à un peptide issu des molécules de CMH du soi [87].

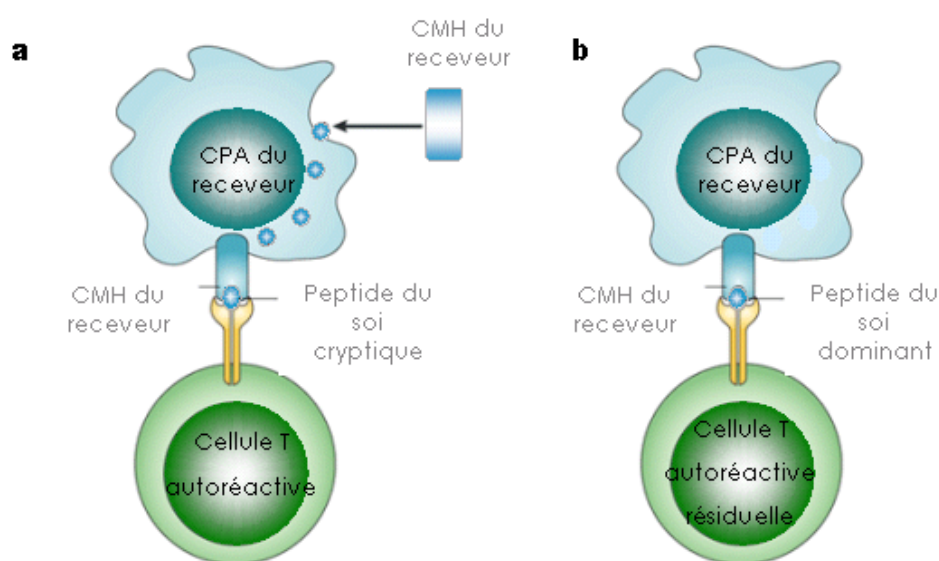


Figure 5. Activation des lymphocytes T par la reconnaissance de peptides du soi.

(a) Une cellule T autoréactive spécifique d'un peptide cryptique est activée par la présentation indirecte de ces peptides dans un contexte inflammatoire. **(b)** Des lymphocytes T autoréactifs résiduels ayant échappé à la sélection négative dans le thymus sont activés durant la greffe.

2) *Reconnaissance des protéines non-polymorphiques*

Comme pour les molécules de CMH, il est possible que le jeu de peptides provenant de protéines conservées d'un individu à l'autre (non issues du CMH) présenté sur les molécules de CMH allogéniques, diffère de celui présenté par le soi. Les complexes CMH allogéniques-peptide du soi allogénique représenteraient donc une cible pour les cellules T allogéniques de spécificité directe. Ainsi, les CPA du donneur pourraient induire une réponse contre des déterminants de protéines non polymorphiques, par le biais de la reconnaissance directe.

Par ailleurs, l'importante inflammation qui suit la transplantation pourrait conduire au dépassement du seuil d'activation des cellules autoréactives ayant échappé à la sélection négative dans le thymus grâce à leur spécificité pour des peptides cryptiques issus de protéines non-polymorphiques et dont la présentation indirecte par les cellules du receveur serait elle favorisée par la détérioration des tissus.

Des cellules spécifiques de la myosine cardiaque [88], de la vimentine [89], du collagène V [90] [91] ou de la protéine de choc thermique (HSP) [92] contribueraient ainsi au rejet de greffe.

G. Reconnaissance des antigènes mineurs d'histocompatibilité

En plus des molécules de CMH, les cellules T alloréactives peuvent reconnaître des peptides issus d'autres protéines polymorphiques présentés à la surface des cellules du receveur (reconnaissance indirecte) [93] ou des cellules allogéniques (reconnaissance directe) [94] par des molécules de CMH partagées par le donneur et le receveur. Ces peptides constituent le groupe des antigènes mineurs d'histocompatibilité (MnHC pour Minor histocompatibility). Par exemple, des cellules T CD8⁺ de femelles, spécifiques d'un peptide

mineur d'histocompatibilité H-Y issu d'individus mâles, peuvent conduire au rejet de greffes mâles syngéniques [95]. Dans des modèles murins de greffe de cœur, ces antigènes sont à l'origine du rejet de greffe de peau [96] ou de cœurs [97] en l'absence d'incompatibilités au niveau de CMH. En outre, des lymphocytes T CD8⁺ humains spécifiques d'antigènes mineurs ont pu être mis en évidence dans des greffons rénaux au moment du rejet cellulaire aigu [98].

III. Composante humorale du rejet d'allogreffe

Ces 50 dernières années, la majorité des stratégies thérapeutiques visant la prévention du rejet en transplantation a ciblé la réponse immunitaire à médiation cellulaire T. S'il est vrai que la plupart des rejets aigus peuvent être empêchés par le biais de ces traitements, d'autres formes de rejet aigu persistent, tout comme persiste le rejet chronique [99]. Depuis quelques années, le rôle des anticorps dans les rejets hyperaigu, aigu et chronique est admis, et des critères bien définis permettent de diagnostiquer ces rejets humoraux, notamment depuis l'accumulation des études permettant la visualisation des dépôts de C4d dans les greffons et montrant leur association avec la présence d'anticorps contre le donneur et l'observation de lésions de rejet.

A. Diagnostics du rejet humoral de greffe de rein

1) Rejet humoral hyperaigu

Cette forme de rejet intervient dans les premières heures suivant la transplantation. Les anticorps préformés contre les antigènes de groupes sanguins [5], et contre les molécules de CMH à la suite de pré-sensibilisation (transfusions de sang, grossesses, transplantations antérieures) sont à l'origine de la réaction immunitaire conduisant à la nécrose du greffon [6, 100]. Histologiquement, cette forme de rejet est caractérisée dans le cas d'une greffe de rein par la présence de neutrophiles et de plaquettes dans les glomérules et les capillaires péri-tubulaires, de dépôts de fibrine et d'une nécrose corticale associée à celle d'IgG dans les glomérules et capillaires péri-tubulaires [6]. Cette forme de rejet est néanmoins devenue rare grâce aux techniques de cross-match facilitant la détection d'anticorps préformés contre le

donneur (PRA pour Panel reactive antibody) et grâce aux traitements, comme la plasmaphérèse, permettant de les éliminer [101].

2) Rejet humoral aigu (Acute Antibody-Mediated Rejection AAMR)

Alors que le rejet cellulaire aigu (dû à l'activation des lymphocytes T spécifiques d'alloantigènes portés par le greffon) qui peut survenir dès la première semaine après la transplantation, est devenu moins fréquent grâce aux traitements immunosuppresseurs, une forme de rejet aigu liée à la présence d'anticorps, de plus en plus caractérisée ces dernières années, persiste. Plusieurs critères de diagnostic de l'AAMR, comme la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (DSA pour Donor-specific antibody), et dans le cas de la greffe de rein, la présence de neutrophiles dans les capillaires péri tubulaires, l'infiltration de monocytes/macrophages dans les glomérules ont été d'abord définis mais se sont avérés peu spécifiques. C'est la démonstration de la présence de dépôts de C4d, qui se fixe de façon covalente aux tissus et notamment aux capillaires péri tubulaires après activation du C4, la molécule du complément dont il est issu, associée avec le risque de perdre le greffon dans les premiers jours suivant la greffe, qui a permis un meilleur diagnostic de cette pathologie [102]. Depuis, des études montrant une corrélation entre la présence de C4d dans les capillaires péri tubulaires et la présence d'anticorps spécifiques du donneur et de lésions tissulaires aiguës [103, 104] ont permis de définir les critères morphologiques, immunohistologiques (dépôts de C4d) et sérologiques (anticorps anti-donneur circulants) spécifiques de l'AAMR [7].

3) Rejet humoral chronique (Chronique Antibody-Mediated Rejection CAMR)

Le rejet chronique survient par définition après 3 à 6 mois de greffe. Le tableau clinique est le plus souvent non spécifique, associant une dégradation lente et progressive de la fonction rénale à une protéinurie et une hypertension artérielle. Récemment a été montré le rôle pathogène des anticorps dans la dysfonction chronique du greffon : 3 à 5% de perte supplémentaire de greffon à 1 an chez des patients présentant des anticorps spécifiques du donneur [105]. Les lésions caractéristiques du rejet chronique (glomérulopathie d'allogreffe et une endartérite fibroproliférative) sont associées dans 61% des cas à une fixation de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires avec dans 88% des cas C4d+ l'existence d'anticorps circulants spécifiques du donneur. Dans cette étude, 1 patient seulement parmi 21 présentant une dysfonction chronique du greffon non spécifique de rejet chronique mais associé à une néphrotoxicité de la cyclosporine, était C4d+ [106]. La déposition de C4d est par ailleurs significativement corrélée à la glomérulopathie du transplant ainsi qu'à l'aspect feuilleté ou multilamellaire des membranes basales des capillaires péri-tubulaires, caractéristiques du rejet chronique [107]. En 2005, la notion de « rejet humoral chronique actif » (CAMR Chronic Antibody-Mediated Rejection) et ses critères diagnostiques ont été introduits à la classification de Banff 05. Ces critères incluent, comme pour l'AAMR, des aspects immunopathologiques (C4d dans les capillaires péri-tubulaires) sérologiques (anticorps anti-donneur) et histologiques (glomérulopathie d'allogreffe et/ou aspect feuilleté de la basale des capillaires péri-tubulaires et/ou une fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire et/ou endartérite fibroproliférative) [7].

B. Diagnostics du rejet humoral de greffe de coeur

Le rejet humoral de greffe de cœur en tant qu'entité réelle n'est quant à lui pas totalement admis. Cependant certains critères diagnostiques de l'AMR ont été proposés à partir de l'analyse de biopsies endomyocardiques, comme les changements de l'endothélium des capillaires, la présence de macrophages et neutrophiles dans ces capillaires, un œdème interstitiel, associés à des critères immunopathologiques tels que les dépôts d'IgG/IgM, et/ou IgA et des dépôts de compléments (C3d, C4d et/ou C1q dans les capillaires) et/ou un marquage CD68 des macrophages. Il est aussi recommandé de vérifier la présence d'anticorps circulants HLA de classe I ou II et la présence d'anticorps non-HLA. Le rejet à médiation humorale a été associé au développement du rejet chronique de greffe de coeur (Allograft coronary artery disease CAD) [108].

C. Importance des anticorps dans la détérioration du greffon

Les anticorps jouant un rôle majeur dans le rejet de greffe sont principalement spécifiques des molécules de CMH du donneur présents à la surface de toutes les cellules nucléées et en particulier des cellules endothéliales qui sont les premières cibles en allotransplantation. D'autres anticorps dirigés contre des molécules non-HLA, ou antigènes mineurs d'histocompatibilité, sont aussi impliqués. La molécule non classique de CMH de classe I MICA exprimée à la surface des cellules endothéliales serait une cible du système immunitaire [109, 110]. Enfin, des auto-anticorps pourraient participer au rejet, comme ceux dirigés contre le récepteur de type I à l'angiotensine II dans le rejet aigu de greffe de rein [111], les anticorps anti-vimentine [112] et anti-myosine dans le rejet de greffe de cœur [113],

ou ceux dirigés contre le collagène ou le perlecan dans des modèles animaux de rejet chronique de greffe de rein [114].

D. Rejets combinés cellulaires et humoraux

La classification nécessaire des différentes formes de rejet « chronique » ou « aigu », basée sur des critères cliniques, s'avère peu compatible avec l'observation histologique. En effet, les lésions aiguës sont dans ce contexte plutôt définies comme étant l'origine d'un processus conduisant progressivement aux lésions chroniques. La frontière entre le rejet « humoral » et le rejet « cellulaire » est de la même façon difficile à établir. Les rejets purement « humoraux » (« pure » AMR) représentent en fait une faible proportion des épisodes de rejet aigu (5 à 10%). Le plus souvent, le rejet humoral (C4d+) est associé à une présence cellulaire (AMR-CMR) [115]. Ce phénomène doit être pris en compte dans l'attribution des traitements afin de cibler au mieux la réponse immunitaire.

IV. La tolérance en transplantation

En raison de l'augmentation des besoins et du manque d'organes disponibles, la transplantation est victime de son propre succès [98]. De plus, si l'introduction de nouveaux traitements immunosuppresseurs [116] a permis une nette amélioration de la survie à court terme des greffons, ces traitements présentent le désavantage de cibler la réponse cellulaire de façon aspécifique. Les agents immunosuppresseurs les plus couramment utilisés sont les anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre le TCR, les inhibiteurs des calcineurines comme la cyclosporine ou le tacrolimus qui bloquent la signalisation consécutive à l'interaction du TCR avec son ligand, les anticorps dirigés contre le récepteur à l'interleukine 2 (Il2). D'autres agents ont été récemment introduits comme le sirolimus ou l'everolimus, deux inhibiteurs des protéines mTOR. Conséquence de leur aspécificité, ces traitements ont de nombreux effets secondaires : ils augmentent de façon significative le risque de développement de cancers, d'infections opportunistes, de maladies cardiovasculaires ou de désordres métaboliques, chacun des ces effets secondaires ayant un impact négatif sur la survie à long terme du greffon [117]. De plus, ces agents montrent peu d'efficacité dans le traitement de la dysfonction chronique du greffon qui est la cause principale de la perte du greffon un an après la transplantation [118]. Ils pourraient même, comme les inhibiteurs des calcineurines, contribuer au développement du rejet chronique chez des patients receveurs de cœurs, reins, poumons ou foies [119].

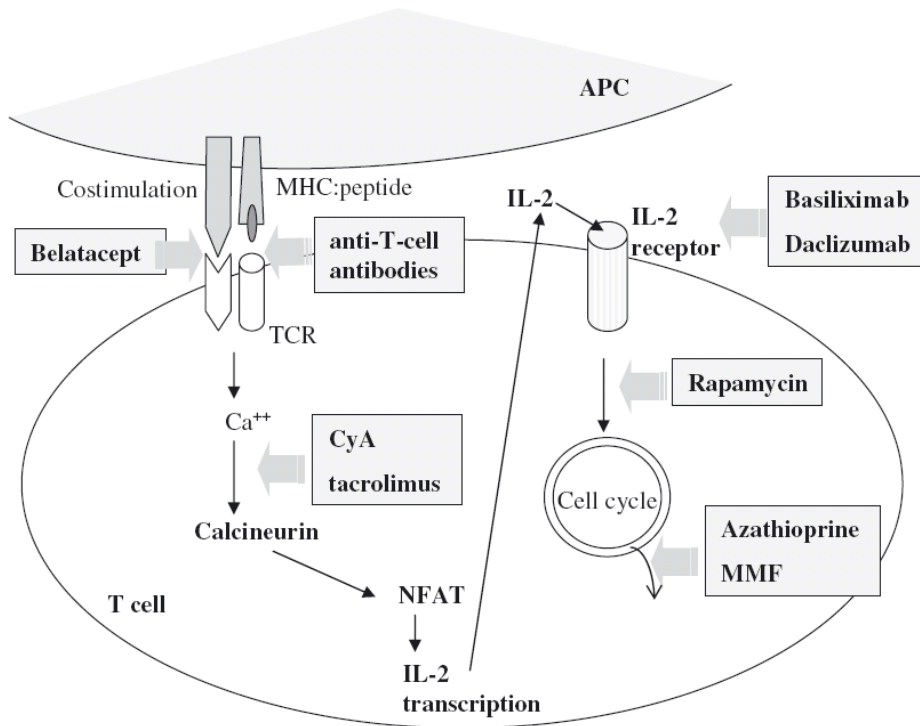


Figure 6. Principaux agents immunosuppresseurs et leurs cibles.

Le signal 1 est délivré par l'interaction du TCR avec son ligand sur la CPA qui induit l'activation des calcineurines, un processus bloqué par la cyclosporine A ou le Tacrolimus. Les calcineurines déphosphorylent le facteur nucléaire d'activation T (NFAT) qui se fixe sur le promoteur de l'IL2. Les signaux de costimulation (signal 2) nécessaires à la transcription optimale du gène de l'IL2 peuvent être bloqués par le belatacept. La prolifération induite par l'interaction de l'IL2R avec son ligand peut être interrompue par des anticorps anti IL2R ou la rapamycine mais aussi par le blocage de la synthèse des purines par l'azathioprine ou le mycophenolate mofetil qui empêche la réplication de l'ADN.

Pour continuer à améliorer le devenir des greffons, il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies visant à prévenir les rejets aigu et chronique tout en arrêtant les traitements immunosuppresseurs, c'est-à-dire de promouvoir un état de tolérance

spécifique du greffon.

La « vraie » tolérance en transplantation est définie par une bonne fonction du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur et de signes histologiques de rejet chez un hôte immunocompétent capable d'accepter une seconde greffe du même donneur et de rejeter une greffe d'un autre donneur. Comme nous allons le voir, chez les rongeurs, cet état peut être obtenu de différentes façons. Néanmoins, la tolérance ne semble pas être forcément un état permanent [120] et le fait que de plus en plus d'animaux apparemment « tolérants » présentent des signes de rejet chronique [121-123] a favorisé l'introduction du terme de « survie à long terme » pour distinguer la vraie tolérance de la prévention du rejet aigu. Chez l'homme, il est plus difficile de définir la « vraie » tolérance car vérifier la spécificité du donneur par la greffe d'un second organe n'est pas réalisable en clinique. On parle alors plutôt de tolérance « opérationnelle ».

Comme pour la tolérance naturelle, la tolérance en transplantation, par le contrôle de la réactivité cellulaire T, met en jeu deux mécanismes principaux :

La tolérance centrale : Dans un contexte naturel, elle est nécessaire pour éliminer les lymphocytes qui reconnaissent avec trop d'affinité les antigènes présentés par l'épithélium thymique et maintenir ainsi la tolérance au soi. Dans le cadre de la transplantation, la présence d'antigène du donneur au niveau du thymus, peut permettre la délétion des cellules T alloréactives.

La tolérance périphérique : Comme dans le contexte physiologique où elle permet le contrôle des lymphocytes autoréactifs et le maintien de la tolérance au soi après établissement du répertoire T, la tolérance périphérique en allotransplantation est le résultat de quatre

mécanismes complémentaires :

- L'induction d'une inactivité des lymphocytes T alloréactifs (anergie) : les cellules du système sont incapables de monter une réponse contre un antigène. Elle est la conséquence d'une activation incomplète des lymphocytes T à la suite du blocage de la co-stimulation. L'anergie persiste lors de nouvelles rencontres avec l'antigène mais peut être levée par l'ajout d'IL2 [18].
- La suppression de fonction des lymphocytes T activés par le biais de cellules régulatrices ou de facteurs immunomodulateurs (régulation).
- La délétion des lymphocytes alloréactifs par apoptose (AICD pour Activation Induced Cell Death) [124] .
- L'indifférence vis-à-vis des alloantigènes (ignorance) : les antigènes du donneur ne peuvent atteindre le système lymphoïde du receveur (absence de drainage lymphatique [46]) ou les cellules du système immunitaire du receveur ne peuvent entrer dans le greffon comme cela se voit pour les organes non vascularisés (comme la cornée).

Les stratégies thérapeutiques visant à entraîner une tolérance en transplantation (voir pour revue [125]) reposent sur l'induction d'un de ces mécanismes ou de l'association de plusieurs d'entre eux .

A. Stratégies d'induction de tolérance par administration d'antigènes du donneur avant la greffe

1) Administration de l'antigène par voie sanguine

L'effet bénéfique, bien que paradoxal, des transfusions de sang avant la greffe est connu depuis des décennies [126] et a entraîné, dans les années 1970, l'introduction dans de

nombreux centres de transplantation de transfusions de sang délibérées avant la greffe. Certains protocoles ont aussi utilisé les transfusions de sang spécifiques du donneur avant une greffe de rein, ce qui a eu pour conséquence d'améliorer la survie du greffon [127, 128]. Il apparaît une diminution de la réponse cytolytique contre le donneur chez ces patients [129, 130], et ceci notamment lorsqu'ils partagent un antigène HLA avec le sang transfusé [131]. L'effet bénéfique de la compatibilité HLA DR en particulier sur la survie du greffon a été montré en transplantation rénale et cardiaque [132] [133]. Le sang transfusé doit par ailleurs contenir des leucocytes pour induire un effet [134].

Plusieurs hypothèses sur les mécanismes en jeu dans l'effet transfusionnel ont découlé de ces observations. Une première explication possible pourrait venir de la diminution des molécules de co-stimulation à la surface des cellules présentatrices transfusées, ce qui se produit lorsque le sang est conservé longtemps. Un défaut d'activation des cellules immunitaires du receveur spécifiques du donneur qui s'en suivrait pourrait les conduire à un état d'anergie, à l'origine d'une plus faible réponse contre le greffon [135]. Des éléments solubles contenus dans le sang transfusé tels que des molécules HLA ou Fas [136] pourraient par ailleurs moduler la réponse immunitaire. Une dernière hypothèse implique l'activation des cellules régulatrices de type $CD4^+$ induites à la suite de la rencontre avec un peptide allogénique issu des molécules incompatibles du donneur présenté dans le contexte du soi (molécules HLA DR partagée) à la surface des cellules du sang transfusé. Elles seraient alors capables de tuer directement les cibles allogéniques du greffon (à la condition que les cellules du greffon expriment le même peptide allogénique dans le contexte du HLA DR partagé [137]), et présenteraient un profile cytokinique différent de celui des cellules $CD4^+$ activées par la présentation de peptides allogéniques sur une molécule HLA DR incompatible. Elles produiraient plus d'Il10 [138], une cytokine favorable à la différenciation de cellules dendritiques tolérogènes, c'est-à-dire capables d'induire à leur tour des cellules régulatrices

[139].

Néanmoins, le fait que les transfusions de sang puissent entraîner une immunisation, notamment la production d'anticorps anti-HLA, rend la transplantation ultérieure difficile chez certains sujets. Devant ce risque [129] et l'efficacité inconstante des transfusions [140] même en cas de transfusions avec le sang du donneur et avec l'introduction de traitements immunosuppresseurs efficaces dans les années 1980, les protocoles de transfusions systématiques ont été abandonnés.

Plusieurs modèles expérimentaux de transfusions de cellules ou de sang du donneur, seuls ou en association avec des molécules bloquant la co-stimulation, ont été développés, conduisant à une survie prolongée du greffon, et même à une tolérance spécifique. Selon les combinaisons et le type de greffe, le maintien de la survie du transplant dépend de la délétion des clones alloréactifs, de l'induction d'une anergie ou de cellules régulatrices, ou de plusieurs de ces mécanismes à la fois.

Ces modèles sont utiles à la compréhension des mécanismes impliqués chez l'homme mais sont aussi de bons outils pour améliorer les stratégies d'induction de tolérance en clinique. Nous reviendrons plus longuement dans le chapitre suivant sur les modèles d'induction de survie à long terme du greffon après transfusion de sang du donneur chez le rongeur lorsqu'elle est effectuée sans traitement additionnel, notamment lors de la greffe de cœur issu d'un rat LEW.1W à un receveur LEW.1A, modèle sur lequel ont porté mes travaux.

2) Administration intrathymique de l'alloantigène

Reposant sur le principe de délétion centrale des cellules autoréactives, la stratégie d'injecter des antigènes du donneur sous formes de cellules, de protéines ou de peptides du CMH du donneur dans le thymus de receveurs adultes a pour but d'entraîner l'élimination des cellules T alloréactives. Posselt et al. ont été les premiers à décrire que l'injection

intrathymique d'îlots de pancréas allogéniques pouvait induire une tolérance spécifique du donneur à une greffe allogénique ultérieure [141]. Chez le rat, l'injection de peptides issus des régions polymorphiques des molécules de classe II du donneur prévient le rejet aigu et induit une survie à long terme de greffons rénaux [68]. L'efficacité de l'injection intrathymique d'antigènes solubles du donneur sur la survie du greffon a été observée dans plusieurs modèles expérimentaux chez la souris [142] ou le rat [143] [69]. L'injection intrathymique de cellules du donneur peut de la même façon prolonger la survie du greffon [144, 145]. Dans un modèle de TCR transgénique, il a été montré que l'induction d'une tolérance opérationnelle après injection de cellules du donneur dans le thymus était bien la conséquence de la délétion des lymphocytes T alloréactifs [146]. L'injection de l'antigène par voie thymique, en plus de conduire à la délétion des cellules alloréactives induirait des mécanismes de régulation, notamment par la production de lymphocytes T $CD4^+CD25^+$ régulateurs [147] [148].

Néanmoins, cette stratégie est difficilement applicable en clinique dans la mesure où la présence des antigènes dans le thymus est transitoire. Une étude clinique a été cependant conduite par l'équipe de Remuzzi *et al* [149] chez deux patients receveurs d'une greffe de cœur. L'injection intrathymique de splénocytes du donneur au moment de l'opération n'a pas permis de prévenir le développement du rejet aigu, ce qui pourrait être la conséquence de l'utilisation simultanée d'un traitement immunosuppresseur.

3) Administration de l'antigène par voie orale

Le groupe de Sayegh *et al.* fut le premier à tester la possibilité d'une induction de tolérance en allotransplantation par la voie orale d'inoculation des antigènes du donneur. Ils ont montré que cette voie d'administration permettait de prévenir l'accélération du rejet chez des animaux présensibilisés par une greffe de peau et receveur d'une greffe de cœur [150]. L'injection par voie orale de molécules de CMH chimériques (comportant des séquences

issues du donneur et du receveur) peut de la même façon induire la tolérance chez le rat. L'administration orale de collagène V avant la greffe de foie chez le rat diminue quant à elle significativement la réponse immunitaire lors du rejet [151].

1) Administration de cellules de moelle osseuse et induction d'un chimérisme hématopoïétique

Le groupe de Medawar et *al.* fut le premier à induire la tolérance à une greffe de peau allogénique expérimentalement en injectant des cellules de tissus adultes contenant des cellules hématopoïétiques à des embryons ou des nouveau-nés murins [120]. Ces expériences posèrent les bases de l'utilisation des cellules de moelle osseuse du donneur pour induire la tolérance en transplantation. L'injection de ces cellules chez des hôtes pré conditionnés par déplétion T ou blocage de la co-stimulation, a pour conséquence l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique qui peut être total (full chimerism) ou partiel (mixed chimerism) et où les cellules du receveur mais aussi du donneur contribuent à l'hématopoïèse. La présence d'une forte quantité de cellules du donneur (macrochimérisme) capables de coloniser le thymus est à l'origine d'un processus de délétion centrale des cellules allo-réactives [152, 153]. L'induction d'un macrochimérisme hématopoïétique par greffe de moelle osseuse allogénique a permis d'observer chez des souris irradiées la tolérance ultérieure de greffe d'organe à partir du même donneur [152].

La nécessité d'utiliser des agents myéloablatifs ou une irradiation sub-létale en association avec la greffe de moelle osseuse a limité son application en clinique. D'autres approches permettant d'éviter un tel conditionnement ont donc été développées. Chez la souris, la tolérance peut être induite en combinant l'injection de grande quantités de cellules de moelle osseuse avec un blocage de la co-stimulation, sans traitement cytoréducteur préalable [154] [155, 156]. D'autres approches similaires ont été employées, comme

l'utilisation de busulfan et du blocage de la co-stimulation en association avec la greffe de moelle osseuse [157]. Chez le primate l'injection de cellules de moelle osseuse combinée avec l'ATG (antithymocyte globulins) conduit à la tolérance de greffe de foie [158].

Chez l'homme, il a été observé chez des patients souffrant d'une leucémie et traités par greffe de moelle osseuse, une totale acceptation de greffes de rein provenant du même donneur réalisées quelques années plus tard, et cela sans traitement immunosuppresseur [159]. Certaines études ont pu permettre par la suite d'induire une tolérance par l'établissement d'un chimérisme de façon intentionnelle. Quatre patients ayant reçu un rein d'un donneur HLA-identique en présence de progéniteurs CD34 dérivés du donneur toléraient encore leur greffon 12 mois après l'intervention [160]. D'autres patients souffrant de multiples myélomes et d'insuffisance rénale chronique ont été préconditionnés (par ATG et cyclophosphamide) puis ont reçu une greffe simultanée de rein et de moelle osseuse en provenance du même donneur, de HLA identique [161] [162]. Ces patients ont présenté une survie prolongée du greffon en l'absence d'immunosuppression. L'ensemble de ces patients furent donc les premiers cas de tolérance induite intentionnellement chez l'homme.

B. Stratégies d'induction de tolérance par Blocage de la co-stimulation

L'utilisation d'agents bloquant la co-stimulation en transplantation offre l'avantage d'induire une inhibition sélective des lymphocytes T. En remplacement des traitements immunosuppresseurs classiques parfois toxiques, ils pourraient améliorer le devenir du greffon à long terme. De plus, ils sont, comme nous allons le voir, potentiellement en mesure d'induire une tolérance au greffon.

*1) Blocage de la voie B7.1/B7.2 (CD80/CD86 à la surface des CPA) avec CD28
(trouvé sur les cellules T)*

L'engagement de ces deux molécules au moment de la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR induit la prolifération des cellules T et la production de cytokines, telle que l'IL2 [163]. Le blocage de cette voie *in vitro* a pour conséquence l'anergie des cellules engagées et l'inhibition de l'alloréponse [164]. En plus d'interagir avec CD28, les molécules CD80 et CD86 peuvent se lier avec la molécule CTLA4 (CD152) à la surface des cellules T activées et induire un signal immun régulateur. La protéine de fusion CTLA4-Ig en tant que compétiteur de CD28 est utilisée dans des protocoles d'induction de tolérance dans la mesure où elle empêche l'activation complète des cellules alloréactives. L'injection chez le rongeur de la protéine CTLA-4Ig en combinaison avec une transfusion spécifique du donneur [152] induit la survie à long terme de greffes cardiaques [165]. L'utilisation de ce traitement chez le primate n'a néanmoins pas permis l'établissement d'une tolérance [166]. L'introduction du belatacept (LEA29Y), plus affiné pour son ligand que la protéine CTLA-4Ig dont il dérive, dans des protocoles chez le primate, a permis d'obtenir des prolongations de survie de greffes de reins [167]. L'utilisation de cette molécule dans un essai clinique de phase II sur des patients greffés rénaux en association avec d'autres traitements immunosuppresseurs a montré son efficacité dans la prévention du rejet aigu et dans l'amélioration de la fonction rénale [168]. La molécule sc28AT ciblant spécifiquement la molécule CD28, apporte l'avantage de laisser libre l'interaction de CD80/86 avec la molécule CTLA4, à l'origine d'un signal immunorégulateur [169]. Son efficacité dans la prévention des rejets aigu et chronique de greffe de rein, avérée chez le rongeur [170], est actuellement testée chez le babouin.

2) Blocage de la voie CD40 (à la surface des CPA)/CD40L (CD154) (à la surface des cellules T)

Cette voie de co-stimulation est impliquée dans l'activation des lymphocytes T CD4⁺ en particulier [171]. L'utilisation de l'anticorps bloquant anti-CD40L (MR1) entraîne une prolongation de la survie de greffes de cœur chez la souris [172]. Combiné avec une transfusion spécifique du donneur [152], ce traitement a permis l'obtention d'une tolérance à une greffe d'îlots pancréatiques [173] et d'une prolongation de survie de greffes de cœur [174] et de peau [175] chez la souris, associée à une déplétion des lymphocytes T CD8⁺ [176] et liée au bon fonctionnement de la voie de signalisation impliquant CTLA-4 [173]. L'anticorps anti-CD40L associé à l'injection de lymphocytes conduit à la survie indéfinie d'îlots pancréatiques chez 40% des souris greffées [177]. En association avec un traitement bloquant la voie de co-stimulation CD28/CD80/86 (CTLA-4Ig), l'anticorps MR1 peut conduire à la survie indéfinie d'îlots pancréatiques [178], à une prolongation de survie de greffes de peau chez la souris et à une inhibition du développement du rejet vasculaire chronique de greffes de cœurs [179]. La molécule C40Ig, bloquant l'interaction CD40/CD40L conduit à la survie de greffe de cœur chez le rat mais ne prévient pas du rejet chronique [123], à moins qu'elle ne soit associée à un anti-CD28 [180]. Le développement d'anticorps anti-CD40L humanisés utilisé en monothérapie a permis la survie à long terme de greffe d'îlots pancréatiques [181], de reins [182] et de cœurs [183] chez le primate, sans néanmoins prévenir de la réponse humorale, à l'origine dans certains cas de la perte du greffon [184] [181] [185]. Encouragés par les bons résultats obtenus chez l'animal, quelques essais cliniques ont été initiés sans grand succès. Le traitement par l'anticorps anti-CD40L humanisé hu5C8 d'une cohorte de sept patients non seulement ne put prévenir le rejet mais fut à l'origine de complications thromboemboliques obligeant l'interruption de l'essai [186]. Cet effet néfaste a été attribué à la fixation de l'anticorps sur les plaquettes porteuses de la

molécule CD40L lorsqu'elles sont activées.

3) Autres voies de co-stimulation

D'autres molécules de co-stimulation récemment identifiées pourraient être de nouvelles cibles dans la quête de la tolérance. La survie de greffons cardiaques est par exemple améliorée chez des souris déficientes pour la molécule ICOS (présente à la surface des cellules T qui interagit avec ICOSL à la surface des CPA) [187]. Le blocage de cette voie associé à la cyclosporine [188] ou à CD40Ig [189] prévient le développement du rejet chronique. Une autre piste prometteuse serait la promotion de l'interaction de la molécule Program Death-1 (PD-1) avec son ligand PDL1 à l'origine d'un signal inhibiteur de la fonction T. L'administration de PDL1-Ig combinée avec un traitement immunosuppresseur ou chez des receveurs CD28-/- prolonge significativement la survie de greffons cardiaques et peut prévenir du rejet chronique lorsqu'elle est associée à l'anti-CD40L [190].

C. Stratégies d'induction de tolérance par des protocoles déplétants

La déplétion lymphocytaire doit avoir lieu au moment de la greffe (en traitement d'induction) afin d'empêcher l'activation des cellules alloréactives lorsque le greffon est le siège d'une forte inflammation due à l'ischémie/reperfusion. La repopulation de l'hôte par les lymphocytes se ferait plusieurs jours après le traitement lorsque la greffe est quiescente, un moment moins propice à l'activation lymphocytaire mais favorable à la génération de cellules régulatrices.

Le groupe de Strober et *al.* rapporte que la déplétion lymphocytaire par irradiation lymphoïde totale peut conduire chez le chien à une tolérance dans 40% des cas lorsque l'irradiation est associée à l'Anti-Thymocyte Globuline (ATG) [191]. Cette approche a obtenu

un certain succès en clinique. Le même groupe rapporte les cas de trois patients parmi 28 ayant subi une irradiation lymphoïde totale associée à l'ATG et un traitement par prednisone, présentant une bonne fonction du greffon rénal [192], ainsi que le cas d'un patient tolérant douze ans après l'arrêt de l'immunosuppression à la suite d'un traitement par irradiation lymphoïde totale [193]. Néanmoins ces protocoles restent difficilement applicables en routine compte-tenu des risques qu'ils comportent.

L'utilisation d'anticorps déplétants a par ailleurs été utilisée dans le but d'induire une tolérance. Des résultats encourageants ont été obtenus chez le primate après administration d'immunotoxines combinées à un anti-CD3 (FN18-CRM9) [194], avec une prolongation de la survie de greffons rénaux bien que les animaux développent des signes de rejet chronique [195]. Associée à la désoxyspergualine (DSG) (inhibiteur des monocytes), l'immunotoxine empêche le développement de la néphropathie chronique du greffon (CAN) [196] chez le macaque et conduit à la tolérance chez 87% des receveurs (Thomas, JM, Tx 1999).

En clinique, l'utilisation d'un anticorps déplétant anti-CD52 (CAMPATH-1H) (capable d'éliminer 99% des lymphocytes T, B et des NK) a permis l'établissement d'une « prope » tolérance de greffons rénaux chez 11 patients greffés rénaux sur 13 inclus dans l'essai. La bonne fonction du greffon est maintenue par l'administration d'une faible dose de cyclosporine et permet d'éviter le traitement conventionnel par trithérapie [197].

L'utilisation d'anticorps monoclonaux semble donc être fiable en clinique mais seulement en association avec de faibles doses d'immunosuppression.

D. Stratégies d'induction de tolérance par injection de cellules suppressives

L'étude des mécanismes nécessaires au maintien de la survie du greffon dans les modèles expérimentaux a permis d'identifier une multitude de cellules suppressives aux phénotypes et aux modes d'action variés (tableau 1), certaines d'entre elles ayant la capacité de transférer la tolérance à un second receveur irradié (tolérance infectieuse (voir [198] pour revue)).

Cellules régulatrices	Génération <i>in vitro</i>	Phénotype	Mode d'action
NKT [199]	Innées	CD3 ⁺ V α 24 ⁺ V β 11 ⁺	Il4, Il10, IFN γ
Tr1	CD4 ⁺ + Il10 [200] ou + DC immatures [201] CD8 ⁺ + cellules pDC [202]	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD8 ⁺	Il10, TGF β Il10
Th3		CD4 ⁺ CD25 ⁺	TGF β
T suppresseurs	stimulation allo ou xénogénique <i>in vitro</i> [203]	CD8 ⁺ CD28 ⁻	Induction de CPA tolérogènes [204]
Cellules Double-négatives [205]		CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	Fas-FasL délétion des clones alloréactifs
Cellules anergiques [206]	Antigène + anti-CD80/CD86 [207]	CD4 ⁺	

Tableau 1. Principales cellules suppressives jouant un rôle en transplantation.

Nous nous intéresserons particulièrement aux cellules T régulatrices naturelles CD4⁺CD25⁺ (T_{Regs} CD4⁺CD25⁺) à l'origine de nouvelles stratégies d'induction de tolérance par injection de cellules suppressives spécifiques de l'antigène.

1) Caractéristiques des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺

Les cellules régulatrices naturelles (T_{Regs}) (voir pour revue [208]) sont une population de lymphocytes T CD4⁺ présente en faible proportion dans le sang (1 à 5% des PBMCs) et dont le rôle est de contrôler les réponses immunitaires dirigées contre le soi [209] et le non soi [210]. Leur implication dans la prévention de maladies autoimmunes a notamment été décrite chez l'animal [211, 212]. Elles présentent certaines particularités phénotypiques comme l'expression faible et constitutive de la chaîne α du récepteur à l'Il2 (CD25), de GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor), de la molécule CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4), et de CD103 (α E intégrine) [213-215]. Elles expriment en particulier le facteur de transcription FoxP3 qui joue un rôle important dans la génération et la fonction de ces cellules [216]. Sélectionnées pour la reconnaissance de peptides du soi présentés dans le contexte des molécules de CMH de classe II au niveau de l'épithélium thymique [217], elles présentent une affinité pour leur ligand plus importante que les cellules spécifiques d'antigènes [218] mais échappent à la délétion clonale pour des raisons encore mal connues qui pourraient faire intervenir la molécule GITR [214]. *In vitro*, elles sont anergiques en l'absence d'Il2 mais l'utilisation de souris transgéniques a permis néanmoins de montrer qu'elle pouvaient proliférer *in vivo* à la suite d'une stimulation antigénique [219]. Une fois activées, elles sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération cellulaire et la production de cytokines par les cellules effectrices de façon aspécifique [220] et probablement par le biais d'interactions cellulaires avec la CPA [221], 1998) [220].

2) Rôle des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺ en allotransplantation

En plus de contrôler les réponses autoimmunes, il semble que les T_{Regs} soient impliqués dans le maintien du greffon à long terme dans de nombreux modèles expérimentaux où la tolérance aux alloantigènes a été induite par l'administration d'anticorps

bloquants ou d'autres agents qui contrôlent la prolifération ou l'activation cellulaire [222-227]. Leur action est d'autant plus vraisemblable que les T_{Regs} sont détectés dans les greffons tolérés eux-mêmes [228]. Ils sont de plus capables de transmettre leurs propriétés régulatrices à des cellules $CD4^+$ conventionnelles [229, 230], ce qui permet la propagation de la tolérance à d'autres animaux non-modifiés, c'est la tolérance infectieuse [231].

L'origine des T_{Regs} induits dans ces modèles demeure néanmoins incertaine. S'agit-il de cellules régulatrices $CD4^+CD25^+$ générées à partir du pool de cellules alloréactives activées, circulant en périphérie et ayant acquis des propriétés immunosuppressives, ou sont-ils des cellules $CD4^+CD25^+$ naturelles générées au niveau du thymus mais capables de cross-réagir avec l'antigène dans certaines conditions? En faveur de la première hypothèse, le groupe de Karim et al. montre qu'il est possible de générer en périphérie des cellules $CD4^+CD25^+$ aux propriétés régulatrices à partir de précurseurs $CD4^+CD25^-$ en l'absence de thymus [232]. La seconde hypothèse suggérerait quant à elle que le répertoire des T_{Regs} soit suffisamment large pour être capable d'interagir avec des déterminants allogéniques. Dans ce sens, certains articles montrent qu'elles peuvent cross-réagir avec l'antigène de façon directe durant la réponse immunitaire dirigée contre le greffon [233] ou de façon indirecte [224]. Elles sont d'ailleurs induites lors du rejet aigu [234].

3) Induction de tolérance par transfert de cellules régulatrices

Finalement, quelle que soit l'origine des cellules régulatrices, l'important pour parvenir à la tolérance du greffon est que ces cellules puissent contrebalancer l'activation des cellules effectrices qui se produit en parallèle lors d'une greffe [235]. Injecter des cellules régulatrices spécifiques de l'antigène pourraient alors faire pencher la balance en faveur des cellules régulatrices, ce qui produirait un effet thérapeutique sur le rejet de greffe. Dans ce but, certaines équipes sont parvenues à induire des T_{Regs} spécifiques de l'alloantigène et à les

faire proliférer *in vitro* [233, 236]. Dans un papier français récent, des T_{Regs} issus de souris naïves mais éduqués *in vitro* à reconnaître l'alloantigène sont capables d'induire la survie à long terme de greffons cutanés ou cardiaques lorsqu'ils sont injectés à des receveurs en association avec des cellules de moelle osseuse du donneur. Le groupe montre par ailleurs que l'induction de cellules régulatrices de spécificité indirecte est nécessaire à la prévention du rejet chronique dans ce modèle [237].

Deux études en particulier montrent que chez l'homme, la stabilité du greffon est moins maintenue par une activité de T_{Regs} de spécificité directe [238] que par celle de spécificité indirecte [239]. Par ailleurs, on sait le rôle important de la voie indirecte de présentation des antigènes dans le rejet chronique. Sur la base de ces connaissances, il est tentant d'isoler *ex vivo*, comme l'a fait le groupe de Jiang et *al.*, des cellules régulatrices de spécificité indirecte pour des peptides allogéniques chez l'homme, puis de les faire proliférer tout en conservant leur propriétés immunosuppressives [240]. S'il est possible de les réinjecter au moment de la greffe, cela ouvrirait de nouvelles perspectives de thérapie du rejet.

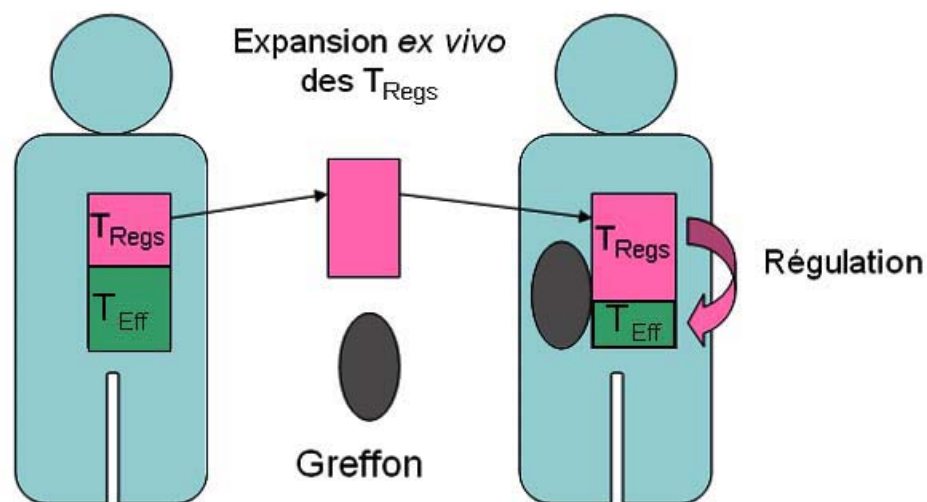


Figure 7. Potentiel des cellules régulatrices dans l'induction de tolérance au greffon chez l'homme.

Les T_{Regs} spécifiques des alloantigènes sont isolés d'un individu en attente de greffe, puis réinjectés après expansion au moment de la transplantation. Supérieurs en nombre, les T_{Regs} pourront en théorie contrôler la réponse effectrice dirigée contre le greffon.

V. Modèles expérimentaux d'induction de survie à long terme par transfusion de sang du donneur

L'une des approches les plus largement étudiées dans le domaine de l'induction de tolérance dans les modèles expérimentaux est la transfusion spécifique de sang du donneur [152] avant la greffe, qu'elle soit cardiaque [241] ou rénale [242]. Chez le rongeur la survie à long terme du greffon induite par TSD est associée à la persistance d'une activité immune finement contrôlée par des mécanismes de régulation qui diffèrent selon le modèle étudié, mais qui ne préviennent pas toujours nous le verrons, l'apparition de lésions de rejet chronique. Nous essaierons donc dans ce chapitre de discuter l'intrication des phénomènes immunologiques responsables de l'induction et du maintien de la survie à long terme du greffon chez ces animaux, mais aussi de l'installation des lésions de rejet chronique.

A. Evènements dans les premiers jours suivant la transplantation

1) Persistance d'une activité immunitaire dirigée contre le greffon

L'un des mécanismes par lesquels la tolérance à une allogreffe est induite dans les modèles expérimentaux est la délétion des cellules alloréactives. De multiples expériences menées par différentes équipes s'intéressant à des modèles variés montre que la survie à long terme chez des receveurs ayant reçu au préalable une TSD ne semble pas faire intervenir ce processus. Tel est le cas dans le modèle de greffe de cœur d'un rat LEW.1W (RT1^u) sur un receveur LEW.1A (RT1^a) sur lequel a porté nos travaux, où donneurs et receveurs sont incompatibles pour les molécules de CMH mais partagent le même fond génétique [243]. Cinq jours après la greffe chez les animaux pré-traités par TSD 14 et 7 jours avant la greffe, on observe dans les cœurs transplantés la présence d'un infiltrat leucocytaire important

comparable à celui observé dans les greffons rejetés, plus important même si l'on étudie les cœurs dès trois jours. Il en est de même dans des modèles similaires de tolérance cardiaque [244] ou rénale [245] après TSD. L'expression élevée de la chémokine RANTES dans les greffons « tolérants » pourrait d'ailleurs jouer un rôle dans le recrutement des lymphocytes sur le site inflammatoire [246]. Ces premiers indices remettant fortement en cause la possibilité d'une absence de cellules alloréactives dans les greffons tolérés ont été par ailleurs renforcées par plusieurs observations : d'une part, les greffons tolérés présentent des taux de granzyme et perforine comparables aux greffons rejetés [247]. Plus spécifiquement, les cellules infiltrant le greffon [248], mais aussi les splénocytes [245] ou les cellules des ganglions lymphatiques [249] sont capables de cytotoxicité *in vitro* envers des cibles allogéniques, ce qui suggère l'absence de délétion des cellules T CD8⁺ alloréactives. Enfin dans certaines études, il apparaît que des cellules issues du sang [121], des ganglions lymphatiques [250] ou de la rate [249] peuvent proliférer *in vitro* contre les cellules du donneur, montrant cette fois-ci l'absence de délétion des cellules CD4⁺. Une activation optimale des cellules CD8⁺ et CD4⁺ allogéniques est par ailleurs en théorie possible compte tenu de la forte expression des molécules de classe I et II du donneur dans les greffons « tolérés » [245, 251].

2) Existence d'une modulation de la réponse allogénique

Dans la mesure où des cellules alloréactives sont présentes dans les greffons, un phénomène de modulation de la réponse immune est donc fortement probable chez les animaux receveurs pour empêcher la survenue du rejet. L'observation des transcrits cytokiniques dans le greffon a permis de montrer une diminution de la fonction auxiliaires des cellules T [252] [121] mais aussi de la fonction des monocytes et des macrophages [246]. Les pics d'expression d'IFN γ et d'IL2 observés au moment du rejet aigu surviennent avec un

certain délai et dans une moindre mesure chez les animaux « tolérants » [252] [121]. La diminution des cytokines de type Th1 pourraient jouer un rôle central dans l'induction de tolérance en cela que l'administration d'IFN γ ou d'IL2 recombinant chez les animaux « tolérants » restaure le rejet [252]. Dans un modèle de souris transgénique, les cellules CD4⁺ prolifèrent dans les ganglions mais produisent de très faibles quantités d'IFN γ ou d'IL2 après TSD et greffe de peau. Ces résultats pourraient expliquer pourquoi dans certains cas de tolérance par TSD, la prolifération *in vitro* des cellules contre le donneur est conservée. L'accumulation des cytokines de type Th2 telle que l'IL4 [253], l'IL10 [121] [253] et l'IL13 [253] est elle aussi fortement altérée dans les greffons d'animaux long surviveurs. La diminution globale des cytokines Th1 et Th2 pourrait être à l'origine de la réduction conjointe de la production d'anticorps IgG principalement contre les molécules de CMH de classe I du donneur et dans une moindre mesure de celle des anticorps dirigés contre les antigènes de classe II. Il est montré que la survenue d'un rejet à la suite de l'administration d'IFN γ recombinant chez les animaux longs surviveurs permet la restauration de la production d'anticorps [254]. Dans certains modèles, la diminution des cytokines est associée à une diminution de la réponse proliférative des cellules issues de la rate chez les animaux tolérants.

3) Induction de mécanismes régulateurs

Du fait de la persistance *in vitro* d'une activité cytotoxique chez les animaux « tolérants » mais de l'absence de rejet et du fait de l'immunomodulation de la production de cytokine et de la diminution de la prolifération des cellules dans certains compartiments, il est fort probable que des mécanismes régulateurs se développent. Deux cytokines en particulier, le TGF β et l'IL4, connues pour leurs capacités immunorégulatrices, et dont l'expression est accentuée dans les greffons d'animaux « tolérants » dans deux modèles différents [255, 256], pourraient être impliquées dans la prévention du rejet dans les premiers jours suivant la

transplantation.

Le TGF β tout d'abord, surexprimé dès le premier jour dans les greffons « tolérés » [255] en association avec l'Il2, permet la restauration de la prolifération *in vitro* de splénocytes issus d'animaux tolérants cinq jours après la greffe. La neutralisation de cette cytokine chez les animaux traités par TSD empêche l'induction de tolérance tandis que sa surexpression permet la prolongation de survie du greffon chez des animaux non transfusés [255]. Dans quelle mesure l'effet du TGF β est le résultat de l'action de cellules régulatrices demeure néanmoins inconnue. On peut cependant rapprocher la production de TGF β de la présence d'un clone CD8⁺ exprimant un réarrangement particulier V β 18-D β 1-J β 2.7 dans les cellules infiltrant le greffon observé, comme le TGF β dès le premier jour suivant la greffe. Le fait que des animaux vaccinés contre ce clone ne soient plus capables de tolérer leur greffon à la suite du traitement par TSD lui confère un rôle important dans l'induction de tolérance. Récemment, une étude dans un modèle de souris tolérant un greffon cutané à la suite d'un traitement associant TSD et blocage de la co-stimulation par un anti-CD40L pourrait fournir un lien entre la production de TGF β et la présence de cellules régulatrices [257]. Les greffons des souris tolérantes dans ce modèle présentent un infiltrat de mastocytes producteurs de TGF β plus important que les greffons rejetés. L'étude montre par ailleurs que des cellules régulatrices activées produisent l'Il9, une cytokine importante aux fonctions des mastocytes. Il est intéressant de spéculer que la production de TGF β dans le modèle de greffe cardiaque pourrait être la conséquence d'une activation mastocytaire faisant suite à l'activation de cellules régulatrices, mais ceci reste à démontrer.

Dans un modèle similaire d'induction de tolérance par TSD 12 jours avant la transplantation, les greffons cardiaques présentent une augmentation d'Il4 dans les greffons « tolérés » par rapport aux animaux rejetant 7 jours après la transplantation [121]. Cette augmentation est associée à la présence dès 5 jours, dans la rate et les ganglions

lymphatiques, et dès 14 jours dans le thymus et le greffon, de cellules capables de transférer la tolérance à des animaux naïfs [256]. Vraisemblablement dans ce modèle, l'activité régulatrice est restreinte aux cellules $CD4^+CD45RC^-$ mémoires [256] dont la génération nécessite à la fois la TSD, la greffe, la rate et le thymus.

De façon intéressante, dès 2 jours après la transplantation, l' $IFN\gamma$ dont la forte expression corrèle en principe avec le rejet, atteint des taux importants dans les greffons tolérés [258]. De plus, sa présence corrèle avec la survie du greffon. Même si l'augmentation de cette cytokine peut être le résultat d'une immunisation par les transfusions de sang, les auteurs proposent que produite tôt et en quantité modérée, elle pourrait favoriser l'induction de tolérance. Dans un modèle de tolérance par CD40Ig, la survie du greffon est le fait d'une sous-population régulatrice $CD8^+CD45RC^{low}$ productrice d' $IFN\gamma$. Cette cytokine est capable d'induire la synthèse d'IDO par l'endothélium du greffon, ce qui favorise la création d'un environnement propice à l'apoptose ou l'anergie des cellules allo-réactives [123].

Les mécanismes par lesquels les populations régulatrices apparaissent et dans quels compartiments se trouvent leurs progéniteurs demeurent incertains. Les cellules dendritiques du donneur pourraient néanmoins participer au phénomène puisqu'il est montré que des greffons déplétés en cellules dendritiques sont rejetés malgré la transfusion préalable de sang du donneur, et que l'injection de ces cellules au moment de la transplantation peut restaurer la tolérance [250]. Dans quelle mesure les anticorps anti-classe II du donneur, retrouvés chez les animaux tolérants, empêchent la présentation des molécules de classe II du donneur aux cellules allogéniques tout en créant un environnement immunomodulateur reste inconnue. Néanmoins, on peut émettre l'hypothèse qu'un défaut de présentation aux cellules allogéniques de la rate puisse être responsable de l'anergie des splénocytes dans certains modèles.

4) Rôle de la transfusion de sang en elle-même sur l'induction de tolérance

S'il est vrai que plusieurs expériences suggèrent l'existence de mécanismes régulateurs après transplantation chez les animaux tolérants, il est nécessaire de s'interroger sur les mécanismes par lesquels cette régulation s'établit et dans quelle mesure la transfusion de sang du donneur joue un rôle dans cette mise en place.

La transfusion de sang en elle-même, en l'absence de transplantation, semble induire une sensibilisation de l'animal plutôt que des mécanismes régulateurs [259]. Il est en effet décrit que les réponses proliférative [250] et cytotoxique [260] contre des cibles allogéniques demeurent inchangées chez les animaux ayant reçu une simple TSD par rapport aux animaux ayant par la suite été greffés. Par ailleurs, le transfert adoptif de cellules issues de ces animaux ne permet pas d'induire une prolongation de survie du greffon chez des receveurs naïfs [260] [261].

Néanmoins, la présence d'une activité suppressive dès 7 jours après la transfusion de sang du donneur a été montrée dans d'autres modèles, *in vivo* par le fait que le transfert adoptif de cellules issues de ces animaux à des hôtes irradiés conduit à la tolérance d'une greffe de rein, et *in vitro* par la capacité de ces cellules à inhiber une réaction mixte lymphocytaire [127]. Ces expériences sont renforcées par la présence dans notre modèle d'une population V β 18-D β 1-J β 2.7 potentiellement régulatrice dès 7 jours après la première transfusion de sang du donneur [262]. La persistance de l'antigène serait essentielle à l'induction des mécanismes régulateurs. Alors qu'une simple transfusion ne permet pas d'induire la tolérance à une greffe de peau chez la souris, plusieurs transfusions en sont capables [261].

Ainsi, suivant les modèles et la quantité d'antigènes du donneur injectée, la transfusion de sang induit ou non les mécanismes régulateurs qui seront nécessaires pour contrebalancer l'activité effectrice qui se développe dans le même temps. Dans notre modèle, l'injection

d'antigène du donneur permet le développement d'une population potentiellement régulatrice de spécificité indirecte (V β 18-D β 1-J β 2.7) dont l'activité est insuffisante pour transférer la tolérance. L'apport d'antigènes supplémentaires fournis par le greffon pourrait multiplier le potentiel suppressif de ces cellules par un effet tolérogène sur les cellules présentatrices du donneur ou du receveur [263] et conduire à la tolérance. Dans le cas où les cellules suppressives engendrées par la TSD sont de spécificité directe, donc en théorie en plus grand nombre, une stimulation supplémentaire par le greffon ne serait pas nécessaire pour transférer la tolérance.

B. Devenir du greffon à long terme : régulation et rejet chronique

Si les événements immunologiques dans les premiers jours suivant la transplantation ont été bien décrits dans différents modèles d'induction de tolérance par TSD, peu d'observations ont été rapportées sur le maintien de la survie du greffon à long terme.

Certains articles suggèrent la persistance de cellules régulatrices à distance de la greffe. Dans notre modèle, la population CD4⁺CD25⁻ accumulant des transcrits de FoxP3 isolée de la rate 100 jours après la transplantation est capable de transférer la tolérance. Elle agirait par le biais de la production d'Il10 et d'IFN γ , mais son action serait aussi contact-dépendante [264]. Cinq jours après la greffe, le groupe de Kitade *et al.* identifie une population de cellules régulatrices CD4⁺CD45RC⁻ (voir plus haut) dont l'efficacité est amplifiée 30 jours après la greffe, ce qui découlerait d'une expansion de ces cellules [121].

Néanmoins, l'observation de lésions typiques de rejet chronique incluant fibrose de l'intima des vaisseaux, occlusion vasculaire et fibrose interstitielle dans les cœurs « tolérés » [121] [265], ont remis en question la capacité des cellules régulatrices à protéger le greffon de l'intégralité des réponses immunologiques. De telles lésions sont également rapportées dans

des modèles d'induction de survie à long terme par blocage de la co-stimulation et génération de mécanismes régulateurs chez des animaux apparemment « tolérants » [123]. Ces observations ont conduit le groupe de Koshiba *et al.* à s'interroger sur l'importance de la déviation Th1/Th2 et de la réponse humorale dans le développement du rejet chronique. Ils rapportent, trente jours après la greffe, une corrélation entre l'accumulation des transcrits d'Il4 dans les cœurs (cytokine Th2) et les dépôts d'IgG1 (produits par des lymphocytes B activés par des cytokines de type Th2) associés à la fixation du complément sur l'endothélium des greffons. L'hypothèse d'un effet néfaste de l'Il4 produite par les cellules régulatrices sur le devenir du greffon à long terme par le biais de l'activation de lymphocytes B et la production d'anticorps dirigés contre le greffon a découlé de ces travaux.

VI. Barrière à l'induction de tolérance en clinique

L'induction d'une tolérance en transplantation chez l'homme, en plus de permettre la diminution des risques liés à la prise chronique de traitements immunosuppresseurs [117], pourrait apporter une solution à la pénurie d'organes disponibles en augmentant les chances de survie du greffon à long terme. Elle compenserait la perte des greffons liés à la non-compliance des patients face à la prise de médicaments [266] et assurerait à ceux-ci une meilleure qualité de vie. Enfin, elle minimiserait considérablement la dépense engendrée par le maintien des traitements immunosuppresseurs sur le long terme. Néanmoins, en plus des nombreux problèmes éthiques et financiers liés à l'obtention d'une tolérance en clinique, il existe une multitude d'obstacles scientifiques.

La première difficulté est la transposition des protocoles d'induction du rongeur au primate et à l'homme. Elle vient de la complexité des systèmes immunitaires humain et simien qui présentent une forte proportion de cellules mémoires, tandis que le système immunitaire des rongeurs est essentiellement naïf [267]. Les cellules mémoires sont capables de proliférer à des concentrations antigéniques bien moins importantes que celles requises pour l'activation de cellules naïves et peuvent se réactiver en l'absence de signal de co-stimulation [268]. Qu'elles soient générées par réactivité croisée contre des microorganismes (immunité hétérologue), par une première exposition à l'alloantigène ou par une prolifération homéostatique à la suite de traitements lymphopénisants, les cellules mémoires pourraient être à l'origine de l'échec de certains traitements d'induction de tolérance.

A. Immunité hétérologue

Le groupe de Heeger *et al.* a souligné l'importance de la cross-réactivité en clinique en montrant une corrélation entre la fréquence des cellules T mémoires anti-donneurs avant la greffe (activées à la suite d'expositions environnementales) et le taux de rejet de greffes rénales [269]. Une série d'expériences conduites par le groupe de Adams *et al.* montrent que l'infection de souris par une combinaison de virus les rend résistantes à la mise en place d'une tolérance à une greffe de peau [270]. On sait de plus que des cellules mémoires activées à la suite d'une pré-sensibilisation à une greffe de peau sont responsables du rejet de greffes de cœurs chez des souris traitées par DST et anti-CD40L [271].

B. Prolifération homéostatique

La prolifération homéostatique fait référence à la capacité qu'ont les cellules T à proliférer chez un hôte lymphopénique en l'absence de stimuli exogènes. La plupart des cellules T ($CD4^+$ ou $CD8^+$, naïves, mémoires, régulatrices ou NKT) sont capables de prolifération homéostatique du moment qu'elles ont la « place » pour le faire et qu'elles rencontrent des molécules de CMH du soi [272]. La stimulation par les cytokines IL15 et IL7 sécrétées en réponse au signal d'« espace » serait favorable à la prolifération homéostatique des $CD8^+$ [273] tandis que la fixation de CCL21 sur son récepteur CCR7 entraîneraient la prolifération des $CD4^+$ [274]. Le déséquilibre dans le repeuplement des lymphocytes après déplétion subtotale peut conduire au développement de cellules mémoires notamment à partir du pool de cellules naïves [275] et cela aux dépens des cellules régulatrices. Elles peuvent empêcher l'induction de tolérance à une greffe de cœur par blocage de la co-stimulation. La tolérance peut être rétablie dans ce modèle par l'injection de cellules régulatrices ou

l'introduction d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 bloquant la prolifération homéostatique [276]. L'élimination des cellules mémoires, en particulier CD8⁺, induit un chimérisme et une tolérance chez des primates receveurs d'une greffe de rein associée à une greffe de moelle osseuse et à un conditionnement combinant une irradiation totale, l'administration d'ATG et d'anti-CD40L [277]. L'addition d'anticorps ciblant d'autres voies impliquées dans la co-stimulation des cellules mémoires comme la voie CD27/CD70 pourrait compléter le traitement d'induction. Cette stratégie a montré une efficacité sur la survie de greffons cardiaques chez des souris CD28^{-/-} et a permis de prévenir le développement du rejet chronique [278]. Par ailleurs des traitements ciblant les cellules mémoires tout en laissant la possibilité aux cellules régulatrices de proliférer, comme le traitement combinant la rapamycine, un agoniste d'Il2 et un antagoniste d'Il15 [279] pourraient ouvrir de nouvelles voies de développement thérapeutique.

Un autre problème à l'induction de tolérance est la mise en place d'une réponse immunitaire non conventionnelle en l'absence de cellules T à la suite de traitements déplétants. On observe par exemple un infiltrat riche en monocytes chez des patients traités par Campath-1H ou encore le développement de rejets aigus humoraux lorsque l'Alemtuzumab (Campath-1H) est associé à un traitement de maintenance par la rapamycine [280].

VII. Apport de l'étude des patients « opérationnellement » tolérants

Même si l'adaptation des stratégies d'induction de tolérance efficaces chez l'animal a permis la diminution dans certains cas du traitement immunosuppresseur conventionnel et a conduit à un état proche de la tolérance, la tolérance partielle ou « propre » tolérance [281] chez l'homme, il faut néanmoins rester vigilants quant au devenir du greffon à long terme. En effet certains greffons apparemment « tolérés » finissent par présenter des signes de rejet chez l'animal [121] [123], mais aussi chez l'homme [282], suggérant que cet état n'est pas stable. C'est pourquoi il est essentiel de développer des tests capables de détecter de façon optimale et reproductible l'état de tolérance. L'étude de patients tolérant spontanément leur greffon à la suite de l'interruption totale du traitement immunosuppresseur est dans ce contexte une manne pour l'établissement d'une signature de l'état de tolérance.

A. Cas de tolérance « opérationnelle »

La tolérance « opérationnelle » est une situation clinique définie par une fonction stable du greffon sans signe de rejet et en l'absence de traitement immunosuppresseur. Elle diffère de la tolérance « vraie » où l'hôte, nécessairement animal, a la capacité de tolérer un second greffon du même donneur mais de rejeter une greffe d'un autre donneur (capacité impossible à démontrer en clinique).

Le foie est l'organe pour lequel une « tolérance » s'observe le plus souvent. Certains protocoles prévoient la diminution progressive des traitements immunosuppresseurs chez des patients greffés depuis plus de 2 ans n'ayant pas présenté de rejet aigu dans l'année précédente. Un tiers des patients devient tolérant au greffon [283] [284]. Un chimérisme est retrouvé chez 39% des patients mais difficile à relier à l'état de tolérance [283].

Il existe dans la littérature quelques cas de patients « tolérant » spontanément un greffon rénal malgré l'arrêt du traitement immunosuppresseur consécutif à une non-compliance, à une cytotoxicité engendrée par la prise de traitements ou au développement de maladies lymphoprolifératives. Dans les années 1960, une étude sur 6000 cas de patients transplantés rénaux montre que parmi 49 patients greffés traités initialement par azathioprine, 15% ont conservé une bonne fonction rénale 3 à 38 ans après l'arrêt du traitement immunosuppresseur [285]. D'autres ont rapporté l'existence d'une cohorte de 6 patients, greffés à partir d'un donneur vivant apparenté, conservant une bonne fonction rénale depuis plus de 3 ans après avoir arrêté délibérément la prise de traitements immunosuppresseurs [286]. D'autres cas ont été rapportés à la suite de l'arrêt du traitement par non-compliance [287], pour des maladies lymphoprolifératives [288] ou pendant la grossesse (Fischer T eyr j obstet gyn reprod biol).

Notre laboratoire a publié ces trois dernières années plusieurs analyses concernant 17 patients « opérationnellement » tolérants à la suite de l'arrêt du traitement immunosuppresseur par non compliance, développement de maladies lymphoprolifératives ou en raison d'une cytotoxicité des drogues [289] [290, 291] [292] [293] [294]. Ils présentent la particularité commune d'avoir été traités par des molécules immunosuppressives pendant des années et d'avoir arrêté de façon progressive le traitement. Ils sont par ailleurs faiblement immunisés contre les molécules HLA (Panel reactive antibody PRA =6+/-1.5) bien qu'ayant été transfusés à plusieurs reprises avant la transplantation (6+/-7.3 transfusions sanguines). L'âge du donneur chez ces patients est en moyenne plus jeune (25 ans) que celui que l'on trouve dans la population de patients transplantés. L'implication de ces phénomènes dans l'établissement de la tolérance chez ces patients reste cependant à définir [289]. Nous avons également montré dans un article commenté dans la partie « résultats » que les patients « opérationnellement » tolérants sont capables de répondre efficacement à une vaccination anti-

grippale, de façon comparable à des sujets sains, indiquant que la tolérance chez ces patients n'est pas le résultat d'une déficience immunitaire mais plutôt qu'elle est spécifique du greffon [295].

Les patients « opérationnellement » tolérants font actuellement l'objet d'études croisées au sein de réseaux européens comme Indices of Tolerance et RISET ou du réseau américain Immune Tolerance Network dont les objectifs sont de déterminer les mécanismes immunologiques liés à la tolérance « opérationnelle » et de définir une signature biologique de cet état.

B. Mécanismes impliqués dans la tolérance opérationnelle

La faible réactivité contre le donneur est une caractéristique souvent retrouvée chez les patients « opérationnellement » tolérants. Christensen *et al.* rapportent le cas d'un patient greffé une première fois avec un greffon maternel puis une seconde fois avec un greffon paternel. Suite au développement d'un syndrome lymphoprolifératif, le traitement immunosuppresseur a été arrêté mais le patient a tout de même maintenu une bonne fonction rénale [288]. Les cellules sanguines de ce patient 3 ans après l'arrêt du traitement étaient faiblement répondeuses contre les cellules du donneur *in vitro* et présentaient une diminution des cytokines Th1 IFN γ et IL2. Burlingham *et al.* ont rapporté le cas d'un patient greffé avec un rein maternel présentant une bonne fonction rénale en l'absence de traitement [287]. Cet état de tolérance était associé à une faible activité cytolytique des cellules du sang contre le donneur, restaurée par l'ajout d'IL2, ce qui indique l'anergie plutôt que la délétion des cellules alloréactives. Enfin, l'analyse du répertoire sanguin de patients « opérationnellement » tolérants a mis en évidence l'existence d'expansions clonales caractérisées par une faible accumulation de cytokines inflammatoires suggérant un état de non-réponse [290].

L'existence d'une régulation spécifique de la réponse immunitaire dirigée contre les antigènes du donneur chez ces patients a été montrée par des analyses « trans-vivo » de la réaction d'hypersensibilité retardée (DTH pour Delayed Type Hypersensitivity). L'injection à des souris de cellules du sang de patients tolérants et d'antigènes provenant d'un individu tierce partie induit une forte DTH, que l'on n'observe pas lorsque les antigènes injectés proviennent du donneur. Par ailleurs, la réponse contre l'antigène tierce partie est inhibée par l'injection simultanée d'antigènes du donneur, traduisant l'existence d'une régulation [282]. Une étude du même groupe chez deux patients tolérants montre que cette régulation dépend non pas de la population de lymphocytes T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ régulateurs naturels, mais d'une population de lymphocytes T $CD4^+CD25^-FoxP3^-$ exprimant $TGF\beta$ en surface [296]. D'autres études montrent que les cellules T $CD4^+CD25^{high}$ ne semblent pas être impliquées dans le phénomène de tolérance en clinique. Il n'existe par exemple pas plus d'augmentation du nombre de ces lymphocytes T régulateurs circulant chez ces patients [292] qu'il n'existe d'amélioration de la fonction suppressive de ces cellules par rapport aux individus contrôles [294] (patients greffés stables sous immunosuppression, en ou individus sains). Il semblerait que l'état de tolérance soit plutôt le fait d'un équilibre favorable aux cellules régulatrices par rapport aux cellules effectrices, comme le montrent les ratios Treg/Teff (transcrits FOXP3/Granzyme B) obtenus dans des biopsies de reins d'individus tolérants [297]. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les patients en rejet chronique présentent moins de cellules effectrices $CD8^+CD28^-CD27^-Perf^+granz^+$ et moins de cellules $CD4^+CD25^{high}$ que les patients sous immunosuppression avec une bonne fonction du greffon [291].

Des résultats montrant les forts taux de lymphocytes B circulants chez les individus tolérants par rapport aux patients stables ou présentant un rejet chronique [292], pourraient être à l'origine de nouveaux axes de recherche dans le domaine.

Par ailleurs, une étude transcriptionnelle par puces à ADN du sang de 17 patients

tolérant leur greffon rénal a révélé l'existence d'un état de quiescence immunologique avec la plupart des gènes pro-inflammatoires sous-exprimés. Parmi les gènes différentiellement exprimés chez les patients « opérationnellement » tolérants, 27% concernaient des gènes régulés par le TGF β [293].

C. Marqueurs de la tolérance

Le chimérisme, la faible réactivité contre le donneur *in vitro*, la présence de cellules régulatrices spécifiques ne sont pas des signes constants de l'état de tolérance. Sans marqueurs de tolérance fiables, il sera difficile de prévoir un arrêt du traitement immunosuppresseur en cas de détection d'un état de tolérance chez des patients stables, ou une reprise de la thérapie lorsque la tolérance sera sur le point d'être perdue.

Un pas vers l'établissement d'une signature de la tolérance a été réalisé au sein du laboratoire sur la base de l'analyse transcriptionnelle par puces à ADN de 17 patients greffés rénaux tolérant spontanément leur greffon. Quarante-neuf gènes ont été identifiés, capables de prédire l'état de tolérance. Cette empreinte a pu être retrouvée dans une autre cohorte de patients tolérants sélectionnés aux Etats-Unis. De plus, la présence de cette signature chez 1 patient greffé sous immunosuppression parmi 12, et chez 5 patients sur 10 sous faibles doses de corticostéroïdes suggère que ces patients pourraient bénéficier d'une diminution du traitement [293]. Cette signature est actuellement recherchée chez deux cents patients stables sous immunosuppression. Cependant, seuls des protocoles d'arrêt de l'immunosuppression sur de larges cohortes de patients transplantés pourront permettre d'apporter la preuve de la force prédictive de cette signature transcriptionnelle.

D. Stabilité de la tolérance « opérationnelle »

Comme la tolérance obtenue par traitement d'induction, la tolérance spontanée d'allogreffe reste un équilibre précaire. Quelques cas de détérioration du rein ont été rapportés chez des patients tolérant leur greffon depuis plusieurs années en l'absence de traitement immunosuppresseurs. Dans certains cas, la biopsie a révélé une néphropathie chronique du greffon de grade I, dans d'autres, la néphropathie chronique de grade 1b était associée à une glomérulopathie du transplant, mais en l'absence de dépôt de C4d [289]. Un patient greffé rénal a par ailleurs développé un rejet cellulaire aigu après 7 ans de tolérance « opérationnelle » [282].

Résultats

I. La transfusion de sang du donneur avant la greffe chez le rat : un modèle de rejet chronique humoral (CAMR)

A. Objectifs de l'étude

La transfusion de sang du donneur 14 et 7 jours avant la transplantation chez le rat permet l'acceptation à long terme d'un greffon cardiaque LEW.1W (RT1^u) par un receveur LEW.1A (RT1^a) (dans cette combinaison, donneurs et receveurs sont incompatibles pour les molécules de CMH de classe I et II). Cent jours après la greffe, des signes histologiques de rejet chronique sont pourtant présents dans les greffons des animaux longs surviveurs, en dépit de la présence de cellules régulatrices capables de transférer la survie à long terme à un second receveur naïf. Les mécanismes par lesquels cette pathologie se met en place demeurent mal connus. Notre objectif était d'analyser l'implication des composantes cellulaires (notamment indirectes) et humorales de la réponse immunitaire dirigée contre le greffon depuis les premiers jours suivant la transplantation à l'apparition des signes de rejet chronique.

B. Article I

DONOR BLOOD PRIMING INDUCED LONG TERM ALLOGRAFT SURVIVAL WITH
EARLY INDIRECT RESPONSE, ANTI-DONOR ANTIBODIES AND C4D DEPOSITS IN
THE GRAFT: A MODEL FOR ANTIBODY-MEDIATED CHRONIC REJECTION

Caroline Ballet¹, Karine Renaudin², Nicolas Degauque¹, David Lair¹, Laureline Berthelot¹,
Cheng Feng¹ Françoise Boëffard¹, Claire Usal¹, Michèle Heslan¹, Régis Josien¹, Sophie
Brouard¹ and Jean-Paul Soulillou¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643:
« Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et
de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035,
Nantes, Cedex 01, France

²Département d'anatomopathologie, CHU-HOTEL DIEU, 44093 Nantes Cedex 01, France

Corresponding author: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Manuscrit en préparation

INDIRECT CD4⁺ TH1 RESPONSE, ANTI-DONOR ANTIBODIES AND DIFFUSE C4d
GRAFT DEPOSITS IN LONG TERM RECIPIENTS CONDITIONED BY DONOR
ANTIGENS PRIMING

Running title: an animal model for antibody-mediated chronic rejection

Caroline Ballet¹, Karine Renaudin², Nicolas Degauque^{1*}, Françoise Boëffard¹, David Lair¹,
Laureline Berthelot¹, Cheng Feng¹, Helga Smit, Claire Usal¹, Michèle Heslan¹, Régis
Josien^{1/3}, Sophie Brouard¹ and Jean-Paul Soulillou¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643:
« Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et
de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035,
Nantes, Cedex 01, France

²Département d'anatomopathologie, CHU-HOTEL DIEU, 44093 Nantes Cedex 01, France

³Laboratoire d'immunologie, CHU de Nantes, Nantes, France

Corresponding author:

Jean-Paul SOULILLOU, 30 bd Jean Monnet, 44035, Nantes, Cedex 01, France

Tel.: 02 40 08 74 10

Fax: 02 40 08 74 11

e-mail: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Work supported in part by RTRS "CENTAURE" and the PROGREFFE foundation

*Recipient of a Post-doctorate from the transplantation Society

ABSTRACT

Priming of recipients by DST induces long-term survival of mismatched allografts in adult rats. Despite these recipients developing inducible T regulatory cells able to transfer long-term graft survival to a secondary host, a state of chronic rejection is also observed. We revisited the molecular donor MHC targets of the cellular response in acute rejection and analysed the cellular and humoral responses in recipients with long-term graft survival following transplantation. We found three immunodominant peptides, all derived from LEW.1W RT1.D^u molecules to be involved in acute rejection of grafts from unmodified LEW.1A recipients. Although the direct pathway of allorecognition was reduced in DST-treated recipients, the early CD4⁺ indirect pathway response to dominant peptides was almost unimpaired. We also detected early and sustained anti-donor class I and II antibody subtypes with diffuse C4d deposits on graft vessels. Finally, long-term accepted grafts displayed leucocyte infiltration, endarteritis and fibrosis, which evolved toward vascular narrowing at day 100. Altogether, these data suggest that the chronic graft lesions developed in long-term graft recipients are the result of progressive humoral injury associated with a persisting indirect T helper response. These features may represent a useful model for understanding and manipulating chronic active antibody-mediated rejection in human.

INTRODUCTION

Inducing immune tolerance to a mismatched allograft in an adult recipient is a major field of research in transplantation. To date, only a few cases of successful tolerance induction have been reported in humans, all of them linked to maneuvers aimed at obtaining a state of mixed chimerism¹⁻³ and “operational” tolerance after immunosuppressive drugs withdrawal is a rare event^{4, 5}. So far, attempts to induce tolerance through manipulation of the host “peripheral” immune response have only been successful in rodents, principally through the inhibition of co-stimulatory molecules^{6, 7} (see for review⁸) and more recently, through utilization of regulatory T cells⁹. This suggests that rodents may not offer pertinent experimental paradigms for tolerance induction in humans (see for review¹⁰). However, closer attention to graft histology in long-term surviving recipients has recently tempered this statement showing that some of the “tolerant” recipients i.e., recipients with long-term graft survival (>100 days), develop histological lesions of chronic rejection¹¹⁻¹³. Moreover, it has been established that chronic rejection can coexist with the presence of regulatory T cells able to transfer the capacity of immediate graft “acceptance” to naïve hosts, but unable to prevent the reappearance of chronic lesions^{11, 13, 14}. This reinforces the need for careful pathological analyses, particularly in the usual non life-sustaining, heterotopic heart graft model, to assess the effect of protocols aimed at inducing tolerance in rodents.

Using molecularly-defined donor-derived MHC peptides, we revisited the direct and indirect pathway responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells as well as the humoral response following the protocol of DST-induced tolerance. We show that, according to previous data emphasizing transcriptional down-modulation of a number of Th1 cytokines¹⁵, there was strong inhibition of the Th1 response triggered by the direct pathway of allorecognition in this model. However, we also noted an unambiguous sustained CD4⁺-mediated Th1 response by the

indirect pathway of allorecognition of dominant donor MHC peptides in the week following transplantation. In contrast, CD8⁺ T cells, despite undergoing a strong clonal selection, lost their capacity to respond to dominant donor peptides in the indirect pathway. Furthermore, we show that long-term surviving animals developed an unbiased and sustained anti-donor humoral response with diffuse intragraft C4d deposition and severe cellular inflammation associated with vascular occlusion suggestive of an “active humoral” type of chronic rejection recently defined in humans ¹⁶. Altogether, these data shed new light on the classical model of tolerance induction in the rat and provide evidence that this model carries several features observed in chronic humoral rejection in human transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and transplantation

Naïve adult MHC-mismatched congenic LEW.1A (RT1^a), LEW.1W (RT1^u) and BN (RT1ⁿ) rats were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). LEW.1A, LEW.1W or BN heart grafts were implanted heterotopically onto LEW.1A recipients using the Ono and Lindsey technique⁵⁴ and function was monitored daily by palpation through the abdominal wall. Rejection was defined as complete cessation of heartbeat.

Donor specific transfusions

Blood (1mL) collected from a LEW.1W donor by cardiac puncture was injected intravenously into LEW.1A recipients on pre-transplant day -14 and -7²¹. The regimen induces donor MHC-specific long-term allograft survival (>100 days), but with grafts showing signs of chronic rejection at day 100¹².

Peptide synthesis

Synthetic peptides 16 or 8-amino-acids in length and spanning the polymorphic regions of RT1.A^u (α 1, α 2 and α 3 domains), RT1.B^u (β 1 domain) and RT1.D^u (β 1 domain) or the invariable regions of RT1.A (α 2 and α 3 domains) molecules¹⁷ (figure 1) were prepared by Genepep (Montpellier, France). Lyophilized peptides were dissolved in deionized water/0.4% DMSO and used in cultures at a final concentration of 10 μ g/mL.

Cells and cell sorting

Cells from mesenteric lymph nodes and spleen cells were recovered from unmodified or DST-treated LEW.1A heart recipients and isolated by passing the spleen through a stainless steel

mesh. Blood samples were collected in heparin tubes. Graft infiltrating cells were extracted from hearts after cutting the graft into small pieces and incubating with collagenase D (2mg/mL Boehringer Mannheim) for 20 min at 37°C. Cells were then collected through a stainless steel mesh and isolated by centrifugation over Ficoll. Erythrocytes from all samples were depleted by osmotic shock. Spleen T cells were prepared using nylon wool adhesion columns followed by depletion of NK cells, monocytes and B cells with specific mAbs (clone 3.2.3 , clone OX42 and clone HIS24 (BD Pharmingen) respectively), followed by anti-mouse IgG-coated dynabeads (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). CD4⁺ or CD8⁺ T cells were negatively sorted using anti-mouse IgG dynabeads after T cell staining with respectively anti-CD8 (OX8) or anti-CD4 (W3/25) mAbs (from the European collection of cell, Salisbury, UK). CD4⁺CD25^{high} T cells and their negative counterparts were sorted using an ARIA flow cytometer (Becton Dickinson) after staining with anti-CD4 and anti-CD25 mAbs (clone W3/25 and OX39) obtained from the European collection of cell (Salisbury, UK) and labeled with FITC and Alexa 647 respectively.

IFN γ ELISPOT assays

ELISPOT plates (BD Biosciences) were coated with purified anti-rat IFN γ (5 μ g/mL) (BD Biosciences) in sterile PBS, incubated at 4°C overnight and blocked 2 hours with RPMI 1640 medium containing 10% Fetal Calf Serum (FCS) Glutamine (Sigma) and 1% Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine (Sigma). For assessment of IFN γ -producing cell frequency, 4x10⁵ total fresh cells from spleen, lymph nodes, blood or grafts from untreated or DST-treated rat recipients, were seeded in triplicate in the presence of irradiated donor splenocytes (direct pathway), 16 amino-acid or 8 amino-acid peptides from LEW.1W MHC molecules (10 μ g/mL) (Genepep, Montpellier, France) (Indirect pathway) or medium alone. To test the T cell responses in the different subsets, 2x10⁵ CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25^{high}-depleted T cells,

non-T cells, total recipient spleen T cells or 2.5×10^4 CD4⁺CD25^{high} T cells were stimulated in the presence of 2×10^5 irradiated recipient splenocytes. The final volume in each well was 200 μ L. The frequency of IFN γ -producing cells was assessed after incubation of cell cultures at 37°C 5% CO₂ for 24 hours. For detection of spots, 2 μ g/mL of biotinylated anti-rat IFN γ (BD Biosciences) were added and plates incubated for 2 hours, followed by a 1-hour incubation with streptavidin-horseradish peroxidase (BD Biosciences). The plates were developed using 20 μ L of 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC chromogen) added per 1 mL of AEC Substrate (BD Biosciences). The number of spots was counted on a computer-assisted-enzyme-linked immunospot image analyzer (AID, Strasbourg, Germany).

Serum Antibody detection

For assessment of anti-donor class I IgG subtypes in the sera of naive, rejecting (day 7), or DST-treated animals and syngenic recipients (day 7, 30 and 100) after transplantation, sera were incubated with donor splenocytes. For anti-class II IgG subtypes, donor-derived conA blasts were incubated with de complemented anti-class I antibody-depleted sera (1/20 dilution). Decomplementation were performed by incubating at 56°C for 30 min. Anti-class I antibody depletion was performed as previously described ⁴³. Briefly, donor red blood cells were isolated by Ficoll and incubated for 90min at 4°C with de complemented sera in a rotating wheel. Supernatants were then harvested following 10 min centrifugation at 4°C, 2500 rpm. After incubation with sera, ConA blasts or total splenocytes were stained with purified mouse anti-rat IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG2c mAbs (University of Louvain, kindly provided by F. Nisol) and revealed with PE-conjugated donkey anti-mouse mAbs (Jackson ImmunoResearch). At the same time, donor-derived conA blasts or splenocytes were stained with FITC-conjugated anti-rat HIS24 mAbs (anti-B lymphocytes) (BD Pharmingen). Cells were collected on a FACScan and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). The

analysis was performed on HIS24 negative cells. Data are expressed as mean fluorescence intensity.

Histology and immunostaining for C4d

Heart allografts were removed and fixed in 4%-diluted formalin. Tissue blocks were routinely processed and embedded in paraffin. Serial sections of 6µm were obtained for hematoxylin-eosin-saffron staining. Leucocyte infiltration, fibrosis, vascular damage and luminal occlusion of arteries were evaluated using scoring as follows: Leukocytes (mononuclear cells): none=0; minor=1; moderate=2; dense=3; intense=4; Fibrosis: none=0; focal=1; diffuse minor=2; diffuse moderate=3; diffuse marked=4; Vascular damage: normal=0; leukocyte adhesion to endothelial cells=1; inflammatory intimal proliferation=2; fibrointimal thickening=3; atheroma=4; Luminal occlusion: none=0; <20%=1; 20 to 50%=2; 50 to 80%=3; >80%=4.

C4d deposition was localized by immunoperoxidase staining with an affinity-purified polyclonal rabbit antibody to C4d kindly provided by K. Murata⁵⁵ (department of pathology, John Hopkins Medical Institutions, Baltimore MD, USA) used at a 1 : 1000 dilution. Deparaffinized tissue sections were submitted to heat-induced antigen retrieval and processed using the Menarini revelation kit (A. Menarini diagnostics, ref 37072) with 3,3'-diaminobenzidine and a hematoxylin counterstain.

Statistical analyses

All statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test or Kruskal Wallis tests, as appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Identification of immunodominant peptides during acute rejection in unmodified LEW.1A recipients of LEW.1W hearts

Rejecting recipients recognize immunodominant peptides derived from donor MHC class II RT1.D^u molecules. To assess the Th1 indirect alloresponse following LEW.1W (RT1^u) heart transplantation to the congenic mismatched LEW.1A (RT1^a) recipients sharing the LEW background, we first investigated which peptides from donor MHC class I and class II molecules induced an IFN γ ELISPOT response in rejecting recipients. All overlapping peptides of 16-amino-acid-long (61 peptides) from the polymorphic regions of recipient RT1A^u (α 1, α 2 and α 3 domains), RT1.B^u (β 1 domain) and RT1.D^u (β 1 domain) MHC molecules (figure 1¹⁷) were synthesised and used *in vitro* to stimulate, for 24 hours, T cells from the spleen of untreated LEW.1A recipients collected 7 days after transplantation. We also screened a selection of 6 peptides derived from non-polymorphic regions of RT1.A^u molecules to test for a possible autoimmune response. At day 7 post-transplantation, a significant frequency of splenocytes from rejecting animals responded to peptides 29, 37 and 38 (figure 2A * p<0.05 ** p<0.01 versus unstimulated). All of the stimulator peptides were from polymorphic regions of the β 1 domain of RT1.D^u molecules. For subsequent analyses, we focused on peptides 29 and 37, since peptide 38 always displayed the same profile as peptide 37. Splenocytes harvested from untreated LEW.1A rat recipients of syngeneic (RT1^a) or BN (RT1^b) hearts at the time of rejection of LEW.1W hearts (day 7) did not respond to the RT1^u dominant peptides in IFN γ ELISPOT, indicating a specific anti-RT1^u response (figure 2B).

To better characterize the indirect response, we tested whether particular epitopes overlapping the dominant peptide sequences were also able to indirectly prime allogenic T cells during

acute rejection. We chose a battery of 8 amino acid-long peptides encompassing the sequences of peptides 29 and 37 (P1 to P8 for peptide 29 and P9 to P16 for peptide 37), to stimulate splenocytes from LEW.1A recipients undergoing rejection at day 7. None of the 8 amino acid-long peptides from the peptide 29 sequence triggered the production of IFN γ by splenocytes from rejecting animals (figure 3A). In contrast, a high frequency of splenocytes responded to the epitope P15 from peptide 37 (figure 3A *** $p < 0.001$ versus unstimulated). Of note, the peptide P15 sequence is included in that of peptide 38 (figure 1), which also triggered a strong IFN γ response in rejecting animals. Because the length of the small peptide P15 identified was consistent with class I binding, we hypothesized that whereas peptide 29 triggered a CD4 $^{+}$ -mediated response, the response to peptide 37 was class I restricted and CD8 $^{+}$ -mediated. Thus, we stimulated purified CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ spleen T cells from unmodified recipients with peptides 29 and 37 in the presence of irradiated recipient splenocytes. Figure 3B shows that most of the response directed against peptide 29 in the rejecting LEW.1A recipients involved CD4 $^{+}$ T cells. As expected, CD8 $^{+}$ were much more efficient than CD4 $^{+}$ splenocytes at mounting a response against peptide 37 (figure 3B * $p < 0.05$) and P15 (figure 3B).

Indirect pathway responses against dominant RT1 u peptides are detectable as early as day 5 in rejecting animals: we next assessed the kinetics of the Th1 indirect pathway response, from day 3 to 14 after transplantation in the spleen, lymph nodes, blood and graft from LEW.1A rejecting recipients and compared it to the direct response (figure 4A and 4B, rejecting recipients are represented by squares and continuous black lines). In unmodified rejecting recipients, the response towards peptide 29 was dominant in the spleen, reaching a peak 5 days after transplantation (figure 4B $\square$ $p < 0.05$ versus the other kinetics points) and disappearing thereafter. The responses in the three other compartments tested presented a similar profile although the detectable IFN γ response did not reach significance in the lymph

nodes or in the graft (figure 4B). The most vigorous response towards peptide 37 was observed in the blood, reaching a peak at day 7, as in the spleen, (figure 4B $\square$ $p<0.05$ $\square$ $p<0.01$). The response to peptide 37 was slightly delayed to day 7 compared to that directed against peptide 29, except in the graft where a peak was observed on day 5. As a comparison, the response towards irradiated donor cells (direct pathway) was more vigorous, reaching a peak at day 5 in the spleen, lymph nodes and on day 7 in the blood (figure 4A $\square$ $p<0.05$ and $\square$ $p<0.01$). The response then declined until day 9 to 14. In the rejecting hearts, a direct response was detected as early as day 3, was maximal on day 5 and persisted until day 14 (figure 4A).

An early and persistent CD4⁺ T cell indirect pathway Th1 response in DST-treated recipients

We then assessed whether and how DST treatment before heart transplantation, which leads to long-term graft survival in recipients, could modify the cellular response of LEW.1A recipients (figure 4B, circles, dotted lines). First, DST alone (without transplantation) did not trigger a measurable indirect response (figure 4B, day 0). However, we observed an increased response towards irradiated donor cells (direct pathway) in the blood before transplantation in DST-treated animals (figure 4A * $p<0.05$ versus blood from untransfused LEW.1A, day 0), which was also detected in the lymph nodes and spleen (figure 4A).

Following transplantation, a significant T cell response towards peptide 29 was still detected in the spleen from DST-treated recipients of LEW.1W hearts (figure 4B $\square$ $p<0.05$ versus the other kinetics points). However, the peak of the response was delayed to day 7 compared to that in untransfused recipients. As expected, this response was CD4⁺ T cell-mediated (figure 5A * $p<0.05$ compared to CD8⁺). In the hearts from DST-treated recipients, the frequency of peptide 29-specific cells observed was similar to that observed in untransfused rejecting

animals, although their appearance was delayed to day 7 (figure 4B). The indirect response towards peptide 29 was not detected in the lymph nodes and in the blood (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$). Contrasting with the response to peptide 29, a strong inhibition of the T cell response to peptide 37 was seen in the graft compared to untransfused recipients on day 5 (figure 4B * $p < 0.05$). The inhibition, which was also seen in the spleen, could not be restored by depletion of CD4⁺CD25^{high} T cells (figure 5B). The direct pathway of allorecognition was also reduced in the spleen (figure 4A day 3 and 7 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$) and in the lymph nodes and blood (figure 4A day 5 and 7 ** $p < 0.05$). In the hearts, the IFN γ responses was significantly reduced compared to rejecting animals (figure 4A day 5 and 7 * $p < 0.05$).

Finally, no response to donor peptides or irradiated donor cells could be detected 100 days after transplantation in the spleen, lymph nodes or blood (figure 4B). No response could be detected in the blood CD8⁺ T cell subset of long-term recipients (data not shown) despite CD8⁺ T cells exhibiting a strong clonal selection and despite high levels of granzyme B transcripts being detected in the blood at this time ¹⁴. In the hearts at day 100, we found a strong frequency of graft infiltrating cells producing IFN γ without the need for further stimulation *in vitro* with peptides or donor cells (Background DST, dotted line, figure 4A and B) suggesting an “exhaustive” response *in situ*.

Taken collectively, these data show that despite a strong reduction in the CD4⁺ direct pathway and the CD8⁺ response, the indirect allorecognition pathway of CD4⁺ T cells still persisted in apparently “tolerant” animals 7 days after transplantation.

Unbiased and sustained anti-donor IgG antibodies in DST-treated recipients

Anti-class I and II IgG subtypes were analyzed in the blood of naive, untransfused (day 7, time of rejection), syngenic or DST-treated recipients (days 7, 30 and 100 post transplantation). Seven days after surgery, anti-donor class I and II IgG1, IgG2a, IgG2b and

IgG2c levels were similar to those observed in rejecting animals. However, the amounts of anti-donor antibodies of each subtype increased until day 100. Anti-class I and class II antibodies amounts were higher in long term surviving DST-treated animals compared to rejecting ones (* $p < 0.05$ for anti-class II IgG1 and IgG2a). The quantity of each subtype was higher than that observed in syngenic controls tested at the same time ($p < 0.05$ for anti-class II IgG1 and IgG2b).

Strong cellular infiltration, sub-acute and chronic rejection associated with C4d deposits, in LEW.1W hearts

We next investigated the endomyocardial histology of biopsies harvested from day 7 to 320 in DST-treated recipients. An intense mononuclear cell infiltrate appeared as early as day 7 after transplantation (table 1(a) grade 4), reaching a maximum on day 30 and then becoming moderate until day 320 (table 1(a), grades 2-3). A minor mononuclear cell infiltrate was observed in control, syngenic grafts (table 1(a), grade 1, figure 7A). Focal fibrosis was detected as early as day 14 (table 1(b) grade 1) and became progressively diffuse and marked until day 320 (table 1(b) grades 3-4). Mild intimal arteritis, defined as lymphocyte infiltration beneath the endothelium, was first observed on day 14 (table 1(c) grade 1) and persisted until day 60 (table 1(c), grade 1, figure 7C). Intimal arteritis became more severe on day 100 with the beginning of myofibroblastic cell proliferation (table 1(c) grade 2), associated with fibrointimal thickening on day 240 and 320 (table 1(c) grade 2-3), leading to 80% of luminal occlusion in most arteries (table 1, figure 7D). These observations are suggestive of persisting and ongoing injury that begins early following transplantation, leading to myocardial fibrosis and cardiac vasculopathy characteristic of chronic rejection.

C4d deposits in the grafts of DST-treated animals at day 7, 14, 30, 60 and 100 after transplantation were also analyzed and compared to syngenic grafts. No C4d binding was

observed in syngenic controls (figure 7E). Figure 7F shows diffuse and abundant C4d deposits along heart capillaries (figure 7 arrow a) and arteries (arrow b) as early as day 7, as in rejecting animals, indicating persisting complement activation in the grafts of DST-treated animals. Although other pathologic findings of antibody-mediated rejection (i.e myocardial capillary injury with endothelial-cell swelling and intravascular macrophage accumulation), also present, were more difficult to appreciate because of the intensity of interstitial infiltrate, the diffuse C4d deposits associated with anti-donor class I and class II antibodies strongly support an antibody-mediated rejection.

DISCUSSION

Much attention has recently been paid to the histological lesions of long-term surviving recipients (>100 days) after tolerance induction. It has been established that chronic rejection progressively develops following tolerance induction procedures such as donor blood transfusions or costimulatory blockade^{10, 18}, even when long-term surviving recipients (100 days) harbor regulatory T cells capable of transferring to a secondary naive host, the ability to accept a graft^{11, 13, 14, 19} (see for review²⁰). This state of coexistence of “aggressive” and “regulatory” pathways may explain the slow and partially controlled presence of lesions and may offer “new” pertinent models of subclinical or chronic rejection in the clinic. In the present study, long-term survival of LEW.1W heart allografts (>100 days) was induced by DST priming 14 and 7 days before transplantation in LEW.1A recipients²¹. We demonstrated that recipients of long-term accepted grafts developed an early and sustained indirect CD4⁺ Th1 response associated with the chronic production of anti-donor antibodies. Furthermore, we showed that long-term surviving grafts exhibited lesions of subclinical and chronic humoral rejection with diffuse C4d deposits on donor tissue capillary walls. We hypothesize that this model may be useful for understanding subclinical antibody-mediated lesions in human allografts and for testing the efficacy of therapeutic strategies aimed at blocking antibody-mediated rejection.

To assess the cellular responses (indirect and direct) in DST-treated recipients, we first precisely characterized the dominant donor MHC peptides eliciting a T cell response during acute rejection in unmodified LEW.1A recipients of MHC incompatible LEW.1W hearts. We measured the cellular response using the ELISPOT assay which enables quantification of the frequency of T cells already committed to antigen. IFN γ was chosen since it has been shown to offer the best correlation to rejection in various studies²²⁻²⁴. Using this method, we first

identified three 16 amino-acid long immunodominant peptides from the RT1^u MHC of LEW.1W donors (referred to as peptides 29, 37 and 38), which triggered a potent IFN γ response during LEW.1W heart rejection as early as day 5 after transplantation for peptide 29 and day seven for peptides 37 and 38. Several studies have previously shown that indirectly primed T cells are effectively involved in allograft rejection in many experimental models²⁵⁻²⁸ and in humans^{29, 30}. We have also shown that in the same strain combination, LEW.1W hearts depleted of resident DC are acutely rejected following the same tempo, indicating that the indirect pathway can rapidly develop in unmodified LEW.1A hearts^{31, 32}. The dominant peptides concerned the donor class II RT1.D^u molecule sequence, in agreement with data obtained in different strain combinations³³⁻³⁶. These data also suggest that effector and regulatory mechanisms are intimately linked in this model, since donor blood and graft must share class II molecules for transfusions to have an effect²¹. None of these peptides activated cells harvested from naive LEW.1A, syngenic graft recipients (LEW.1A to LEW.1A) or RT1ⁿ BN heart recipients, indicating a specific response. In our model, we could not detect a role for peptides derived from self-MHC in rejection, although the hypothesis of a component of autoimmunity cannot be ruled out (see for review³⁷)^{38 39}. Further mapping of the donor MHC amino acid sequences eliciting alloreactive T cell activation was performed using 8 amino acid-long peptides encompassing the sequences of peptides 29 and 37. This revealed the dominance of peptide P15 (shared by the immunodominant peptides 37 and 38), another class II-derived RT1^u sequence that is restricted by recipient class I. Indeed, class I binding peptides are shorter (7 to 10 amino acids) than class II binding peptides (13 to 26 amino acids)⁴⁰. These results led us to hypothesize that the responses towards peptides 29 and 37 were CD4⁺ and CD8⁺-mediated, respectively. Testing of purified CD4⁺ or CD8⁺ subsets revealed that this was indeed the case. The direct pathway of allorecognition was also assessed in acute rejection. In a study by Benichou *et al.*, the quantitative contribution of the direct and indirect

pathways of allorecognition was precisely defined in a model of mouse skin transplantation⁴¹. Notably, they showed that acute rejection was principally governed by the direct pathway. A high frequency of alloreactive cells was also found to result from the direct pathway of activation, notably on day five and seven after transplantation. Indirect responses (to peptides 29, 37 and 38) generated a high frequency of committed cells (figure 4) during the rejection process. Any conclusions based on the comparison of frequencies may, however, be tempered by the experimental conditions. Indeed, the relatively high concentration of peptides used for testing the indirect response *in vitro* may not exactly reflect the *in vivo* situation, in which donor peptides associated with self MHC molecules might be less accessible.

Hyporesponsiveness of directly-activated alloreactive T cells^{15, 31} associated with an overall down-modulation of Th1 cytokines⁴² and inflammatory monokines⁴³ was observed in the first days following transplantation in the same strain combination. We confirmed a strong reduction in the direct allorecognition pathway in DST-treated recipients in the first days following transplantation in all tested compartments. An increased frequency of IFN γ -producing cells against irradiated donor cells was detected 14 days after the first transfusion, before heart transplantation, in the spleen, blood and lymph nodes. Interestingly, an IFN γ response was also observed in “tolerated” grafts from DST-treated recipients as early as day 3 after transplantation, but remained limited in the following days. Previous works have suggested that early and moderate production of IFN γ in the grafts may be beneficial for graft survival, depending on the balance of effector and regulatory cells responsible for this accumulation⁴⁴. Whether this early IFN γ production plays a role in the DST effect in our model is unknown. Considerable inhibition of the indirect pathway of allorecognition (i.e. responding to peptides 37 and 38) mediated by CD8⁺ IFN γ -producing cells was also observed in all compartments tested from DST-treated recipients in the first days after transplantation. Because depletion of CD4⁺CD25^{high} regulatory cells could not restore the CD8⁺ IFN γ

response, it is unlikely that naturally occurring T regulatory cells are involved in this inhibition. Our data also show an early activation of CD4⁺ T cells specific to peptide 29 in the spleen and graft of DST-treated recipients in the first days following transplantation (although delayed to day 7), and this response was as robust as in rejecting animals.

Because several studies have shown a close relationship between chronic rejection and the indirect pathway of allorecognition^{30, 45-48}, we also analyzed T cell responses 100 days after transplantation, when chronic lesions are well established. We found the persistence of IFN γ producing cells without the need for further stimulation *in vitro* with donor cells or peptides suggesting that graft infiltrating cells themselves are strongly activated.

We then asked whether IgG alloantibodies could be detected in this “tolerance” induction model and could be implied in the chronic rejection process. In the RA (RT1^P) to PVG (RT1^C) model of “tolerance” induction by DST priming, Th2 polarized IgG production was reported to occur 30 days after transplantation¹¹. In our model, long-term survivors presented a Th1/Th2 unpolarised and sustained amounts of anti-donor class I and II IgG subtypes, reaching a maximum 100 days after transplantation. This antibody production is likely involved in the graft damage leading to chronic lesions.

Although relatively few studies have linked C4d staining with antibody-mediated rejection in human cardiac transplantation⁴⁹⁻⁵¹, this by-product of C3 convertase degradation is a well-defined correlate of antibody-mediated injury in renal transplantation¹⁶. Diffuse C4d deposits were detected in capillary and artery walls as early as day 7 in long-term accepted grafts and persisted until day 100. Notably, such staining was absent from syngenic grafts. To our knowledge, this is the first report of the presence of this by-product of complement activation in a tolerance induction protocol in the rat. C4d deposits associated with circulating anti-donor antibodies strongly suggest antibody-mediated injury in the transfused recipients.

This was in agreement with progressive vascular damage, as assessed by histological analysis of heart grafts from day 7 to 320 after transplantation. In the first days, hearts from DST-treated recipients presented histological patterns of subclinical rejection, with endothelialitis and leucocyte infiltration. This pattern was progressively enriched by typical lesions of chronic rejection associating severe intimal fibrosis, vascular occlusion and mononuclear cell infiltration in the grafts from day 100 to 320.

Altogether, we propose that activated CD4⁺ helper cells and anti-donor antibodies ⁵² both contribute to the mechanisms of chronic rejection and to the lesions which develop in this model of long-term allograft survival. The fact that TRIB1, which has been recently identified as a biomarker of chronic antibody-mediated rejection in human kidney recipients, was also up-regulated in the blood and graft in our model ⁵³, reinforces this hypothesis. Antibody-mediated rejection is probably initiated in the early phases following transplantation by indirectly primed CD4⁺ cells providing help to B cells for anti-donor class I and II alloantibody production leading to vascular damage through complement activation. Finally, this model may be also useful for testing new strategies aimed at controlling chronic active antibody-mediated rejection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank K. Murata for kindly providing anti C4d antibody and J. Ashton-Chess for editing the manuscript.

REFERENCES

1. Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med.* Jun 1 1991;114(11):954-955.
2. Fudaba Y, Spitzer TR, Shaffer J, Kawai T, Fehr T, Delmonico F, Preffer F, Tolkoff-Rubin N, Dey BR, Saidman SL, Kraus A, Bonnefoix T, McAfee S, Power K, Kattleman K, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB, Sykes M. Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. *Am J Transplant.* Sep 2006;6(9):2121-2133.
3. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, Tolkoff-Rubin N, Suthanthiran M, Saidman SL, Shaffer J, Preffer FI, Ding R, Sharma V, Fishman JA, Dey B, Ko DS, Hertl M, Goes NB, Wong W, Williams WW, Jr., Colvin RB, Sykes M, Sachs DH. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med.* Jan 24 2008;358(4):353-361.
4. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton-Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Soulillou JP, Sarwal M. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 25 2007;104(39):15448-15453.
5. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noel C, Pillebout E, Brouard S, Soulillou JP. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant.* Apr 2006;6(4):736-746.
6. Haspot F, Seveno C, Dugast AS, Coulon F, Renaudin K, Usal C, Hill M, Anegon I, Heslan M, Josien R, Brouard S, Soulillou JP, Vanhove B. Anti-CD28 antibody-

- induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant*. Oct 2005;5(10):2339-2348.
7. Guillonnet C, Seveno C, Dugast AS, Li XL, Renaudin K, Haspot F, Usal C, Veziers J, Anegon I, Vanhove B. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol*. Dec 15 2007;179(12):8164-8171.
 8. Trikudanathan S, Sayegh MH. The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways: clinical implications. *Clin Exp Rheumatol*. Sep-Oct 2007;25(5 Suppl 46):S12-21.
 9. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, van Meerwijk JP. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med*. Jan 2008;14(1):88-92.
 10. Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int*. Jul 2006;19(7):539-548.
 11. Koshiha T, Kitade H, Van Damme B, Giulietti A, Overbergh L, Mathieu C, Waer M, Pirenne J. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation*. Aug 15 2003;76(3):588-596.
 12. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation*. Nov 15 2006;82(9):1185-1193.
 13. Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, Chiffolleau E, Herve C, Li XL, Heslan M, Usal C, Tesson L, Menoret S, Saoudi A, Le Mauff B, Josien R, Cuturi MC, Anegon I. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. Apr 2007;117(4):1096-1106.

14. Lair D, Degauque N, Miqueu P, Jovanovic V, Guillet M, Merieau E, Moreau A, Soulillou JP, Brouard S. Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am J Transplant.* Mar 2007;7(3):538-549.
15. Josien R, Pannetier C, Douillard P, Cantarovich D, Menoret S, Bugeon L, Kourilsky P, Soulillou JP, Cuturi MC. Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation.* Nov 27 1995;60(10):1131-1139.
16. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DS, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E, Mannon RB, Mihatsch M, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Randhawa P, Regele H, Renaudin K, Roberts I, Seron D, Smith RN, Valente M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant.* Apr 2008;8(4):753-760.
17. van Denderen B, Peche H, Gagne K, Usal C, Cuturi MC, Soulillou JP. Identification of immunodominant donor MHC peptides following rejection and donor strain transfusion-induced tolerance of heart allografts in adult rats. *Eur J Immunol.* May 2001;31(5):1333-1339.
18. Pirenne J, Kitade H, Kawai M, Koshiba T, Van Damme B, Mathieu C, Waer M. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation.* Feb 15 2005;79(3 Suppl):S25-27.
19. Degauque N, Lair D, Braudeau C, Haspot F, Sebille F, Dupont A, Merieau E, Brouard S, Soulillou JP. Development of CD25- regulatory T cells following heart

- transplantation: evidence for transfer of long-term survival. *Eur J Immunol.* Jan 2007;37(1):147-156.
20. Jovanovic V, Lair D, Soulillou JP, Brouard S. Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model. *Transpl Int.* Mar 2008;21(3):199-206.
 21. Soulillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation.* Jul 1984;38(1):63-67.
 22. Cunningham DA, Dunn MJ, Yacoub MH, Rose ML. Local production of cytokines in the human cardiac allograft. A sequential study. *Transplantation.* May 15 1994;57(9):1333-1337.
 23. Nast CC, Zuo XJ, Prehn J, Danovitch GM, Wilkinson A, Jordan SC. Gamma-interferon gene expression in human renal allograft fine-needle aspirates. *Transplantation.* Feb 27 1994;57(4):498-502.
 24. D'Elis MM, Josien R, Manghetti M, Amedei A, de Carli M, Cuturi MC, Blanche G, Buzelin F, del Prete G, Soulillou JP. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney Int.* Jun 1997;51(6):1876-1884.
 25. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med.* Jan 1 1992;175(1):305-308.
 26. Watschinger B, Gallon L, Carpenter CB, Sayegh MH. Mechanisms of allo-recognition. Recognition by in vivo-primed T cells of specific major histocompatibility complex polymorphisms presented as peptides by responder antigen-presenting cells. *Transplantation.* Feb 27 1994;57(4):572-576.
 27. Gallon L, Watschinger B, Murphy B, Akalin E, Sayegh MH, Carpenter CB. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its

- inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation*. Feb 27 1995;59(4):612-616.
28. Shirwan H, Leamer M, Wang HK, Makowka L, Cramer DV. Peptides derived from alpha-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4⁺ and CD8⁺ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection. *Transplantation*. Feb 15 1995;59(3):401-410.
 29. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, Rose EA, Cortesini R, Michler RE, Suci-Foca N. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest*. Sep 1 1996;98(5):1150-1157.
 30. Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. Jan 2002;13(1):252-259.
 31. Josien R, Heslan M, Brouard S, Soulillou JP, Cuturi MC. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood*. Dec 15 1998;92(12):4539-4544.
 32. Roussey-Kesler G, Brouard S, Ballet C, Moizant F, Moreau A, Guillet M, Smit H, Usal C, Soulillou JP. Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: marginally delayed rejection but strong alteration of graft infiltration. *Transplantation*. Aug 27 2005;80(4):506-513.
 33. Sayegh MH, Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL, Carpenter CB. Induction of immunity and oral tolerance with polymorphic class II major histocompatibility complex allopeptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 15 1992;89(16):7762-7766.

34. Sayegh MH, Perico N, Imberti O, Hancock WW, Carpenter CB, Remuzzi G. Thymic recognition of class II major histocompatibility complex allopeptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts. *Transplantation*. Aug 1993;56(2):461-465.
35. Vella JP, Vos L, Carpenter CB, Sayegh MH. Role of indirect allorecognition in experimental late acute rejection. *Transplantation*. Dec 27 1997;64(12):1823-1828.
36. Vella JP, Magee C, Vos L, Womer K, Rennke H, Carpenter CB, Hancock W, Sayegh MH. Cellular and humoral mechanisms of vascularized allograft rejection induced by indirect recognition of donor MHC allopeptides. *Transplantation*. Jun 27 1999;67(12):1523-1532.
37. Benichou G, Alessandrini A, Charrad RS, Wilkes DS. Induction of autoimmunity after allotransplantation. *Front Biosci*. 2007;12:4362-4369.
38. Lovegrove E, Pettigrew GJ, Bolton EM, Bradley JA. Epitope mapping of the indirect T cell response to allogeneic class I MHC: sequences shared by donor and recipient MHC may prime T cells that provide help for alloantibody production. *J Immunol*. Oct 15 2001;167(8):4338-4344.
39. Fedoseyeva EV, Tam RC, Popov IA, Orr PL, Garovoy MR, Benichou G. Induction of T cell responses to a self-antigen following allotransplantation. *Transplantation*. Mar 15 1996;61(5):679-683.
40. Germain RN, Margulies DH. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:403-450.
41. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol*. Jan 1 1999;162(1):352-358.

42. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, Paineau J, Chabannes D, Souillou JP. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation*. Aug 1992;54(2):219-225.
43. Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol*. Oct 2001;31(10):3111-3120.
44. Kitade H, Kawai M, Koshiba T, Giulietti A, Overbergh L, Rutgeerts O, Valckx D, Waer M, Mathieu C, Pirenne J. Early accumulation of interferon-gamma in grafts tolerized by donor-specific blood transfusion: friend or enemy? *Transplantation*. Dec 27 2004;78(12):1747-1755.
45. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. Sep 27 1997;64(6):795-800.
46. Suciu-Foca N, Ciubotariu R, Itescu S, Rose EA, Cortesini R. Indirect allorecognition of donor HLA-DR peptides in chronic rejection of heart allografts. *Transplant Proc*. Dec 1998;30(8):3999-4000.
47. Hornick PI, Mason PD, Baker RJ, Hernandez-Fuentes M, Frasca L, Lombardi G, Taylor K, Weng L, Rose ML, Yacoub MH, Batchelor R, Lechler RI. Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. *Circulation*. May 23 2000;101(20):2405-2410.

48. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol*. Dec 15 2001;167(12):7199-7206.
49. Crespo-Leiro MG, Veiga-Barreiro A, Domenech N, Paniagua MJ, Pinon P, Gonzalez-Cuesta M, Vazquez-Martul E, Ramirez C, Cuenca JJ, Castro-Beiras A. Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis. *Am J Transplant*. Oct 2005;5(10):2560-2564.
50. Rodriguez ER, Skojec DV, Tan CD, Zachary AA, Kasper EK, Conte JV, Baldwin WM, 3rd. Antibody-mediated rejection in human cardiac allografts: evaluation of immunoglobulins and complement activation products C4d and C3d as markers. *Am J Transplant*. Nov 2005;5(11):2778-2785.
51. Smith RN, Brousaides N, Grazette L, Saidman S, Semigran M, Disalvo T, Madsen J, Dec GW, Perez-Atayde AR, Collins AB. C4d deposition in cardiac allografts correlates with alloantibody. *J Heart Lung Transplant*. Sep 2005;24(9):1202-1210.
52. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*. Apr 2007;18(4):1046-1056.
53. Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, Foucher Y, Gwinner W, Braud C, Dugast E, Quillard T, Thebault P, Chiffolleau E, Braudeau C, Charreau B, Souillou JP, Brouard S. Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection. *J Am Soc Nephrol*. Mar 27 2008.
54. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Feb 1969;57(2):225-229.

55. Minami K, Murata K, Lee CY, Fox-Talbot K, Wasowska BA, Pescovitz MD, Baldwin WM, 3rd. C4d deposition and clearance in cardiac transplants correlates with alloantibody levels and rejection in rats. *Am J Transplant*. May 2006;6(5 Pt 1):923-932.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Sequence alignment and peptides. 16 amino acid-long overlapping peptides (61 peptides) were chosen along the polymorphic regions of the RT1A^u (α 1, α 2 and α 3 domains), RT1.B^u (β 1 domain) and RT1.D^u (β 1 domain) molecules. Peptides 1, 2, 3, 66 and 67 were chosen in the non polymorphic sequences of the RT1A^u molecule.

Figure 2: Immunodominant peptides.

(A) *Immunodominant peptides are derived from donor RT1.D^u molecules.* Splenocytes (4×10^5) from untreated animals were obtained 7 days after transplantation (n=6) and stimulated in IFN γ ELISPOT assays with peptides from donor RT1A^u (α 1, α 2 and α 3 domains), RT1.B^u (β 1 domain) and RT1.D^u (β 1 domain) molecules. Bars represent the mean frequency of IFN γ -producing cells $\pm$ SEM for n=6 animals. Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test comparing peptide-stimulated cells to unstimulated cells (* p<0.05 and **p<0.01). (B) *Peptides are specific.* LEW.1A rats received a heart allograft from syngeneic (RT1^a), BN (RT1^b) or LEW.1W (RT1^u) rats 7 days before sample collection. LEW.1A splenocytes were stimulated for 24 hours in an IFN γ ELISPOT assay with peptides 29 and 37 from RT1.D^u molecules. Results $\pm$ SEM are representative of at least three animals. Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test to compare peptide-stimulated cells to unstimulated cells (* p<0.05) or using the Kruskal-Wallis test to compare each graft type ($\square$ p<0.05).

Figure 3: Indirect response in rejecting animals.

(A) *The response towards peptide 37 is directed against the small epitope P15.* 4×10^5 splenocytes from untreated animals on day 7 (n=8) were stimulated in an ELISPOT assay

with 8 amino acid overlapping peptides from the sequence of peptide 29 (P1 to P8) or 37 (P9 to P16). Statistical significance was calculated with the Mann-Whitney test comparing each value with the control cells alone (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). (B) *The response towards peptides 29 and 37 is mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively.* CD4⁺ (grey bars) or CD8⁺ (black bars) T splenocytes were purified from untreated recipients 5 days after transplantation (n=6). 2×10^5 cells were stimulated for 24 hours in an ELISPOT assay with peptides 29, 37 and P15 in the presence of 2×10^5 irradiated recipient splenocytes. Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test comparing CD4⁺ to CD8⁺-mediated responses (* $p < 0.05$). Results $\pm$ SEM are representative of at least three animals.

Figure 4: Direct and indirect pathways of allorecognition in rejecting or DST-treated animals.

4×10^5 cells harvested from spleen, lymph nodes, blood and grafts before transplantation (day -14, -7 and day 0) and from day 3 to 100 after transplantation of LEW.1W heart allografts, were stimulated 24 hours in IFN γ ELISPOT assay. (A) *Direct pathway.* LEW.1A cells were stimulated with donor irradiated splenocytes (1×10^5). (B) *Indirect pathway.* Cells were tested for their reactivity against peptides 29 and 37 derived from donor MHC class II (RT1^u) molecules. (A) and (B) DST-treated recipients (circles, dotted lines), untreated recipients (squares, full lines). The dotted lines in the graphs showing the response in the graft, represent the frequency of IFN γ producing cells in the absence of stimulation (irradiated donor cells or peptides) *in vitro*. Note that the frequencies of activated cells was higher in the direct than in the indirect pathway, scales are different. Significant differences were calculated by the Kruskal-Wallis test ($\square$) to evaluate differences between each time point and by the Mann-Whitney U test (*) to compare the untreated and DST-treated groups of animals at each day. ($\square$ and * $p < 0.05$; $\square\square$ and ** $p < 0.01$). Results at each day $\pm$ SEM are representative of at least 3

animals.

Figure 5: Indirect response in DST-treated animals.

(A) *The indirect response towards peptide 29 is mediated by CD4⁺ T cells in DST-treated recipients. CD4⁺ (grey bars) or CD8⁺ (black bars) T splenocytes were purified from DST-treated (day 7) recipients. 2x10⁵ cells were stimulated for 24 hours in an ELISPOT assay with peptides 29, 37 and P15 in the presence of 2x10⁵ irradiated recipient splenocytes. Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test comparing CD4⁺ to CD8⁺-mediated responses (* p<0.05). Results ± SEM are representative of 5 animals.* (B) *CD4⁺CD25^{high} depletion had no effect on the indirect response in the spleens from DST-treated animals at day 7 after transplantation. 4x10⁵ enriched T cells, 4x10⁵ CD4⁺CD25^{high} depleted T cells or 2.5x10⁴ CD4⁺CD25^{high} or non-T cells were stimulated in the presence of 1x10⁵ irradiated recipient splenocytes with peptide 29 or 37 for 24 hours in an IFN γ ELISPOT assay. Results ± SEM are representative of n=7 animals. Statistical significance was evaluated using the Mann-Whitney test to compare peptide-stimulated cells to unstimulated cells or to compare the values between the different subsets (* p<0.05).*

Figure 6: Unbiased and sustained circulating anti-donor class I and class II antibodies in DST-treated animals.

Assessment of anti-donor class I and class II IgG subtypes (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c) in the sera of 1 naïve, 3 rejecting (day 7), or 3 DST-treated animals and 3 syngenic recipients (day 7, 30 and 100) after transplantation. For anti-class I assessment, donor splenocytes were incubated with unmodified sera. For anti-class II assessment, donor-derived conA blasts were incubated with class I antibody-depleted sera (1/20^e). Cells were stained with mouse purified anti-rat IgG1, IgG2a IgG2b or IgG2c mAbs revealed with PE-conjugated donkey anti-mouse

mAbs. At the same time, splenocytes were stained with FITC-conjugated anti-rat HIS24 mAbs (anti-B lymphocytes). Cells were analysed using a FACScan with CellQuest software (BD Biosciences). The analysis was performed by double staining on HIS24 negative cells. Data are expressed in mean fluorescence channel.

Figure 7: Pathologic findings in DST-treated animals.

Heart allografts from syngenic or DST-treated animals were removed and fixed in 4% diluted formalin. Tissue blocks were routinely processed and embedded in paraffin. Serial sections of 6µm were obtained for hematoxylin-eosin-saffron staining. (A) Normal artery observed in a syngenic animal at day 60 (HESX10). (B) Acute lesions with intimal leucocyte adhesion and infiltration in hearts from DST-treated animals at day 60 (HESX10). (C) Inflammatory intimal and perivascular fibrosis on day 100 (HESX20). (D) Intimal thickening and myofibroblast proliferation associated with perivascular fibrosis on day 140 (HESX10). (E) No complement binding in syngenic hearts from day 7 to 100 after transplantation (X10). (F) C4d deposits in capillaries (arrow a) and arteries (arrow b) in DST-treated hearts from day 7 to 100 post-transplantation (X10).

TABLES

Groups	Leucocytes (A)	Fibrosis (B)	Vascular damage (C)	Luminal occlusion (D)	% occluded arteries	Number of arteries examined	C4d staining DST/syngenic
Syngenic D140	1,1,1	1,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0	12,12,10	
DST D7	4,4,4	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0,	21,26,22	+/- (x3)
DST D14	4,4	0,1	1,0	2,0	30,0	40,42	+/- (x2)
DST D30	4,4,3	1,1,3	1,0,1	1,0,1	3,0,4	36,57,56	+/- (x3)
DST D60	3,2-3,2-3	2,2,4	1,0,1	2,0,1	5,0,8	18,19,13	+/- (x3)
DST D100	2,2,2-3	3,2,4	2,0,2	2,0,4	4,0,81	28,20,16	+/- (x3)
DST D140	2,2,3	2,1,3	2,2,2	4,2,3	44,37,76	9,8,17	
DST D240	1,1,2	2,2,2	2,3,3	3,2,2	73,7,50	8,14,8	
DST D320	3,2,3	3,3,4	2,2,3	3,4,4	50,33,70	10,6,10	

Table 1: Histological analyses of heart allografts.

Heart allografts from DST-treated (day 7, 14, 30, 60 and 100) or syngenic (day 140) animals were removed and fixed in 4% diluted formalin. Tissue blocks were routinely processed and embedded in paraffin. Serial sections of 6µm were obtained for hematoxylin-eosin-saffron staining. (A) Leucocytes (mononuclear cells): none=0; minor=1; moderate=2; dense=3; intense=4. (B) Fibrosis: none=0; focal=1; diffuse minor=2; diffuse moderate=3; diffuse marked=4. (C) Vascular damage: normal=0; leucocyte adhesion to endothelial cells=1; inflammatory intimal proliferation=2; fibrointimal thickening=3; atheroma=4. (D) Luminal occlusion: none=0; <20%=1; 20 à 50%=2; 50 à 80%=3; >80%=4.

FIGURES

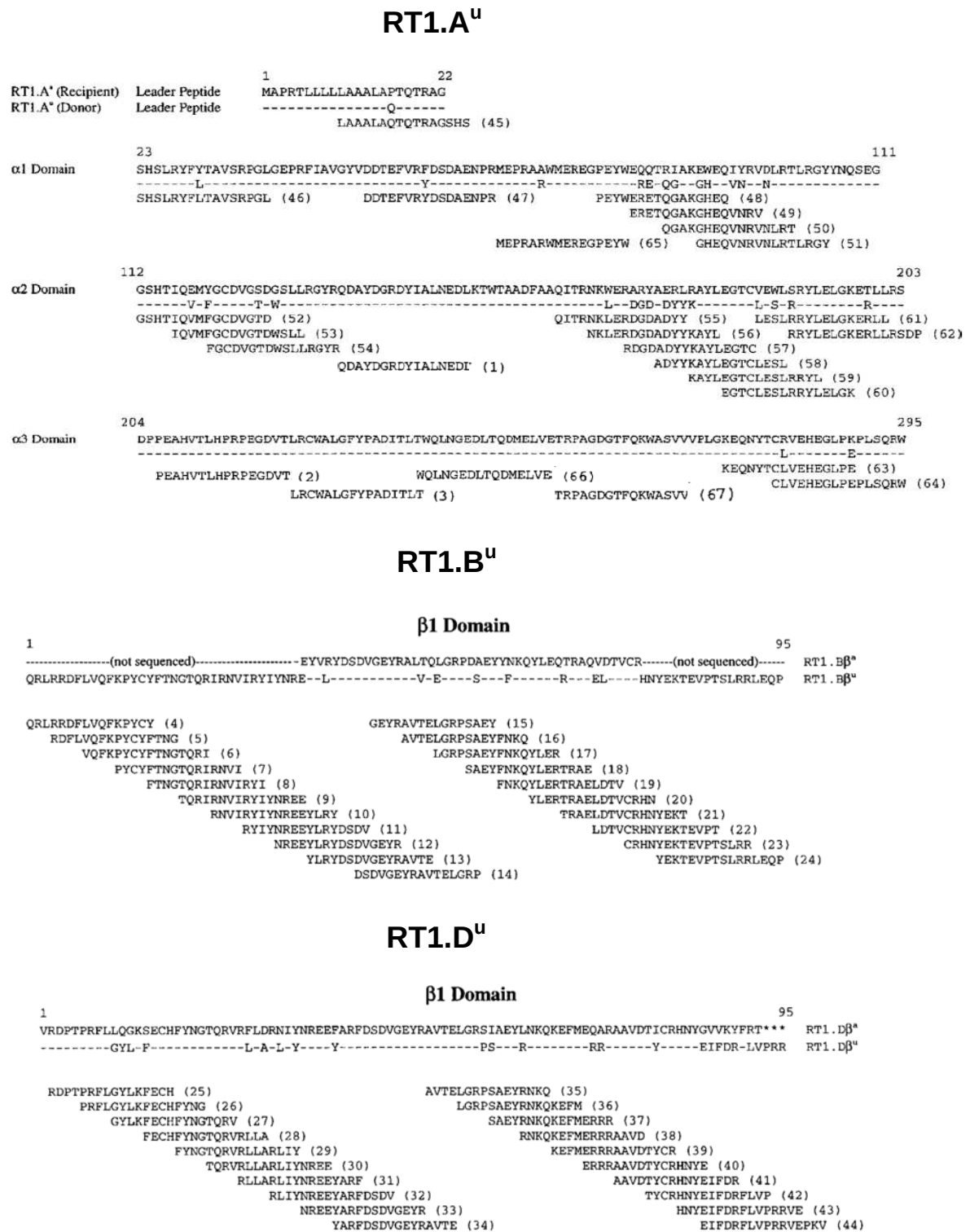


Figure 1

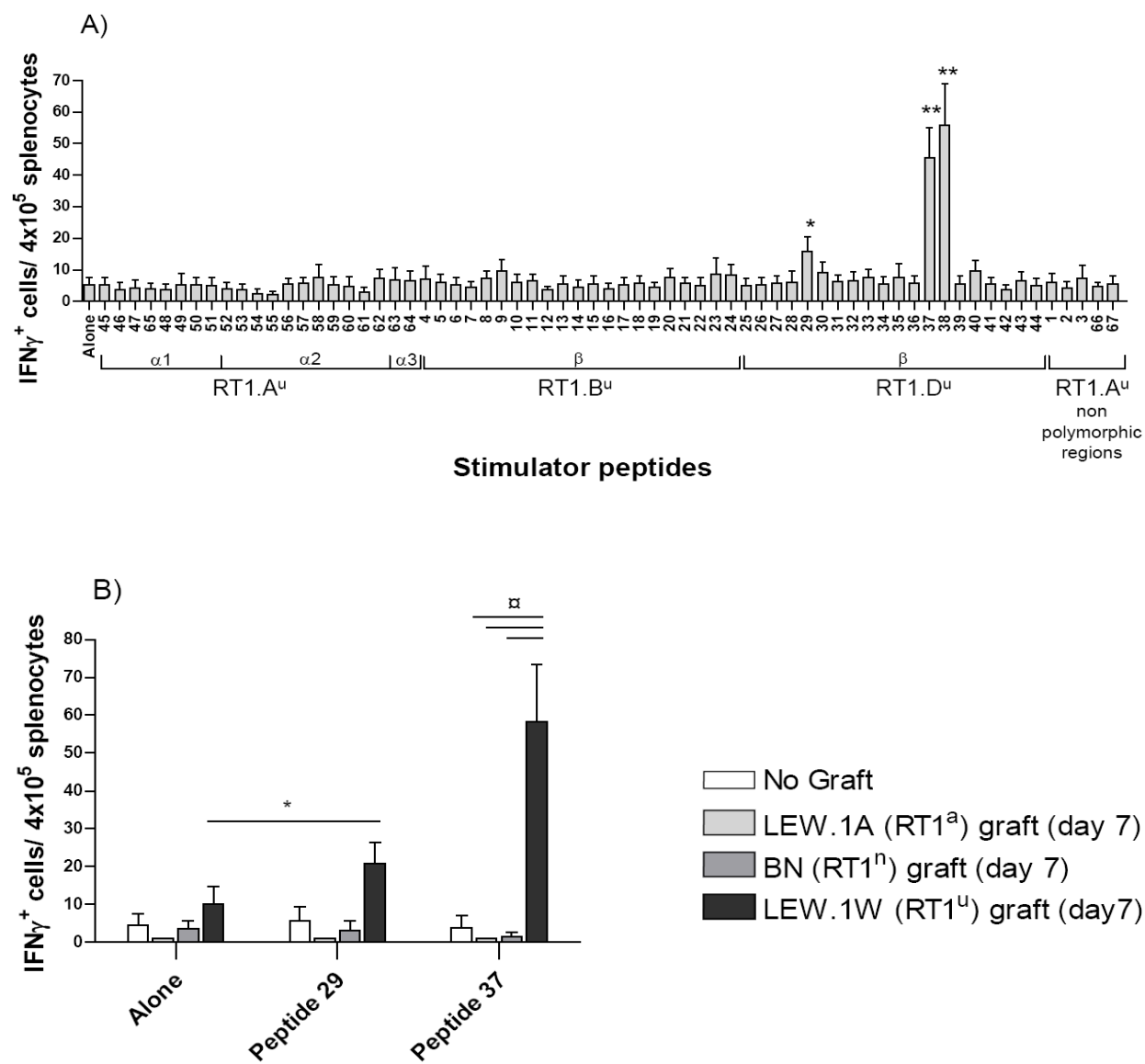


Figure 2

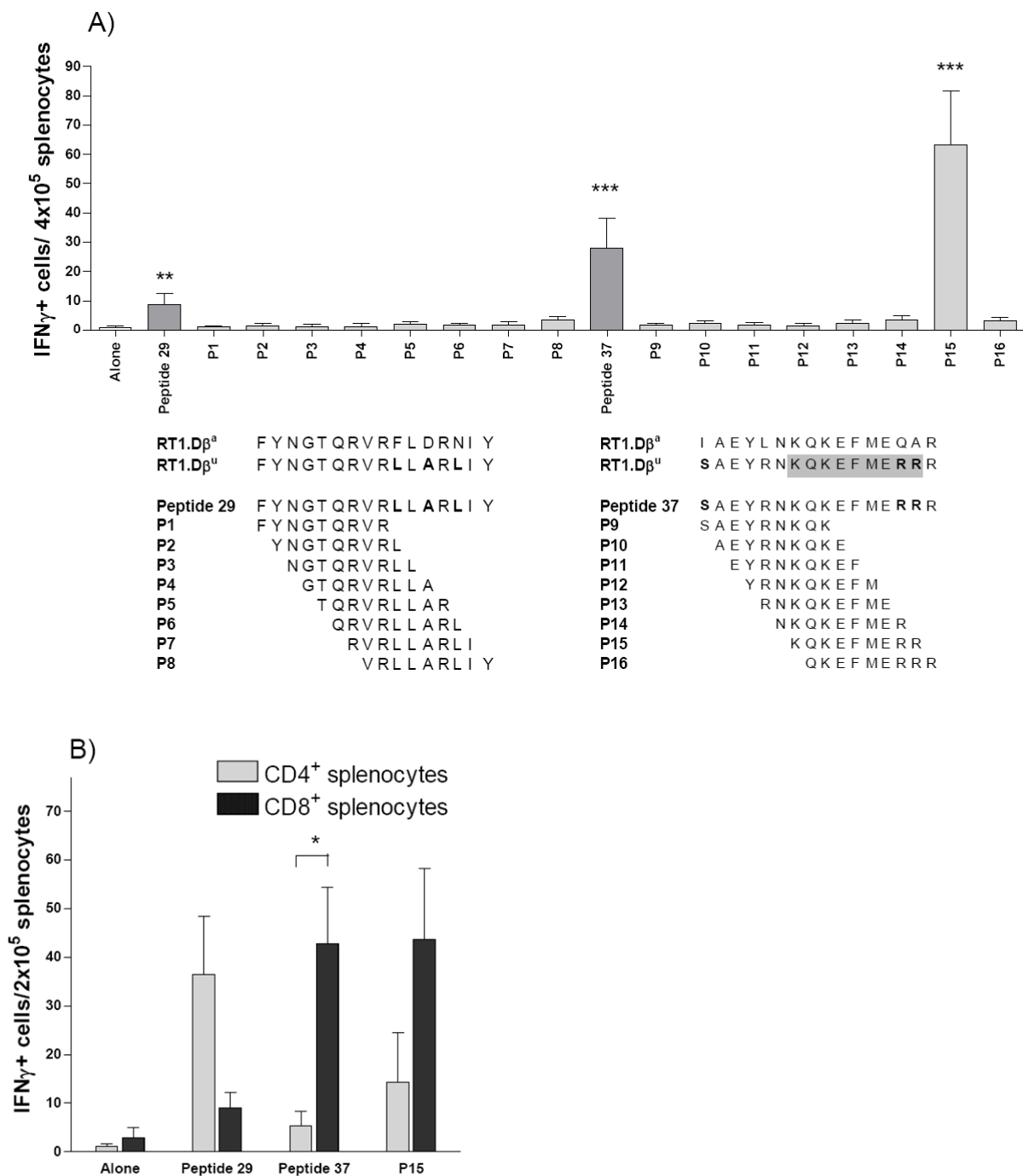


Figure 3

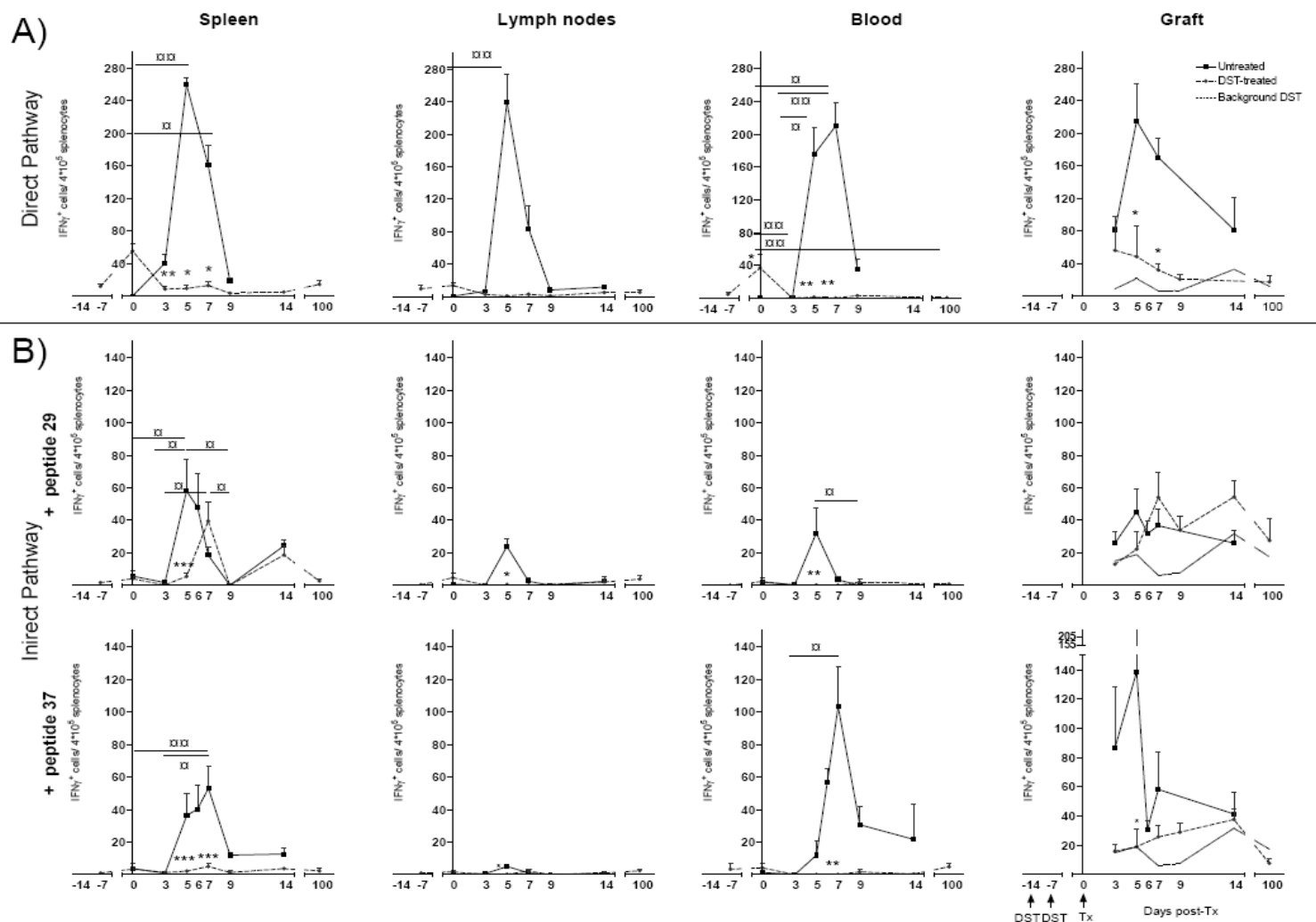


Figure 4

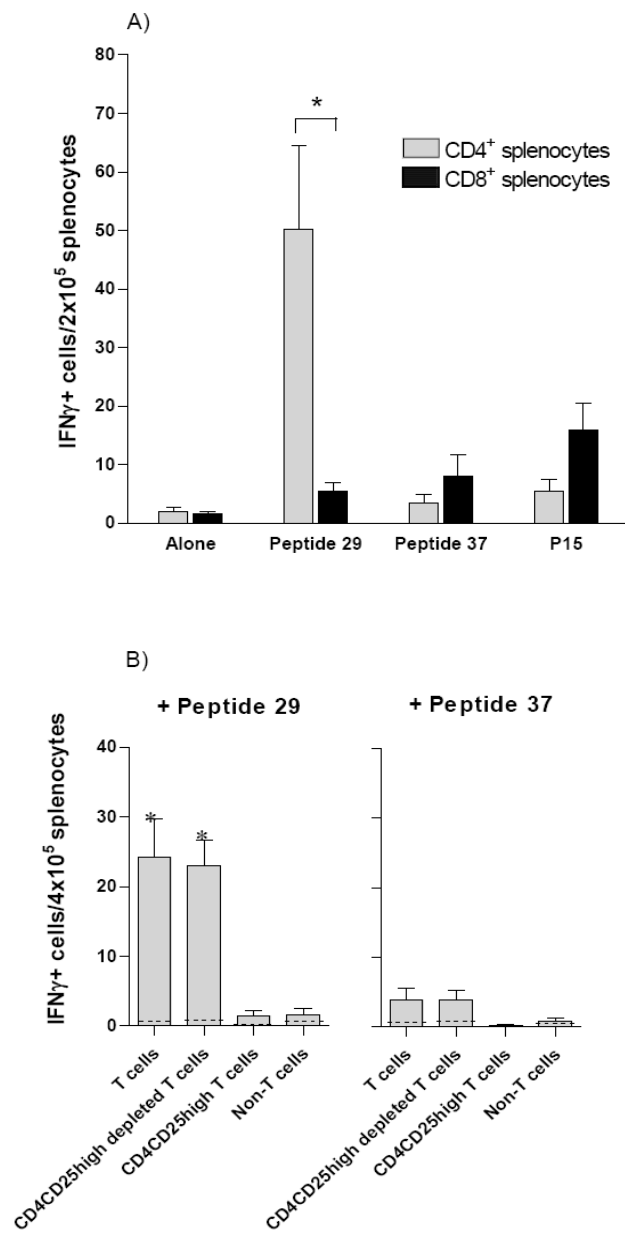


Figure 5

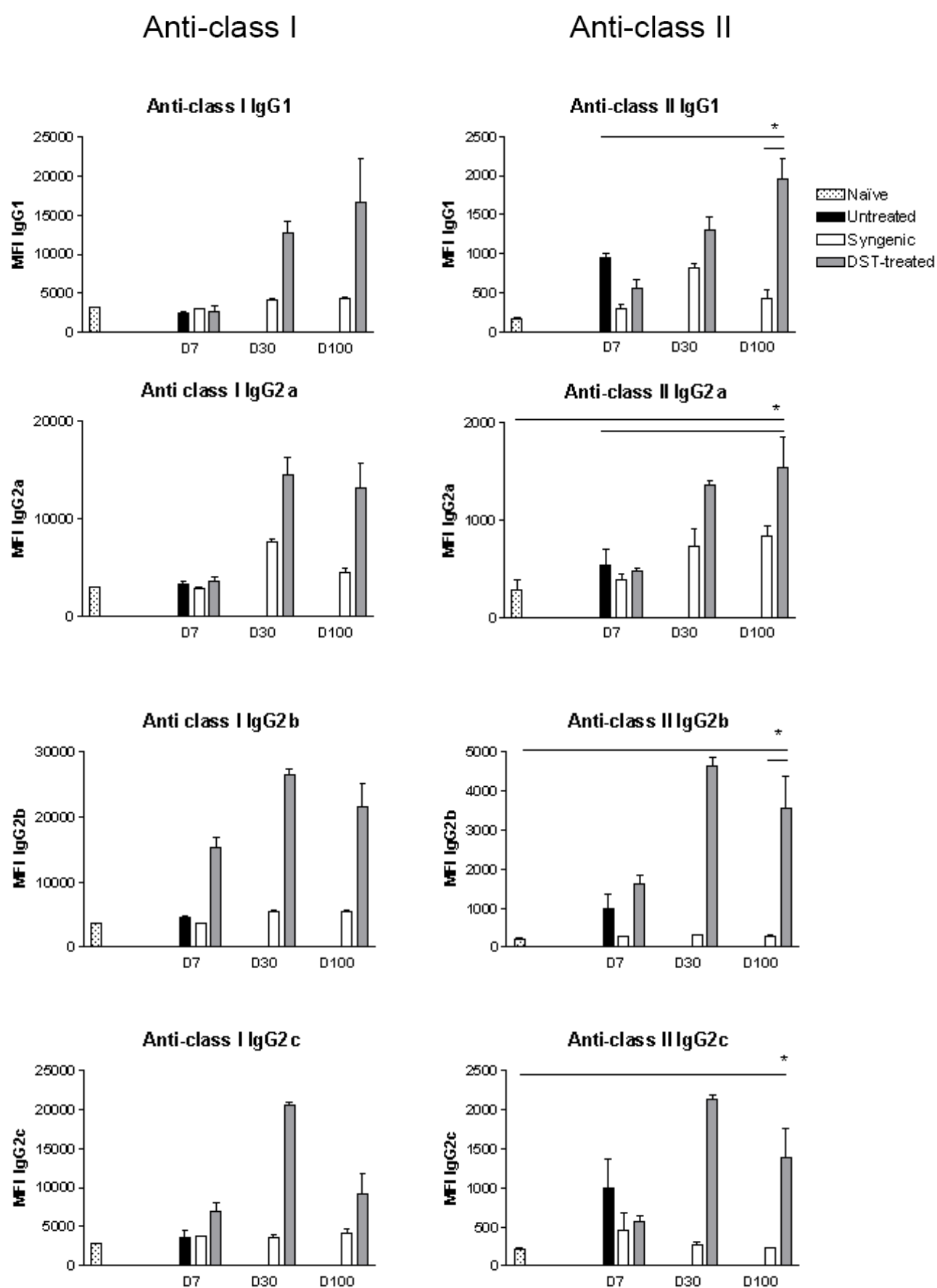


Figure 6

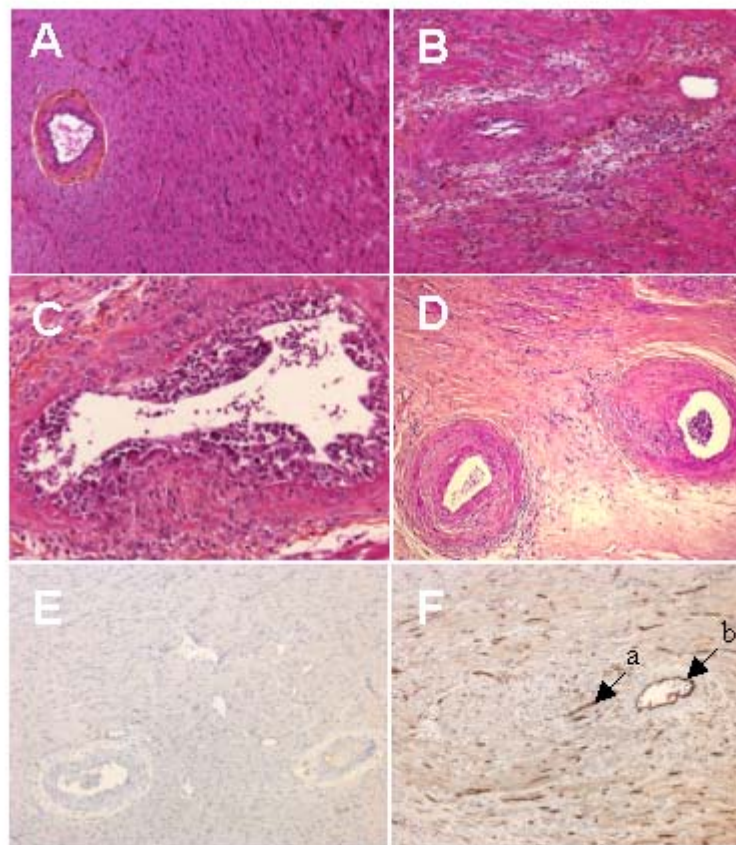


Figure 7

C. Conclusions et perspectives

La tolérance spécifique du greffon est le seul moyen de prévenir des rejets aigu et chronique tout en évitant la prise de traitements immunosuppresseurs. L'expérimentation a permis de montrer qu'un blocage de la costimulation [298], ou plus récemment l'injection de cellules régulatrices spécifiques de l'alloantigène [237] peut induire la tolérance à une greffe incompatible chez l'animal adulte. Ces stratégies n'ont pas abouti à la tolérance en transplantation humaine et la survie du greffon à long terme est notamment compromise par le développement d'un rejet chronique induit par les anticorps (Chronic Antibody Mediated Rejection : CAMR [7]). Disposer de modèles animaux se rapprochant au mieux de la situation clinique du rejet chronique permettrait de conceptualiser des outils pour la prévention ou le traitement de cette pathologie.

Une greffe de cœur de rat LEW.1W (RT1^u) à un hôte LEW.1A (RT1^a), donneur et receveur partageant le même fond génétique mais étant différents pour les molécules de classe I et II du CMH, est rejetée quelques jours après la transplantation. Nos travaux montrent que la greffe entraîne l'activation de cellules CD4⁺ et CD8⁺ alloréactives de spécificité directe mais aussi de cellules alloréactives dirigées contre des déterminants peptidiques issus des molécules de classe II du donneur par la voie indirecte. Dans cette combinaison, la transfusion de sang du donneur avant la greffe induit une survie prolongée du greffon (>100 jours). Néanmoins, est aussi observée une agression vasculaire progressive du greffon conduisant à des lésions typiques de rejet chronique comme la fibrose interstitielle du myocarde et l'occlusion de la lumière des vaisseaux qui fait suite à la prolifération des myofibroblastes dans l'intima. Les altérations observées à distance de la greffe sont associées à la présence de taux importants d'anticorps circulants spécifiques du donneur et de dépôts diffus de C4d sur les parois des capillaires, des artères et des veines du tissu myocardique. Ainsi, dans cette

combinaison, la transfusion de sang du donneur entraîne à long terme un rejet chronique mimant celui induit par les anticorps, et pourrait offrir un modèle de la situation clinique. En effet, en transplantation rénale, le « CAMR » est caractérisé par les mêmes lésions histologiques et la même présence d'anticorps spécifiques du donneur associée à des dépôts de C4d dans les biopsies [7]. Si le rejet chronique associé aux anticorps n'est pas aussi clairement défini dans la greffe cardiaque que dans la greffe rénale chez l'homme, ce modèle animal pourrait néanmoins servir d'outil privilégié pour tester l'efficacité de nouvelles molécules sur la prévention de cette pathologie.

Par exemple, le Belimumab®, un anticorps humanisé dirigé contre la forme soluble de la cytokine BAFF montre une efficacité sur le traitement du lupus érythémateux, une maladie auto-immune associée à la production d'auto-anticorps. La présence de BAFF, une cytokine impliquée dans la survie et la différenciation des lymphocytes B (voir pour revue [299]), pourrait aussi jouer un rôle dans le développement du CAMR en stimulant la production d'anticorps. Des résultats préliminaires de notre laboratoire montrent par ailleurs que les transcrits du récepteur de BAFF (BAFF-R) sont surexprimés dans les biopsies de patients greffés rénaux développant un rejet chronique humoral (CAMR). Tester l'effet des anticorps de BAFF dans la survenue du rejet chronique dans ce modèle pourrait donner une première indication de l'efficacité de cette molécule et de ses modalités d'utilisation en transplantation.

A la recherche de nouveaux marqueurs du rejet chronique, une comparaison croisée des données de la littérature et des résultats de PCR quantitatives obtenus à partir de l'analyse de prélèvements cardiaques de rats traités par DST, a permis l'identification d'une sous-unité de l'immunoprotéasome nommée PSMB10 (pour proteasome subunit beta 10) surrégulée chez les receveurs après DST mais pas après induction d'une « vraie » tolérance dans la même combinaison.

L'analyse par RT-PCR de biopsies rénales et de prélèvements sanguins issus d'une cohorte de patients greffés montre une surrégulation de PSMB10 dans le CAMR, tout comme chez les receveurs de greffe cardiaque LEW.1A préalablement transfusés (Ashton-Chess, J abstract accepted for oral presentation ATC may31st-4thjune 2008). A ce titre, il est intéressant de noter que le Velcade®, un agent inhibiteur du protéasome, prolonge aussi la survie d'une greffe cardiaque LEW.1W sur un receveur LEW.1A. Là encore, mesurer l'effet de Velcade® sur la production d'anticorps spécifiques du donneur et les dépôts de C4d dans notre modèle, permettrait de tester les modalités de son application éventuelle dans la prévention du CAMR.

Nos résultats montrent par ailleurs que les dépôts de C4d apparaissent très tôt au niveau des vaisseaux cardiaques chez les animaux transfusés. Cette présence est associée à la persistance de fonctions auxiliaires CD4⁺ de spécificité indirecte. Même s'il est connu que ce type cellulaire est capable de fournir les signaux nécessaires aux lymphocytes B pour la production d'anticorps [82], la participation des cellules CD4⁺ activées par la voie indirecte dans la production des anticorps dirigés contre le donneur reste à définir. Néanmoins, on peut imaginer que le contrôle de la voie de présentation indirecte devrait intervenir dès les premiers jours pour diminuer l'atteinte vasculaire chronique observée à 100 jours chez ces animaux. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour empêcher cette voie d'activation. La première consisterait à administrer les allopeptides immunodominants par voie tolérogène en combinaison avec la transfusion de sang du donneur. Dans plusieurs modèles, l'administration intrathymique de peptides de classe I ou II du donneur ont permis de prolonger la survie de greffons cardiaques {Chowdhury, 1998 #326} ou rénaux [68]. En association avec de faibles doses de CyclosporineA, l'injection sous-cutanée de peptides immunodominants peut elle aussi conduire à une prolongation de survie du greffon chez le rat [300].

Une seconde approche consisterait à induire l'expansion de cellules régulatrices spécifiques des peptides immunodominants dérivés du donneur puis à les réinjecter au moment de la greffe aux animaux receveurs traités au préalable par transfusion de sang du donneur. La population de cellules régulatrices naturelles $CD4^+CD25^+$ (T_{Reg}) dérivées du thymus, pourrait être un outil pour induire une tolérance à ces peptides. Les Treg sont impliqués dans de nombreux modèles où la tolérance a été induite par différentes manœuvres [222, 224, 228]. Bien qu'elles aient été décrites comme étant anergiques *in vitro*, spécifiques du soi, et peu représentées dans le sang (1 à 5%) [301], de nombreux articles montrent qu'il est possible d'induire ces cellules *in vitro* à la reconnaissance d'un alloantigène et de les multiplier en présence d'IL2, sans altérer leur propriétés immunosuppressives [236, 240]. Ces cellules peuvent reconnaître les alloantigènes par la voie indirecte de présentation [240]. Récemment, une équipe française a démontré que l'injection de T_{Reg} éduqués contre des cibles allogéniques puis injectés en association avec des cellules de moelle osseuse du donneur pouvait prévenir le rejet de greffe de peau et de cœur chez la souris. Le groupe montre notamment que les T_{Reg} spécifiques des antigènes du donneur ne préviennent du rejet chronique que si, en plus d'avoir été éduqués par voie directe, ils l'ont aussi été par voie indirecte [237]. Dans la même optique de produire une population de cellules régulatrices spécifiques du donneur, les T_{Reg} spécifiques des peptides immunodominants pourraient être isolés à partir du greffon des animaux transfusés à l'aide de multimères. Même si cette technologie est encore peu développée chez le rat, un article récent indique qu'il est possible de suivre des populations de lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques d'un peptide issu du Borna virus (BDV) à l'aide de pentamères $RT1^l$ complexés au peptide $N_{230-238}$ de la Nucléoprotéine du BDV [302]. Ainsi, les Tregs spécifiques des peptides immunodominants pourraient être multipliés *ex vivo* avant d'être réintroduits chez les animaux receveurs et ainsi favoriser dans le sens d'un effet supprimeur la balance des cellules TReg /T Effectrices. Ces approches sont

cependant très loin d'une utilisation clinique possible car elles se heurtent au problème de la multiplicité des épitopes. En outre, les modèles animaux sont clairement différents de la situation clinique (i.e impossibilité d'induire la tolérance). Il est vraisemblable que là encore, la voie pharmacologique sera plus réaliste.

II. Etude du statut immunitaire des patients tolérant spontanément une greffe de rein par la vaccination anti-grippale

A. Objectifs de l'étude

De rares patients greffés rénaux présentent les caractéristiques d'une tolérance « opérationnelle », c'est à dire qu'ils conservent une bonne fonction rénale malgré l'arrêt des traitements immunosuppresseurs depuis au moins six mois. Bien qu'ils ne présentent pas de signes sévères d'immunodépression (absence d'infections opportunistes ou de tumeurs viro-induites), on peut se demander si la survie du greffon relève d'une tolérance spécifique ou si elle résulte d'un certain degré d'immunodépression globale. Nous avons donc analysé les réponses cellulaire et humorale des patients « tolérants » face à une stimulation antigénique connue, la vaccination anti-grippale, et les avons comparées à celle de patients greffés rénaux traités par immunosuppression conventionnelle et à celles de volontaires sains.

B. Article II**HUMORAL AND CELLULAR RESPONSES TO INFLUENZA VACCINATION IN HUMAN RECIPIENTS TOLERANT TO A KIDNEY ALLOGRAFT**

Caroline Ballet^{1*}, Gwénaëlle Roussey-Kesler^{1*}, Jean-Thierry Aubin², Sophie Brouard¹,
Magali Giral¹ Patrick Miqueu¹, Stéphanie Louis¹, Sylvie Van der Werf² et Jean-Paul
Soulillou¹

* Les auteurs ont participé équitablement au travail

¹Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643 :
« Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et
de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035,
Nantes, Cedex 01, France

²Centre National de Référence du virus Influenzae (Région Nord), unité de génétique
Moléculaire des virus Respiratoires URA 196 CNRS, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur
Roux, 75724, Paris, France

Article accepté dans American Journal of Transplantation

Brief Communication

Humoral and Cellular Responses to Influenza Vaccination in Human Recipients Naturally Tolerant to a Kidney Allograft

C. Ballet^{a,†}, G. Roussey-Kesler^{a,†}, J.-T. Aubin^b,
S. Brouard^a, M. Giral^a, P. Miqueu^a, S. Louis^a,
S. van der Werf^b and J.-P. Souillou^{a,*}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 643: 'Immunointervention dans les Allo et xenotransplantations' and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU-HOTEL DIEU, 30 Bd Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France

^bCentre National de Référence du Virus Influenzae (Région-Nord), Unité de Génétique Moléculaire des Virus Respiratoires URA 196 CNRS, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

*Corresponding author: Jean-Paul Souillou, jean-paul.souillou@univ-nantes.fr

Rare kidney allograft recipients enjoy unaltered graft function years after interruption of their immunosuppressive treatment. To assess the extent to which this state of 'operational tolerance' (TOL) is specific to the graft and not the result of a global immunodeficiency, we analyzed the response of such patients following influenza vaccination. Hemagglutination inhibition titers and frequency of IFN γ -secreting T cells were measured before 1 and 3 months after vaccination. The proportion of healthy volunteers (HV) responding to vaccine was significantly higher than that of immunosuppressed (IS) patients. Three 'TOL' patients presented a humoral response similar to that of HV, whereas the two others had a poor response, like the IS recipients. Although the small number of patients does not allow for definitive conclusions to be made, these data suggest that the status of tolerance may be heterogeneous, with some patients with a global immunodeficiency and others with an adapted response to vaccination.

Key words: Influenza vaccination, kidney transplantation, operational tolerance

Received 5 May 2006, revised 29 June 2006 and accepted for publication 17 July 2006

Introduction

Organ transplantation represents the treatment of choice for terminal organ deficiencies. Nevertheless, prevention of rejection requires nonspecific immunosuppression, which increases the risk of infectious and tumoral diseases (1) and only poorly influences chronic rejection, the main cause of graft loss. Thus, a major goal in transplantation would be to achieve (or recognize) a state of tolerance specific to the graft in an immunocompetent host, in the absence of immunosuppressive drugs.

Although most patients who discontinue immunosuppressive drugs reject their grafts within the weeks following treatment withdrawal (2), a few patients maintain an acceptable and stable renal function years after immunosuppressive treatment interruption (2–4). Although the mechanisms responsible for this state of 'TOL' are poorly understood, some of these patients may harbor regulatory T cells (3).

Although the findings of a detailed clinical analysis of these immunosuppressive drug-free 'TOL' patients do not suggest these patients to be at increased risk of opportunistic infections or to be nonspecifically immunosuppressed (IS) (4), the extent to which these patients are able to respond to antigens different from those of their 'tolerated' graft is not yet known. The aim of this prospective study was therefore to determine whether these 'TOL' kidney recipients developed an immune response to influenza vaccination, or if they were immunoincompetent despite being free of all immunosuppressive treatment. To this end, the response of these patients to influenza vaccination was prospectively compared to that of age-matched kidney transplant recipients with stable and good graft function under conventional immunotherapy as well as healthy volunteers (HV). Since 'TOL' kidney recipients are very rare, only a small number of patients were eligible to participate in this study, thus limiting the statistical value of the results. We show here that the humoral response of the 'TOL' recipients to influenza vaccination is heterogeneous. Three patients out of five presented a response that did not differ from those of HV, suggesting specific regulation to graft antigens, whereas two patients out of five had a weak immune response, as observed in IS recipients.

[†]Ballet and Roussey-Kesler have participated equally in this work.

Table 1: Clinical and biological parameters of the “operationally tolerant” (TOL) and immunosuppressed (IS) recipients

Case	Birth date	Cause of renal insufficiency	Graft date	IS treatment (before IS withdrawal for TOL)	Tolerance duration since IS withdrawal in 2005 (years)	Creatininemia at test time ($\mu\text{mol/l}$)
TOL 1	26/12/1945	Undermined glomerulopathy	14/03/1987	CsA + AZA + CS	5	88
TOL 2	05/04/1978	Obstructive uropathy	05/07/1991	CsA + AZA + CS	6	118
TOL 3	29/01/1929	Interstitial nephropathy	02/01/1993	CsA + AZA + CS	11	96
TOL 4	15/09/1966	Drug toxicity	06/11/1998	CsA + AZA + CS	5	115
TOL 5	04/09/1931	Membranoproliferative glomerulonephritis	13/02/1973	AZA + CS	20	130
IS 1	04/03/1935	Lupus nephritis	07/01/1997	CsA + MMF	None	122
IS 2	25/03/1970	Interstitial nephropathy	24/08/1995	CsA + MMF	None	97
IS 3	11/05/1949	Polycystic kidney disease	20/01/1996	CsA + MMF	None	117
IS 4	21/05/1972	Focal segmental glomerulosclerosis	16/06/1998	Tacrolimus + MMF	None	101
IS 5	26/11/1940	Interstitial nephropathy	11/10/1997	Tacrolimus + MMF	None	116
IS 6	20/10/1939	Undermined	05/01/2001	Tacrolimus + MMF	None	92
IS 7	11/06/1964	Undermined	27/06/2002	Tacrolimus + MMF	None	118
IS 8	14/10/1941	IgA nephropathy	14/07/2002	Tacrolimus + MMF	None	103
IS 9	02/07/1954	Polycystic kidney disease	01/05/2002	Tacrolimus + MMF	None	81

IS: Immunosuppression, CsA: Ciclosporine, MMF: Mycophenolate Mofetil, PTLT: Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder, TOL: “Operationally tolerant” patients, IS: Immunosuppressed kidney recipients.

Patients, Materials and Methods

Patients

Five ‘TOL’ patients free of any immunosuppressive drug treatment, six IS kidney recipients and nine HV were recruited for the study during the 2003–2004 influenza vaccination campaign. The following year, four TOL patients, nine IS recipients and 15 HV were enrolled for the same protocol. Most of the patients participated in both studies (four TOL, six IS and six HV). The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the local Committee for the Protection of Patients for Biomedical Research. All patients signed a written informed consent before inclusion.

‘TOL’ kidney recipients were defined as patients displaying a stable renal function, with serum creatinine and proteinuria below $150 \mu\text{mol/L}$ and 1 g/24 h , respectively, in whom all immunosuppressive treatments had been stopped for more than 2 years. One patient had stopped immunosuppressive treatment after developing malignancies (posttransplantation lymphoproliferative disorder). The other ‘TOL’ patients stopped their treatment on their own accord. None of the ‘TOL’ patients had presented notable infections for at least 1 year prior to the study, and none received any treatment known to interfere with immune competence. The main clinical characteristics of these patients are indicated in Table 1. Age-matched kidney transplant recipients, all treated with a similar conventional immunosuppressive drug regimen to limit any potential variations (a calcineurin inhibitor: cyclosporine or tacrolimus, and mycophenolate mofetil [MMF]), were used as controls. None of the latter patients were treated with azathioprine or corticosteroids. All had received their transplants at least 1 year previously and all presented similar levels of serum creatinine at the time of testing (Table 1). An additional control group consisted of age-matched HV. Eight out of nine IS recipients had been vaccinated before the study (the vaccination history of one of the nine patients was unknown) and only 11 out of 18 HV had ever been vaccinated (it could not be determined whether 3 of these 18 individuals had been previously vaccinated). All tolerant patients had been previously vaccinated.

Influenza vaccine

A commercially available subunit virion influenza vaccine (Influvac[®], Solvay Pharma, Netherlands) was used for immunization. This trivalent vaccine contained purified hemagglutinin (HA) and neuraminidase of the influenza strains: A/Moscow/10/99 (H3N2)-like, A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)-like and B/Hong Kong/330/01-like strains for the 2003/2004 season, and A/Wyoming/3/2003 (H3N2)-like, A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)-like and B/Jiangsu/10/2003-like for the 2004/2005 season. The concentration of HA for each component was $15 \mu\text{g}$ per single dose (0.5 mL). A single dose of influenza vaccine was administered to each participant during the autumn season, before the beginning of the influenza season. Blood samples were obtained before (M0), 1 (M1) and 3 months (M3) after immunization.

Antibody titers

The titer of serum antibody to each strain of influenza virus was measured by a standard hemagglutination inhibition (HI) assay, using the same strains as those used in the vaccines. Pre and postvaccination sera were tested simultaneously. HI titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum that inhibited the agglutination of guinea pig red blood cells by a standardized amount of viral antigen. Converted HI titers were also calculated (HI titer divided by 10 and transformed to binary logarithms) (5). The difference between converted HI titers before 1 month (M1–M0) and 3 months (M3–M0) after vaccination was calculated for each individual in each group toward each strain. A difference in converted HI titers equal to or greater than two units before and after vaccination (which corresponds to a 4-fold increase in HI titers) indicates a positive humoral response (5). The response rate (percentage of individuals in each group presenting a positive humoral response after vaccination) for at least two strains of the vaccine 1 or 3 months after vaccination was analyzed.

Measurement of IFN γ -secreting T-cell frequency

The frequency of specific responder cells was determined by means of an IFN γ ELISPOT Assay. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

were isolated from EDTA-treated venous blood by standard ficoll isolation and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Sigma, L'Isle D'abeau Chesne, France), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), 100 µg/mL streptomycin (Sigma) and 0.1 mM nonessential aminoacids (Sigma), at a final concentration of 2.10^6 PBMC/mL. Fresh PBMC were then seeded in duplicate or triplicate in 96-well multitestplates coated with an anti-IFN γ primary antibody (AID, Strasberg, Germany) at a concentration of 2.10^5 cells per well (100 µL) and stimulated with influenza vaccine (0.45 µg HA/mL). PHA added at 30 µg/mL and a pool of cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV) and Influenza peptides (kindly provided by Dr Guillet J-G., Institut Cochin, France) added at a concentration of 10 µg/mL, were used as positive controls. Negative controls consisted of PBMC cultured alone. Plates were then incubated 24 h at 37°C in the presence of 5% CO $_2$. After washing, detecting biotinylated anti-IFN γ antibody (AID) was added and the plates incubated for 2.5 h at room temperature, after which time streptavidin-horse radish peroxidase (AID) was added for a further 2 h. The spots were developed using aminoethyl carbazolate in acetate buffer with H $_2$ O $_2$. Counting of spot-forming cells was performed with the AID-ELISPOT reader system (AID). The frequency of IFN γ -secreting cells was calculated per million of cells.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Software. Intergroup comparisons were made using a nonparametric Kruskal-Wallis test. Response rates in each group were compared with a Fischer test; $p \leq 0.05$ was considered as significant (*).

Results

Whereas conventionally IS kidney recipients presented a reduced humoral response to influenza vaccination, the response of 'TOL' patients was heterogeneous

There were no significant differences in HI titers before vaccination between the three groups of subjects in both

parts of the study. The mean difference between converted HI titers was significantly higher in HV than in IS recipients for two of the three strains (A/Moscow and A/NewCaledonia) at both 1 and 3 months postvaccination in the 2003/2004 campaign, and for one of the three strains (A/Wyoming) 1 month following vaccination in the 2004/2005 study (Figure 1; data at 3 months not shown). No significant difference was observed between 'TOL' and the two other groups for either campaign.

However, the low number of these extremely rare patients limit the relevance of statistical comparisons and an individual per individual analysis is likely more pertinent. Most of the HV presented a positive humoral response at 1 month to 2 or 3 viral strains (seven out nine in 2003/2004 and 9 out 15 in 2004/2005) (Figure 2). In contrast, only one IS recipient displayed such a response. Three 'TOL' patients presented a positive humoral response to two or three viral strains, as observed in HV (Note that Figure 2 mentioned 2/4 and 2/5 and not three, because one patient responded in 2003/2004, one patient in 2004/2005 and one patient in both campaigns). Two 'TOL' patients did not present such a response: one of them participated at both part of the vaccination study and never presented a positive humoral response to any strain. The second patient only participated at the 2003/2004 campaign and had a positive response to only one strain. Interestingly, the two last patients were the oldest (73- and 74-year-old whereas the three others were between 25- and 58-year-old). There were no differences in terms of leukocytes counts, creatininemia or gammaglobulins levels (data not shown). Taken together, these data showed that IS patients had a weaker humoral response to the vaccine than HV. 'TOL' patients presented a more heterogeneous response to vaccination: three patients out

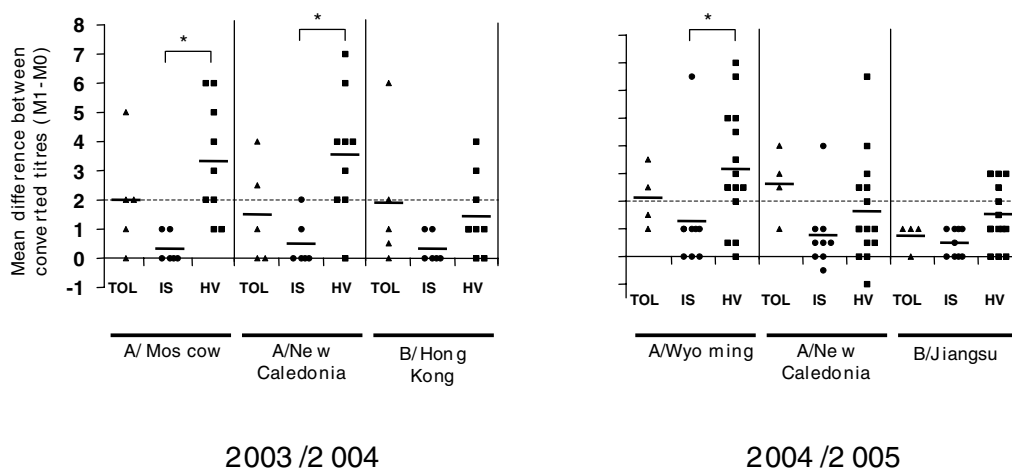


Figure 1: Mean difference in converted HI titers before and 1 month after vaccination for each strain of vaccine. HI titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution showing HI, divided by 10 and transformed to binary logarithms (converted titers). The mean differences between the converted titers observed at 1 month (M1) and the converted titers observed before vaccination (M0) are shown. A difference of two units indicates a positive humoral response (dotted line). The mean converted titer increase in HV (■) was significantly higher (* $p \leq 0.05$) than that of IS recipients (●) for two strains in the 2003/2004 season and one strain in the 2004/2005 season. 'TOL' recipients (▲) did not significantly differ from the other groups.

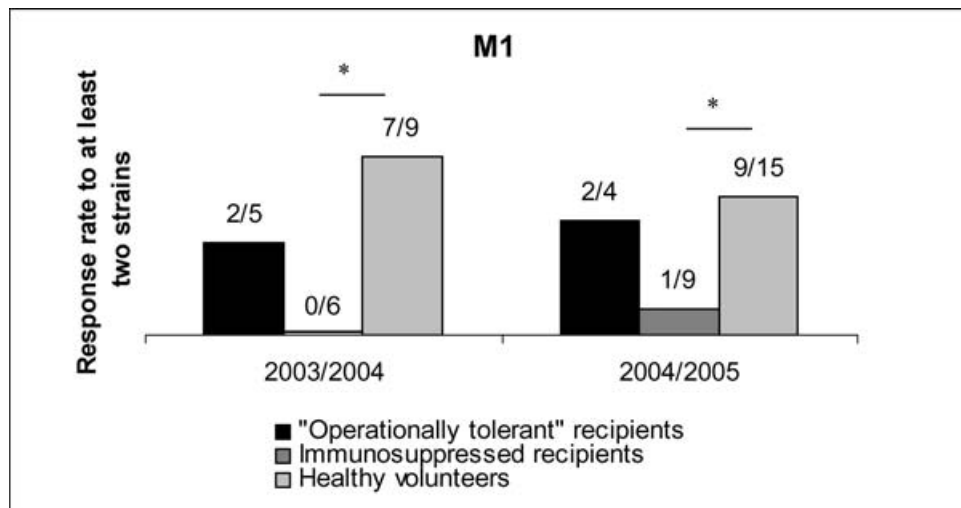


Figure 2: Response rate to at least two strains 1 month after vaccination. Proportion of individuals in each group presenting a positive humoral response (difference in converted titers before and after vaccination equal to or greater than two units) for at least two strains 1 month after vaccination (actual numbers indicated above). The percentage of individuals in the HV group presenting a positive humoral response was significantly higher (* $p < 0.05$) than that observed in the IS recipient group. Three 'TOL' patients presented a positive humoral response to two or three viral strains, as observed in HV, but only two are mentioned on the figure because one patient responded in 2003/2004, one patient in 2004/2005 and one patient in both campaigns.

of five had a response similar to that of HV (response to at least two strains) whereas the two others had a humoral response to vaccination similar to that of IS recipients (no response or response to only one strain).

The cellular response did not differ between the three groups

To assess whether a difference in the cellular response to the vaccine could be observed between the three groups, the mean increase in frequency of IFN γ -secreting T cells was determined after a 24-h *in vitro* stimulation with the vaccine 1 and 3 months following vaccination. Figure 3A shows an example of the ELISPOT assay results after stimulation of PBMC with vaccine before (M0) or after vaccination (M1 or M3) for a given individual. There was an increase in frequency of IFN γ -secreting cells after vaccination but no statistically significant differences were observed between the three groups (Figure 3B).

Discussion

Rare kidney recipients enjoy a good and stable graft function after cessation of immunosuppressive treatment and are thus considered as 'TOL'. To assess whether this state was related to a global immunodeficiency or specific to the graft, we evaluated for the first time the ability of such patients to respond to influenza vaccination and compared their response to that of kidney recipients under immunosuppressive treatment or HV. Because elderly individuals can present an impaired response to influenza vaccination

(6,7), our control subjects were age matched with the 'TOL' patients.

Several techniques have been reported to measure humoral and cellular responses following influenza vaccination. The humoral response is generally assessed by HI or ELISA assays (5,6,8). For the cellular response, proliferative production by PBMC after an *in vitro* stimulation (with the vaccine or purified proteins) and the frequency of specific T cells determined by flow cytometry analysis using tetramers have been reported (8–10). We chose to evaluate humoral and cellular responses to influenza vaccination by measuring specific antibodies in the serum and the frequency of peripheral T cells producing IFN γ in response to the vaccine. These analyses were performed before 1 and 3 months after vaccination because specific antibodies are mostly acquired more than 10 days after vaccination (11) and because most of the studies reported in the literature that have been conducted 4–6 weeks and 3 months after vaccination have shown that the vaccine specific antibodies were maintained at these time points (12,13). On the other hand, the cellular response probably precedes the humoral response as shown by CFSE/tetramer staining 10 days after vaccination (8). However, analyzing the IFN γ ELISPOT response earlier than 1 month postvaccination was not possible because the majority of the 'TOL' subjects refused to give consent for repeated blood samples and we took the option to focus on the humoral response.

We reported that the percentage of IS recipients with a positive humoral response for at least two strains of the vaccine was significantly lower than that of HV. These results

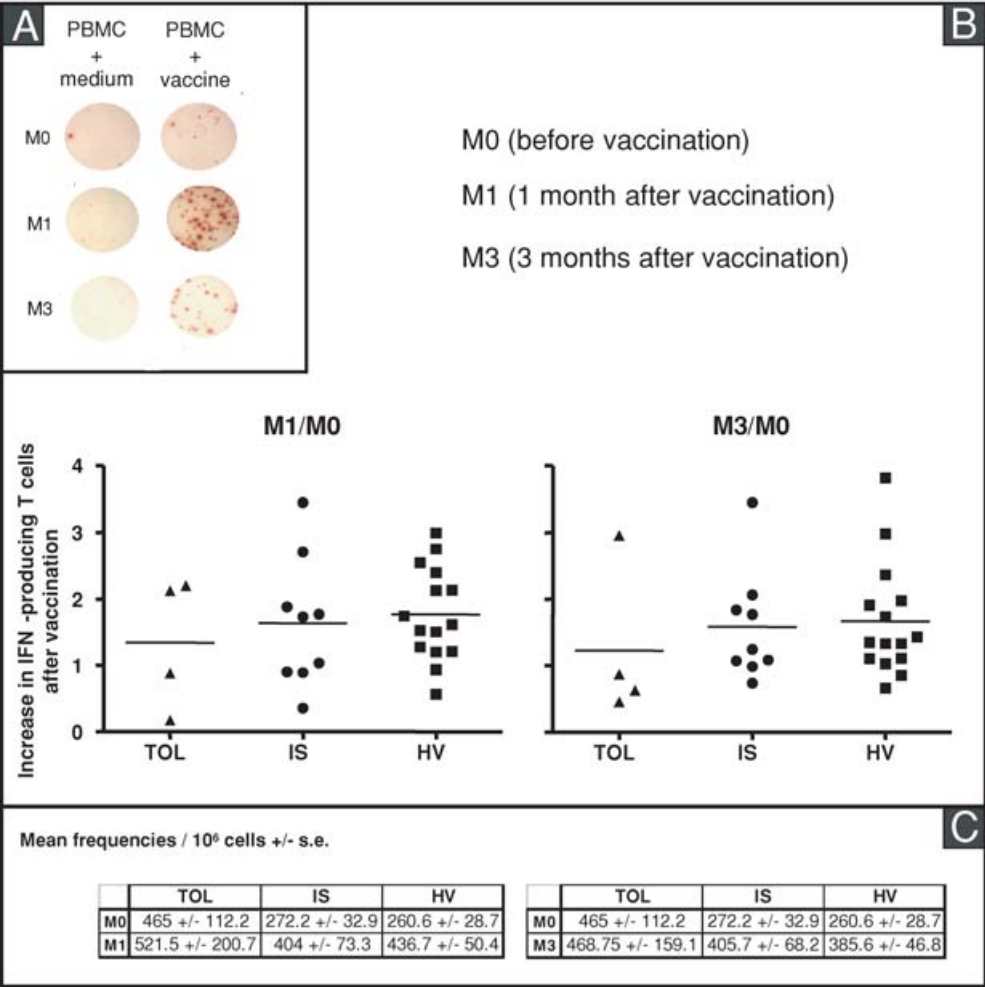


Figure 3: Frequency of IFN γ -secreting T cells determined by ELISPOT assay after a 24-h *in vitro* stimulation with the vaccine. PBMC were stimulated for 24 h with the vaccine as described in the Materials and Methods. (A) Example of spots observed with the IFN γ -ELISPOT assay following *in vitro* stimulation with the vaccine of PBMC collected before 1 or 3 months after vaccination. (B) The fold increase over baseline of the frequency of specific IFN γ -secreting T cells after vaccination is shown. No significant difference was found between the groups of 'TOL' patients ($\blacktriangle$), IS patients ($\bullet$) and HV ($\blacksquare$) at either time point. Corresponding actual ELISPOT mean values $\pm$ SE error are indicated in C.

were expected because previous studies have shown that transplant patients had an impaired humoral response to influenza vaccination (13–15). In our study, the immunosuppressive drugs likely influenced the efficacy of vaccination as described in cyclosporine (16) or MMF (15,17) treated patients who present a weaker humoral response. In contrast, the response of 'TOL' patients to vaccination did not homogeneously differ from that of HV or IS patients. The lack of significance between these groups may be linked to the small number of 'TOL' patients in the cohort studied, and an analysis patient per patient might be more pertinent here. Interestingly, three 'TOL' patients out of five tested presented a humoral response closer to that of HV, with a positive antibodies response to two or three viral strains contained in the vaccine. In contrast, two 'TOL' patients had a positive humoral response only to one or none

of the viral strains, as most of the IS recipients. The 'TOL' patients with a response to influenza vaccination similar to that of HV were the youngest (25–58-year old) whereas the two patients with a poor or absent humoral response were older (73- and 74-year old) and age has been shown to have an impact on the humoral response, as observed in previous studies in HV (6,18,19). In the same manner, the age of these patients may also impact their ability to mount an immune response toward their graft and thus play a role in these patients being 'TOL'. However, in such a small group of patients, it is difficult to assess that age has any influence.

We next measured the cellular response to vaccination. Although we noted an increase in the frequency of IFN γ -secreting cells after vaccination, this increase did not

significantly differ among the three groups. Our data suggest that IS patients may present a dissociated response to vaccination, with a relatively conserved cellular response but an impaired humoral response. The dissociation has already been observed in elderly subjects (7) some of whom present an intact cellular response but a deficient humoral response or in children after hemopoietic stem cell transplantation who present an increase of cellular response only after vaccination (20). Impaired humoral and conserved cellular response have been also reported in patients treated by MMF which predominantly affects the humoral response (17). However, in absence of early time point samples, our study cannot differentiate between a conserved cellular response or a different kinetic of response in IS recipients. One can also hypothesize that the cellular response observed with the Elispot assay may encompass the reactivity towards common influenza epitopes to various strains, hiding to some extent the specific response to the vaccine.

Taken together, this study shows that IS patients have a poor humoral response following influenza vaccination, significantly weaker than that of HV, with a more conserved cellular response. Interestingly, our data also show that some of the 'TOL' patients present humoral and cellular responses that do not differ from those of the HV. These observations are also in agreement with the fact that the 'TOL' patients did not present abnormal increase in infectious diseases after immunosuppression withdrawal (4). However, the results also revealed that the response to vaccination of 'TOL' patients was heterogeneous, and that some 'TOL' patients presented only a poor humoral response, as observed in IS recipients despite the absence of immunosuppressive medication. Taken together, these data suggest that the state of 'TOL', which is rarely observed following renal transplantation, may in some cases be associated with an adapted immune response, but in others may be related to a certain degree of global immunodeficiency, despite these patients were free of unusual rate (or type) of infectious disease.

Acknowledgments

The authors thank Dr. J. Ashton-Chess for editing the manuscript and the technical staff of the CNR du virus influenzae (Region-Nord) for excellent assistance.

References

1. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352: 1371–1373.
2. Zoller KM, Cho SI, Cohen JJ, Harrington JT. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: A national survey. *Kidney Int* 1980; 18: 110–114.
3. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E et al. Human

- allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000; 106: 145–155.
4. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 736–746.
5. Beyer WE, Palache AM, Luchters G, Nauta J, Osterhaus AD. Sero-protection rate, mean fold increase, seroconversion rate: Which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res* 2004; 103: 125–132.
6. Powers DC, Belshe RB. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 1993; 167: 584–592.
7. Bernstein E, Kaye D, Abrutyn E, Gross P, Dorfman M, Murasko DM. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine* 1999; 17: 82–94.
8. Danke NA, Kwok WW. HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol* 2003; 171: 3163–3169.
9. Mazzone PJ, Mossad SB, Mawhorter SD, Mehta AC, Mauer JR. Cell-mediated immune response to influenza vaccination in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 1175–1181.
10. Briggs WA, Rozek RJ, Migdal SD et al. Influenza vaccination in kidney transplant recipients: Cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 1980; 92: 471–477.
11. Lambkin R, Oxford JS, Biao L, Al-Jabri A, Fleming D. Rapid antibody response to influenza vaccination in 'at risk' groups. *Vaccine* 2000; 18: 2307–2311.
12. McElhaney JE, Upshaw CM, Hooton JW, Lechelt KE, Meneilly GS. Responses to influenza vaccination in different T-cell subsets: A comparison of healthy young and older adults. *Vaccine* 1998; 16: 1742–1747.
13. Mazzone PJ, Mossad SB, Mawhorter SD, Mehta AC, Schilz RJ, Maurer JR. The humoral immune response to influenza vaccination in lung transplant patients. *Eur Respir J* 2001; 18: 971–976.
14. Blumberg EA, Albano C, Pruett T et al. The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 295–302.
15. Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Naranjo P, et al. Influenza virus immunization effectivity in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: Mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation* 2000; 69: 436–439.
16. Versluis DJ, Beyer WE, Masurel N, Wenting GJ, Weimar W. Impairment of the immune response to influenza vaccination in renal transplant recipients by cyclosporine, but not azathioprine. *Transplantation* 1986; 42: 376–379.
17. Smith KG, Isbel NM, Catton MG, Leydon JA, Becker GJ, Walker RG. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 160–164.
18. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001; 75: 12182–12187.
19. Murasko DM, Bernstein ED, Gardner EM et al. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol* 2002; 37: 427–439.
20. Haining WN, Evans JW, Seth NP et al. Measuring T cell immunity to influenza vaccination in children after haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004; 127: 322–325.

C. Conclusions et perspectives

L'induction d'une tolérance à une allogreffe, en permettant la diminution voire l'arrêt des traitements immunosuppresseurs tout en prévenant les rejets aigu et chronique est un objectif majeur en transplantation. L'adaptation des protocoles d'induction de tolérance efficaces chez l'animal à l'homme n'a pour autant pas encore été réalisée avec succès et doit encore être améliorée. L'état de tolérance obtenue chez certains patients étant de plus instable [289], il est nécessaire de définir des marqueurs de tolérance pour un suivi adapté des greffons. Une signature de cet état, si elle est détectée chez des individus greffés stables sous immunosuppression, pourrait par ailleurs permettre la diminution du traitement chez ces patients. Pour toutes ces raisons, les patients « opérationnellement » tolérants constituent un véritable « outil » pour la dissection des mécanismes liés à la tolérance, et pour l'établissement de biomarqueurs de cet état.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au statut immunitaire de 5 patients tolérant spontanément leur greffon rénal malgré un arrêt du traitement immunosuppresseur pour non-compliance depuis plus de cinq ans. Bien que ces patients ne présentaient pas de signes cliniques d'immunodépression, puisque depuis l'arrêt des traitements ils n'avaient pas eu d'infections sévères ou de néoplasies viro-induite [289], il était important de déterminer si l'état de tolérance observé chez ces patients était spécifique du greffon ou si ces patients conservaient des réponses immunitaires globalement diminuées.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons analysé la réponse immunitaire des patients « opérationnellement » tolérants après une vaccination anti-grippale deux années consécutives. Ces patients étant rares et peu compliants, nous n'avons pu conduire cette étude que sur un faible effectif d'individus. Nous avons observé que la réponse immunitaire de ces patients n'était pas différente de celle des sujets volontaires sains. En revanche, les patients

greffés rénaux traités par une association d'immunosuppresseurs avaient une réponse significativement plus faible que les volontaires sains. La réponse cellulaire n'était quant à elle pas différente entre les groupes. L'analyse individuelle des patients révèle qu'une proportion plus importante d'individus « tolérants » (3 patients sur 5) que d'individus sous-immunosuppression (1 patient sur 9) présente une réponse humorale positive à la vaccination anti-grippale. Il semble donc que l'état de tolérance puisse être associé dans certains cas à une capacité immunitaire intacte, et dans d'autres, puisse être le résultat d'un certain degré d'immunodépression.

Plusieurs études ont été menées depuis sur les patients « opérationnellement » tolérants, révélant plusieurs de leurs caractéristiques phénotypique, fonctionnelle et transcriptionnelle. Les cellules régulatrices T $CD4^+CD25^{high}$ ne semblent pas être impliquées dans le phénomène car leur proportion dans le sang n'est pas augmentée chez ces patients par rapport aux individus sains [292] [291]. Cette absence d'augmentation ne peut pas être expliquée par une meilleure activité suppressive de ces cellules car leurs fonctions testées *in vitro* ne sont pas différentes de celles d'individus greffés stables sous immunosuppression ou d'individus sains [294]. Une étude par puces à ADN a révélé quant à elle l'existence d'un état de quiescence immunologique avec la plupart des gènes pro-inflammatoires sous-exprimés dans le sang des patients « opérationnellement » tolérants. Parmi les gènes différentiellement exprimés, 27% d'entre eux concernaient des gènes régulés par le TGFβ [293]. De cette étude a découlé l'établissement d'une signature immunologique de 49 gènes de l'état de tolérance.

De nouveaux axes de recherche sont nés de ces travaux dans le laboratoire. Tout d'abord, la signature immunologique de l'état de tolérance est actuellement testée sur une cohorte de 239 patients greffés sous immunosuppression présentant une fonction stable de leur greffon depuis plus de 5 ans. Ils ont été inclus dans le cadre d'un Programme Hospitalier de recherche Clinique (PHRC) au CHU de Nantes et à l'hôpital Necker à Paris. Si ces patients

présentent un profil semblable aux patients tolérants, une diminution du traitement immunosuppresseur pourra alors être envisagée, ce qui n'a encore jamais été réalisé.

Des résultats préliminaires montrent par ailleurs que parmi les 49 gènes associés à l'état de tolérance, le gène SMILE, codant pour une molécule de fonction encore inconnue, est surexprimé dans le sang des patients opérationnellement tolérants par rapport aux patients présentant un rejet chronique. Des recherches sont actuellement conduites pour caractériser les fonctions de SMILE et définir son rôle potentiel dans la tolérance.

D'autres analyses montrent par ailleurs une signature B particulière chez les patients « opérationnellement » tolérants. D'une part, les lymphocytes B sont présents dans de plus fortes proportions chez les patients tolérants par rapport aux patients présentant un rejet chronique ou une fonction stable du greffon sous immunosuppression. D'autre part, ces lymphocytes présentent un profil de cellules mémoires (CD27). Enfin, des analyses transcriptionnelles montrent que le ratio $CD32\alpha/CD32\beta$ ($CD32\alpha$ codant pour une molécule activatrice et $CD32\beta$ pour une molécule inhibitrice qui se fixent sur le fragment Fc des IgG [303]) est fortement diminué chez les patients tolérants. La molécule BANK1 (qui inhibe AKT dans la voie d'activation par CD40 [304]) est surexprimée, suggérant un profil inhibiteur des lymphocytes B activés. Ces résultats préliminaires suggèrent qu'une régulation de l'activation B pourrait opérer chez les patients tolérants.

Les perspectives d'étude sur les patients tolérants sont donc nombreuses. Elles sont néanmoins limitées par le faible nombre des patients répondant à de telles caractéristiques mais aussi par le nombre de prélèvements pour chacun des patients.

Conclusion

L'objectif des chercheurs en transplantation est d'offrir au patient la possibilité de s'accommoder d'une greffe sans qu'il ait à subir les effets néfastes des traitements immunosuppresseurs dont dépend chaque jour la survie du transplant. Il n'existe pas à l'heure actuelle de stratégies dites « d'induction de tolérance » applicables à l'homme et utilisables en routine, qui permettent à la fois l'arrêt des traitements immunosuppresseurs toxiques pour l'organisme et la prévention du rejet chronique. Ces stratégies, efficaces chez l'animal, se heurtent en effet à la complexité du système immunitaire humain.

Une alternative à ces stratégies serait d'identifier, parmi les patients sous traitement immunosuppresseur conventionnel, les individus présentant un profil associé à la signature de l'état de tolérance, ce qui permettrait la diminution de l'administration des immunosuppresseurs et de ses effets néfastes sur la survie du greffon à long terme. A la recherche des caractéristiques de l'état de tolérance, je me suis donc d'abord intéressée à une rare cohorte de patients présentant la capacité unique de « tolérer » spontanément leur greffon rénal malgré l'arrêt du traitement immunosuppresseur. L'objectif de l'étude était de déterminer si la survie du greffon résultait de l'induction d'une tolérance spécifique ou si elle était la conséquence d'une relative immunodépression. L'analyse de la réponse immunitaire induite par la vaccination anti-grippale révèle que les patients « opérationnellement » tolérants sont pour la plupart immunocompétents. Ils réagissent à la vaccination de façon comparable aux volontaires sains. Cette constatation, ajoutée au fait que ces patients ne développent pas d'infections opportunistes sévères ou de tumeurs viro-induites, suggère que la tolérance observée est spécifique du greffon. Plusieurs études ayant fait suite à ce travail ont permis d'identifier certains biomarqueurs de l'état de tolérance, notamment par le biais d'une analyse transcriptionnelle des cellules du sang des patients « opérationnellement » tolérants. S'il est possible de dépister cette signature immunologique chez des patients greffés traités, une diminution progressive du traitement pourra alors être envisagée, ce qui permettrait de réduire

les risques liés à l'immunosuppression. L'analyse transcriptionnelle de 239 individus greffés rénaux sous traitement est actuellement en cours.

Puisqu'il est néanmoins difficile de prédire si cet état de tolérance sera durable et puisque tous les patients ne pourront pas bénéficier d'une telle réduction médicamenteuse, il est crucial de poursuivre les recherches sur le diagnostic, la prévention et le traitement du rejet chronique. C'est dans ce contexte que je me suis intéressée à un modèle de transplantation cardiaque chez le rat, où les greffons qui survivent à long terme, à la suite de transfusions de sang du donneur, présentent une fibrose et une vasculopathie typiques d'un rejet chronique. L'analyse des réponses immunitaires humorales et cellulaires (directe et indirecte) indique que ce rejet chronique présente des caractéristiques communes avec celui observé chez l'homme, car il est associé à la production d'anticorps spécifiques du donneur et à des dépôts diffus de C4d dans les greffons. Ce modèle pourrait servir d'outil pour tester les modalités d'utilisation de nouvelles molécules dédiées à la prévention ou au traitement du rejet chronique chez l'homme.

Bibliographie

1. Meier-Kriesche, H.U., et al., *Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era*. Am J Transplant, 2004. **4**(3): p. 378-83.
2. Merrill, J.P., et al., *Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins*. J Am Med Assoc, 1956. **160**(4): p. 277-82.
3. Starzl, T.E., et al., *Orthotopic homotransplantation of the human liver*. Ann Surg, 1968. **168**(3): p. 392-415.
4. Barnard, C.N., *Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town*. Am J Cardiol, 1968. **22**(4): p. 584-96.
5. Kourilsky, P., et al., *Working principles in the immune system implied by the "peptidic self" model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3400-4.
6. Williams, G.M., et al., *"Hyperacute" renal-homograft rejection in man*. N Engl J Med, 1968. **279**(12): p. 611-8.
7. Solez, K., et al., *Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions*. Am J Transplant, 2008. **8**(4): p. 753-60.
8. Bolton, E.M., et al., *Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat*. J Exp Med, 1989. **169**(6): p. 1931-46.
9. Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty, *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system*. Nature, 1974. **248**(450): p. 701-2.
10. Yewdell, J.W. and J.R. Bennink, *Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 51-88.
11. Collins, T., et al., *Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(15): p. 4917-21.
12. Jorgensen, J.L., et al., *Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics*. Nature, 1992. **355**(6357): p. 224-30.
13. Garboczi, D.N., et al., *Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 134-41.
14. Reinherz, E.L., et al., *The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1913-21.
15. Garcia, K.C., et al., *Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1166-72.
16. Garcia, K.C., L. Teyton, and I.A. Wilson, *Structural basis of T cell recognition*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 369-97.
17. Mason, D., *A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor*. Immunol Today, 1998. **19**(9): p. 395-404.
18. Jenkins, M.K., et al., *T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state*. Immunol Rev, 1987. **95**: p. 113-35.
19. Suchin, E.J., et al., *Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 973-81.
20. Karulin, A.Y., et al., *Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1862-72.
21. Bjorkman, P.J., et al., *Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2*. Nature, 1987. **329**(6139): p. 506-12.
22. Meuer, S.C., et al., *Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes*. Science, 1983. **222**(4629): p. 1239-42.
23. Reiser, J.B., et al., *CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 241-7.
24. Game, D.S. and R.I. Lechler, *Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance*. Transpl Immunol, 2002. **10**(2-3): p. 101-8.
25. Elliott, T.J. and H.N. Eisen, *Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5213-7.
26. Jankovic, V., et al., *T cell recognition of an engineered MHC class I molecule: implications for peptide-independent alloreactivity*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1887-92.
27. Fremont, D.H., et al., *Crystal structure of I-Ak in complex with a dominant epitope of lysozyme*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 305-17.
28. Matzinger, P. and M.J. Bevan, *Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?* Cell Immunol, 1977. **29**(1): p. 1-5.
29. Bradley, J.A., E.M. Bolton, and R.A. Pedersen, *Stem cell medicine encounters the immune system*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(11): p. 859-71.

30. Wucherpfennig, K.W. and J.L. Strominger, *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein*. *Cell*, 1995. **80**(5): p. 695-705.
31. Ben-Nun, A., et al., *Analysis of cross-reactive antigen-specific T cell clones. Specific recognition of two major histocompatibility complex (MHC) and two non-MHC antigens by a single clone*. *J Exp Med*, 1983. **157**(6): p. 2147-53.
32. Talmage, D.W., et al., *Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection*. *Science*, 1976. **191**(4225): p. 385-8.
33. Bowen, K.M., L. Andrus, and K.J. Lafferty, *Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients*. *Diabetes*, 1980. **29 Suppl 1**: p. 98-104.
34. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, *Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient*. *J Exp Med*, 1982. **156**(6): p. 1835-41.
35. Pietra, B.A., et al., *CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(8): p. 1003-10.
36. Benichou, G., A. Valujskikh, and P.S. Heeger, *Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice*. *J Immunol*, 1999. **162**(1): p. 352-8.
37. Lindahl, K.F. and D.B. Wilson, *Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors*. *J Exp Med*, 1977. **145**(3): p. 508-22.
38. Liu, Z., et al., *Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity*. *J Exp Med*, 1993. **177**(6): p. 1643-50.
39. Saiki, T., et al., *Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes*. *Transplantation*, 2001. **71**(12): p. 1806-15.
40. Braun, M.Y., et al., *Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization*. *Transplantation*, 1993. **55**(1): p. 177-82.
41. Baker, R.J., et al., *Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 7199-206.
42. Bendjelloul, F., T.S. Desin, and A.S. Shoker, *Donor non-specific IFN-gamma production by primed alloreactive cells as a potential screening test to predict the alloimmune response*. *Transpl Immunol*, 2004. **12**(2): p. 167-76.
43. Humar, A., et al., *The association between acute rejection and chronic rejection in kidney transplantation*. *Transplant Proc*, 1999. **31**(1-2): p. 1302-3.
44. Kreisel, D., et al., *Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition*. *Nat Med*, 2002. **8**(3): p. 233-9.
45. Brennan, T.V., et al., *A new T-cell receptor transgenic model of the CD4+ direct pathway: level of priming determines acute versus chronic rejection*. *Transplantation*, 2008. **85**(2): p. 247-55.
46. Lakkis, F.G., et al., *Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue*. *Nat Med*, 2000. **6**(6): p. 686-8.
47. Larsen, C.P., P.J. Morris, and J.M. Austyn, *Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection*. *J Exp Med*, 1990. **171**(1): p. 307-14.
48. Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. *Nature*, 1998. **393**(6684): p. 474-8.
49. Zhou, P., et al., *Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(3): p. 259-66.
50. Sandner, S.E., et al., *New TCR transgenic model for tracking allospecific CD4 T-cell activation and tolerance in vivo*. *Am J Transplant*, 2003. **3**(10): p. 1242-50.
51. Matesic, D., P.V. Lehmann, and P.S. Heeger, *High-resolution characterization of cytokine-producing alloreactivity in naive and allograft-primed mice*. *Transplantation*, 1998. **65**(7): p. 906-14.
52. Ensminger, S.M., et al., *Kinetics of transplant arteriosclerosis in MHC-Class I mismatched and fully allogeneic mouse aortic allografts*. *Transplantation*, 2002. **73**(7): p. 1068-74.
53. Inaba, K., et al., *High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes*. *J Exp Med*, 1997. **186**(5): p. 665-72.
54. Gammon, G., E.E. Sercarz, and G. Benichou, *The dominant self and the cryptic self: shaping the autoreactive T-cell repertoire*. *Immunol Today*, 1991. **12**(6): p. 193-5.
55. Nikolic-Zugic, J. and M.J. Bevan, *Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire*. *Nature*, 1990. **344**(6261): p. 65-7.
56. Chicz, R.M., et al., *Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 27-47.

57. Rudensky, A.Y., et al., *Intracellular assembly and transport of endogenous peptide-MHC class II complexes*. Immunity, 1994. **1**(7): p. 585-94.
58. Gould, D.S. and H. Auchincloss, Jr., *Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection*. Immunol Today, 1999. **20**(2): p. 77-82.
59. Auchincloss, H., Jr., et al., *The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3373-7.
60. Benichou, G., et al., *Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection*. J Exp Med, 1992. **175**(1): p. 305-8.
61. Watschinger, B., et al., *Mechanisms of allo-recognition. Recognition by in vivo-primed T cells of specific major histocompatibility complex polymorphisms presented as peptides by responder antigen-presenting cells*. Transplantation, 1994. **57**(4): p. 572-6.
62. Shirwan, H., et al., *Peptides derived from alpha-helices of allogeneic class I major histocompatibility complex antigens are potent inducers of CD4+ and CD8+ T cell and B cell responses after cardiac allograft rejection*. Transplantation, 1995. **59**(3): p. 401-10.
63. Gallon, L., et al., *The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression*. Transplantation, 1995. **59**(4): p. 612-6.
64. Fangmann, J., et al., *T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection*. Eur J Immunol, 1992. **22**(6): p. 1525-30.
65. Dalchau, R., J. Fangmann, and J.W. Fabre, *Allorecognition of isolated, denatured chains of class I and class II major histocompatibility complex molecules. Evidence for an important role for indirect allorecognition in transplantation*. Eur J Immunol, 1992. **22**(3): p. 669-77.
66. Fangmann, J., R. Dalchau, and J.W. Fabre, *Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides*. J Exp Med, 1992. **175**(6): p. 1521-9.
67. Benham, A.M., G.J. Sawyer, and J.W. Fabre, *Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts*. Transplantation, 1995. **59**(7): p. 1028-32.
68. Sayegh, M.H., et al., *Thymic recognition of class II major histocompatibility complex allopeptides induces donor-specific unresponsiveness to renal allografts*. Transplantation, 1993. **56**(2): p. 461-5.
69. Oluwole, S.F., et al., *Induction of transplantation tolerance to rat cardiac allografts by intrathymic inoculation of allogeneic soluble peptides*. Transplantation, 1993. **56**(6): p. 1523-7.
70. Sawyer, G.J., R. Dalchau, and J.W. Fabre, *Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens*. Transpl Immunol, 1993. **1**(1): p. 77-81.
71. Muluk, S.C., et al., *Correlation of in vitro CD4+ T helper cell function with clinical graft status in immunosuppressed kidney transplant recipients*. Transplantation, 1991. **52**(2): p. 284-91.
72. Najafian, N., et al., *Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 252-9.
73. Vella, J.P., et al., *Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction*. Transplantation, 1997. **64**(6): p. 795-800.
74. Hornick, P.I., et al., *Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2405-10.
75. Ciubotariu, R., et al., *Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts*. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 398-405.
76. Liu, Z., et al., *Mapping of dominant HLA-DR determinants recognized via the indirect pathway*. Transplant Proc, 1997. **29**(1-2): p. 1014-5.
77. Benichou, G., et al., *The presentation of self and allogeneic MHC peptides to T lymphocytes*. Hum Immunol, 1998. **59**(9): p. 540-8.
78. Liu, Z., et al., *Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection*. J Clin Invest, 1996. **98**(5): p. 1150-7.
79. Valujskikh, A., et al., *Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 844-51.
80. Valujskikh, A. and P.S. Heeger, *CD4+ T cells responsive through the indirect pathway can mediate skin graft rejection in the absence of interferon-gamma*. Transplantation, 2000. **69**(5): p. 1016-9.
81. Lee, R.S., et al., *Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 865-72.
82. Steele, D.J., et al., *Two levels of help for B cell alloantibody production*. J Exp Med, 1996. **183**(2): p. 699-703.

83. Jiang, S., O. Herrera, and R.I. Lechler, *New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(5): p. 550-7.
84. Andre, F., et al., *Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2126-36.
85. Thery, C., et al., *Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1156-62.
86. Soares, L.R., et al., *Differential activation of T cells by natural antigen peptide analogues: influence on autoimmune and alloimmune in vivo T cell responses*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4768-75.
87. Fedoseyeva, E.V., et al., *Induction of T cell responses to a self-antigen following allotransplantation*. Transplantation, 1996. **61**(5): p. 679-83.
88. Fedoseyeva, E.V., et al., *De novo autoimmunity to cardiac myosin after heart transplantation and its contribution to the rejection process*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6836-42.
89. Barber, L.D., et al., *Detection of vimentin-specific autoreactive CD8+ T cells in cardiac transplant patients*. Transplantation, 2004. **77**(10): p. 1604-9.
90. Bharat, A., et al., *CD4+25+ regulatory T cells limit Th1-autoimmunity by inducing IL-10 producing T cells following human lung transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(8): p. 1799-808.
91. Haque, M.A., et al., *Evidence for immune responses to a self-antigen in lung transplantation: role of type V collagen-specific T cells in the pathogenesis of lung allograft rejection*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1542-9.
92. Birk, O.S., et al., *The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5159-63.
93. Braun, M.Y., et al., *Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells*. J Immunol, 2001. **166**(8): p. 4879-83.
94. Scott, D.M., et al., *Why do some females reject males? The molecular basis for male-specific graft rejection*. J Mol Med, 1997. **75**(2): p. 103-14.
95. Simpson, E., D. Scott, and P. Chandler, *The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 39-61.
96. Mayer, T.G., A.K. Bhan, and H.J. Winn, *Immunohistochemical analyses of skin graft rejection in mice. Kinetics of lymphocyte infiltration in grafts of limited immunogenetic disparity*. Transplantation, 1988. **46**(6): p. 890-9.
97. Youssef, A.R., et al., *Role of CD4+ and CD8+ T cells in murine skin and heart allograft rejection across different antigenic disparities*. Transpl Immunol, 2004. **13**(4): p. 297-304.
98. Poindexter, N., et al., *Allograft infiltrating cytotoxic T lymphocytes recognize kidney-specific human minor histocompatibility antigens*. Clin Transplant, 1997. **11**(3): p. 174-7.
99. Joosten, S.A., C. van Kooten, and L.C. Paul, *Pathogenesis of chronic allograft rejection*. Transpl Int, 2003. **16**(3): p. 137-45.
100. Kissmeyer-Nielsen, F., et al., *Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells*. Lancet, 1966. **2**(7465): p. 662-5.
101. Montgomery, R.A., et al., *Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients*. Transplantation, 2000. **70**(6): p. 887-95.
102. Feucht, H.E., et al., *Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss*. Kidney Int, 1993. **43**(6): p. 1333-8.
103. Collins, A.B., et al., *Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(10): p. 2208-14.
104. Mauiyyedi, S., et al., *Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 779-87.
105. Terasaki, P.I. and M. Ozawa, *Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial*. Transplantation, 2005. **80**(9): p. 1194-7.
106. Mauiyyedi, S., et al., *Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(3): p. 574-82.
107. Regele, H., et al., *Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(9): p. 2371-80.
108. Taylor, D.O., et al., *Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunohistopathologic pattern of vascular rejection*. J Heart Lung Transplant, 2000. **19**(6): p. 518-21.

109. Sumitran-Holgersson, S., et al., *Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts*. Transplantation, 2002. **74**(2): p. 268-77.
110. Le Bas-Bernardet, S., et al., *Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis*. Am J Transplant, 2003. **3**(2): p. 167-77.
111. Dragun, D., et al., *Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection*. N Engl J Med, 2005. **352**(6): p. 558-69.
112. Jurcevic, S., et al., *Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation*. Transplantation, 2001. **71**(7): p. 886-92.
113. Morgun, A., et al., *Pre- and post-transplant anti-myosin and anti-heat shock protein antibodies and cardiac transplant outcome*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(2): p. 204-9.
114. Joosten, S.A., et al., *Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1301-10.
115. Takemoto, S.K., et al., *National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1033-41.
116. Halloran, P.F., *Sirolimus and cyclosporin for renal transplantation*. Lancet, 2000. **356**(9225): p. 179-80.
117. Denton, M.D., C.C. Magee, and M.H. Sayegh, *Immunosuppressive strategies in transplantation*. Lancet, 1999. **353**(9158): p. 1083-91.
118. Pascual, M., et al., *Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 580-90.
119. Bloom, R.D. and P.P. Reese, *Chronic kidney disease after nonrenal solid-organ transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(12): p. 3031-41.
120. Billingham, R.E., L. Brent, and P.B. Medawar, *Actively acquired tolerance of foreign cells*. Nature, 1953. **172**(4379): p. 603-6.
121. Koshiba, T., et al., *Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection*. Transplantation, 2003. **76**(3): p. 588-96.
122. Lair, D., et al., *Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion*. Am J Transplant, 2007. **7**(3): p. 538-49.
123. Guillonnet, C., et al., *CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 1096-106.
124. Wekerle, T., et al., *Peripheral deletion after bone marrow transplantation with costimulatory blockade has features of both activation-induced cell death and passive cell death*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2311-6.
125. Fehr, T. and M. Sykes, *Tolerance induction in clinical transplantation*. Transpl Immunol, 2004. **13**(2): p. 117-30.
126. Opelz, G., et al., *Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants*. Transplant Proc, 1973. **5**(1): p. 253-9.
127. Quigley, R.L., K.J. Wood, and P.J. Morris, *Transfusion induces blood donor-specific suppressor cells*. J Immunol, 1989. **142**(2): p. 463-70.
128. Salvatierra, O., Jr., et al., *Donor-specific blood transfusions versus cyclosporine--the DST story*. Transplant Proc, 1987. **19**(1 Pt 1): p. 160-6.
129. Bean, M.A., et al., *Suppressed antidonor MLC responses in renal transplant candidates conditioned with donor-specific transfusions that carry the recipient's noninherited maternal HLA haplotype*. Transplantation, 1990. **49**(2): p. 382-6.
130. Hadley, G.A., C.B. Anderson, and T. Mohanakumar, *Selective loss of functional antidonor cytolytic T cell precursors following donor-specific blood transfusions in long-term renal allograft recipients*. Transplantation, 1992. **54**(2): p. 333-7.
131. van Twuyver, E., et al., *Pretransplantation blood transfusion revisited*. N Engl J Med, 1991. **325**(17): p. 1210-3.
132. Lagaaij, E.L., et al., *Effect of one-HLA-DR-antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts*. N Engl J Med, 1989. **321**(11): p. 701-5.
133. van der Mast, B.J. and A.H. Balk, *Effect of HLA-DR-shared blood transfusion on the clinical outcome of heart transplantation*. Transplantation, 1997. **63**(10): p. 1514-9.
134. Persijn, G.G., et al., *Retrospective and prospective studies on the effect of blood transfusions in renal transplantation in The Netherlands*. Transplantation, 1979. **28**(5): p. 396-401.
135. Mincheff, M.S., S.I. Getsov, and H.T. Meryman, *Mechanisms of alloimmunization and immunosuppression by blood transfusions in an inbred rodent model*. Transplantation, 1995. **60**(8): p. 815-21.

136. Puppo, F., et al., *Fas, Fas ligand, and transfusion immunomodulation*. Transfusion, 2001. **41**(3): p. 416-8.
137. Claas, F.H., et al., *Modulation of the alloimmune response by blood transfusions*. Transfus Clin Biol, 2001. **8**(3): p. 315-7.
138. Roelen, D.L., et al., *Regulatory functions of human CD4(+) T cells recognizing allopeptides in the context of self-HLA class II*. Hum Immunol, 2002. **63**(10): p. 902-11.
139. Min, W.P., et al., *Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells in transplant tolerance*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1304-12.
140. Alexander, J.W., et al., *Evaluation of pre- and posttransplant donor-specific transfusion/cyclosporine A in non-HLA identical living donor kidney transplant recipients*. Cooperative Clinical Trials in Transplantation Research Group. Transplantation, 1999. **68**(8): p. 1117-24.
141. Posselt, A.M., et al., *Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation*. Science, 1990. **249**(4974): p. 1293-5.
142. Chowdhury, N.C., et al., *Donor-specific unresponsiveness to murine cardiac allografts induced by intrathymic-soluble alloantigens is dependent on alternate pathway of antigen presentation*. J Surg Res, 1995. **59**(1): p. 91-6.
143. Ohajekwe, O.A., et al., *Transplantation tolerance to rat cardiac and islet allografts by posttransplant intrathymic inoculation of soluble alloantigens*. Transplantation, 1995. **60**(10): p. 1139-43.
144. Binder, J., et al., *Intrathymic injection of donor-specific X-irradiation-sensitive spleen cells abrogates accelerated rejection of cardiac allografts in sensitized rats*. Transplantation, 1994. **58**(1): p. 80-6.
145. Goss, J.A., Y. Nakafusa, and M.W. Flye, *Intrathymic injection of donor alloantigens induces donor-specific vascularized allograft tolerance without immunosuppression*. Ann Surg, 1992. **216**(4): p. 409-14; discussion 414-6.
146. Jones, N.D., et al., *The induction of transplantation tolerance by intrathymic (i.t.) delivery of alloantigen: a critical relationship between i.t. deletion, thymic export of new T cells and the timing of transplantation*. Int Immunol, 1998. **10**(11): p. 1637-46.
147. Takayashiki, T., et al., *Infectious tolerance develops after intrathymic alloantigen-induced acceptance of rat heart allografts can be adoptively transferred*. Surgery, 2005. **138**(2): p. 254-60.
148. Koksoy, S., et al., *Tolerance to rat heart grafts induced by intrathymic immunomodulation is mediated by indirect recognition primed CD4+CD25+ Treg cells*. Transplantation, 2005. **79**(11): p. 1492-7.
149. Remuzzi, G., et al., *Preliminary results of intrathymic injection of donor cells to prevent acute rejection in human heart transplantation*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**(4): p. 1291-4.
150. Sayegh, M.H., et al., *Down-regulation of the immune response to histocompatibility antigens and prevention of sensitization by skin allografts by orally administered alloantigen*. Transplantation, 1992. **53**(1): p. 163-6.
151. Yasufuku, K., et al., *Oral tolerance induction by type V collagen downregulates lung allograft rejection*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(1): p. 26-34.
152. Ildstad, S.T. and D.H. Sachs, *Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts*. Nature, 1984. **307**(5947): p. 168-70.
153. Sykes, M., *Mixed chimerism and transplant tolerance*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 417-24.
154. Manilay, J.O., et al., *Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen*. Transplantation, 1998. **66**(1): p. 96-102.
155. Wekerle, T., et al., *Allogeneic bone marrow transplantation with co-stimulatory blockade induces macrochimerism and tolerance without cytoreductive host treatment*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 464-9.
156. Wekerle, T., et al., *Extrathymic T cell deletion and allogeneic stem cell engraftment induced with costimulatory blockade is followed by central T cell tolerance*. J Exp Med, 1998. **187**(12): p. 2037-44.
157. Adams, A.B., et al., *Costimulation blockade, busulfan, and bone marrow promote titratable macrochimerism, induce transplantation tolerance, and correct genetic hemoglobinopathies with minimal myelosuppression*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1103-11.
158. Myburgh, J.A., et al., *Hepatic allotransplantation in the baboon. 3. The effects of immunosuppression and administration of donor-specific antigen after transplantation*. Transplantation, 1971. **12**(3): p. 202-10.
159. Sayegh, M.H., et al., *Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors*. Ann Intern Med, 1991. **114**(11): p. 954-5.
160. Millan, M.T., et al., *Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation*. Transplantation, 2002. **73**(9): p. 1386-91.
161. Spitzer, T.R., et al., *Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism*. Transplantation, 1999. **68**(4): p. 480-4.

162. Buhler, L.H., et al., *Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease*. Transplantation, 2002. **74**(10): p. 1405-9.
163. Linsley, P.S., et al., *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 721-30.
164. Schwartz, R.H., *Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1065-8.
165. Judge, T.A., et al., *The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival*. J Immunol, 1999. **162**(4): p. 1947-51.
166. Kirk, A.D., et al., *CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8789-94.
167. Larsen, C.P., et al., *Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties*. Am J Transplant, 2005. **5**(3): p. 443-53.
168. Vincenti, F., et al., *Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 770-81.
169. Vanhove, B., et al., *Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody*. Blood, 2003. **102**(2): p. 564-70.
170. Haspot, F., et al., *Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells*. Am J Transplant, 2005. **5**(10): p. 2339-48.
171. van Essen, D., H. Kikutani, and D. Gray, *CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 620-3.
172. Larsen, C.P., et al., *CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway*. Transplantation, 1996. **61**(1): p. 4-9.
173. Zheng, X.X., et al., *CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4983-90.
174. Niimi, M., et al., *The role of the CD40 pathway in alloantigen-induced hyporesponsiveness in vivo*. J Immunol, 1998. **161**(10): p. 5331-7.
175. Markees, T.G., et al., *Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand*. Transplantation, 1997. **64**(2): p. 329-35.
176. Iwakoshi, N.N., et al., *Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 512-21.
177. Parker, D.C., et al., *Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(21): p. 9560-4.
178. Malm, H., et al., *Combined costimulation blockade prevents rejection of allogeneic islets in mice*. Scand J Immunol, 2006. **64**(4): p. 398-403.
179. Larsen, C.P., et al., *Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways*. Nature, 1996. **381**(6581): p. 434-8.
180. Guillonnet, C., et al., *Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8164-71.
181. Kenyon, N.S., et al., *Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8132-7.
182. Kirk, A.D., et al., *Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 686-93.
183. Pierson, R.N., 3rd, et al., *Prolongation of primate cardiac allograft survival by treatment with ANTI-CD40 ligand (CD154) antibody*. Transplantation, 1999. **68**(11): p. 1800-5.
184. Pfeiffer, S., et al., *Monotherapy with anti-CD40 ligand antibody (IDEC 131) for non-human primate allograft heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2001. **20**(2): p. 250.
185. Schuler, W., et al., *Efficacy and safety of ABI793, a novel human anti-human CD154 monoclonal antibody, in cynomolgus monkey renal allotransplantation*. Transplantation, 2004. **77**(5): p. 717-26.
186. Kawai, T., et al., *Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 114.
187. Snanoudj, R., et al., *Costimulation blockade and its possible future use in clinical transplantation*. Transpl Int, 2006. **19**(9): p. 693-704.
188. Ozkaynak, E., et al., *Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 591-6.
189. Guillonnet, C., et al., *Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade*. Transplantation, 2005. **80**(4): p. 546-54.

190. Ozkaynak, E., et al., *Programmed death-1 targeting can promote allograft survival*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6546-53.
191. Strober, S., et al., *Induction of specific unresponsiveness to heart allografts in mongrel dogs treated with total lymphoid irradiation and antithymocyte globulin*. J Immunol, 1984. **132**(2): p. 1013-8.
192. Strober, S., et al., *Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation*. N Engl J Med, 1989. **321**(1): p. 28-33.
193. Strober, S., et al., *Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity*. Transplantation, 2000. **69**(8): p. 1549-54.
194. Knechtle, S.J., et al., *FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts*. Transplantation, 1997. **63**(1): p. 1-6.
195. Torrealba, J.R., et al., *Immunotoxin-treated rhesus monkeys: a model for renal allograft chronic rejection*. Transplantation, 2003. **76**(3): p. 524-30.
196. Thomas, J.M., et al., *Durable donor-specific T and B cell tolerance in rhesus macaques induced with peritransplantation anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin: absence of chronic allograft nephropathy*. Transplantation, 2000. **69**(12): p. 2497-503.
197. Calne, R., et al., *Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients*. Lancet, 1998. **351**(9117): p. 1701-2.
198. Jovanovic, V., et al., *Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model*. Transpl Int, 2008. **21**(3): p. 199-206.
199. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 877-900.
200. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
201. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1213-22.
202. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2002. **195**(6): p. 695-704.
203. Liu, Z., et al., *Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells*. Int Immunol, 1998. **10**(6): p. 775-83.
204. Chang, C.C., et al., *Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 237-43.
205. Zhang, Z.X., et al., *Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 782-9.
206. Lombardi, G., et al., *Anergic T cells as suppressor cells in vitro*. Science, 1994. **264**(5165): p. 1587-9.
207. Bashuda, H., et al., *Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1896-902.
208. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 18-32.
209. Sakaguchi, S., et al., *Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease*. J Exp Med, 1985. **161**(1): p. 72-87.
210. Belkaid, Y., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity*. Nature, 2002. **420**(6915): p. 502-7.
211. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
212. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
213. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
214. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
215. Lehmann, J., et al., *Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13031-6.
216. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.

217. Modigliani, Y., et al., *Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium*. Eur J Immunol, 1996. **26**(8): p. 1807-15.
218. Jordan, M.S., et al., *Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide*. Nat Immunol, 2001. **2**(4): p. 301-6.
219. Yamazaki, S., et al., *Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 235-47.
220. Thornton, A.M. and E.M. Shevach, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 287-96.
221. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, 1998. **10**(12): p. 1969-80.
222. Hall, B.M., et al., *Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 141-57.
223. Cobbold, S.P., et al., *Reprogramming the immune system for peripheral tolerance with CD4 and CD8 monoclonal antibodies*. Immunol Rev, 1992. **129**: p. 165-201.
224. Hara, M., et al., *IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3789-96.
225. Taylor, P.A., R.J. Noelle, and B.R. Blazar, *CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1311-8.
226. Gregori, S., et al., *Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1945-53.
227. Chiffolleau, E., et al., *Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5058-69.
228. Graca, L., S.P. Cobbold, and H. Waldmann, *Identification of regulatory T cells in tolerated allografts*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1641-6.
229. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
230. Stassen, M., et al., *Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(5): p. 1303-11.
231. Qin, S., et al., *"Infectious" transplantation tolerance*. Science, 1993. **259**(5097): p. 974-7.
232. Karim, M., et al., *Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 923-8.
233. Coenen, J.J., et al., *Allogeneic stimulation of naturally occurring CD4+CD25+ T cells induces strong regulatory capacity with increased donor-reactivity*. Transpl Immunol, 2007. **17**(4): p. 237-42.
234. Steger, U., et al., *CD25+CD4+ regulatory T cells develop in mice not only during spontaneous acceptance of liver allografts but also after acute allograft rejection*. Transplantation, 2006. **82**(9): p. 1202-9.
235. Zheng, X.X., et al., *The balance of deletion and regulation in allograft tolerance*. Immunol Rev, 2003. **196**: p. 75-84.
236. Nishimura, E., et al., *Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1189-201.
237. Joffre, O., et al., *Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 88-92.
238. Game, D.S., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1652-61.
239. Salama, A.D. and J.B. Levy, *Tolerance and autoimmunity in anti-GBM disease*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2988-9.
240. Jiang, S., et al., *Generation and expansion of human CD4+ CD25+ regulatory T cells with indirect allospecificity: Potential reagents to promote donor-specific transplantation tolerance*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1738-43.
241. Oluwole, S.F., et al., *The mechanism of the induction of immunologic unresponsiveness to rat cardiac allografts by recipient pretreatment with donor lymphocyte subsets*. Transplantation, 1989. **48**(2): p. 281-8.
242. Fabre, J.W. and P.J. Morris, *The effect of donor strain blood pretreatment on renal allograft rejection in rats*. Transplantation, 1972. **14**(5): p. 608-17.
243. Souillou, J.P., et al., *Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats*. Transplantation, 1984. **38**(1): p. 63-7.

244. Koshiba, T., et al., *Paradoxical early upregulation of intra-graft Th1 cytokines is associated with graft acceptance following donor-specific blood transfusion*. Transpl Int, 2003. **16**(3): p. 179-85.
245. Armstrong, H.E., et al., *Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens*. J Exp Med, 1987. **165**(3): p. 891-907.
246. Gagne, K., et al., *TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation*. Eur J Immunol, 2001. **31**(10): p. 3111-20.
247. Bugeon, L., et al., *Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats*. Transplantation, 1993. **56**(2): p. 405-8.
248. Dallman, M.J., K.J. Wood, and P.J. Morris, *Specific cytotoxic T cells are found in the nonrejected kidneys of blood-transfused rats*. J Exp Med, 1987. **165**(2): p. 566-71.
249. Quigley, R.L., K.J. Wood, and P.J. Morris, *Investigation of the mechanism of active enhancement of renal allograft survival by blood transfusion*. Immunology, 1988. **63**(3): p. 373-81.
250. Josien, R., et al., *Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4539-44.
251. Bugeon, L., et al., *Decreased IFN-gamma and IL-2 mRNA expression in peripheral tolerance to heart allografts with conserved granzyme A, perforin, and MHC antigens mRNA expression*. Transplant Proc, 1993. **25**(1 Pt 1): p. 314-6.
252. Bugeon, L., et al., *Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft*. Transplantation, 1992. **54**(2): p. 219-25.
253. Josien, R., et al., *Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats*. Transplantation, 1995. **60**(10): p. 1131-9.
254. Josien, R., et al., *Recombinant IFN-gamma abrogates allograft tolerance induced by donor-specific blood transfusion by restoring alloantibody production*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 317-26.
255. Josien, R., et al., *A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1920-6.
256. Kitade, H., et al., *Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 4963-70.
257. Lu, L.F., et al., *Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance*. Nature, 2006. **442**(7106): p. 997-1002.
258. Kitade, H., et al., *Early accumulation of interferon-gamma in grafts tolerized by donor-specific blood transfusion: friend or enemy?* Transplantation, 2004. **78**(12): p. 1747-55.
259. Chevalier, S., H. Lacroix, and J.P. Soulillou, *[Blood transfusions associated with an allograft induce cells suppressing the production of IL2 in Lew.1A recipients of Lew.1W hearts]*. Nephrologie, 1987. **8**(3): p. 155-8.
260. Kataoka, M., et al., *Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation*. J Immunol, 2003. **171**(1): p. 204-11.
261. Bushnell, A., et al., *Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect*. Transplantation, 2003. **76**(3): p. 449-55.
262. Douillard, P., et al., *Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts*. J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1250-60.
263. Manavalan, J.S., et al., *Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity*. Int Immunol, 2004. **16**(8): p. 1055-68.
264. Degauque, N., et al., *Development of CD25- regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 147-56.
265. Heslan, J.M., et al., *New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance*. Transplantation, 2006. **82**(9): p. 1185-93.
266. Dobbels, F., et al., *Growing pains: non-adherence with the immunosuppressive regimen in adolescent transplant recipients*. Pediatr Transplant, 2005. **9**(3): p. 381-90.
267. Lakkis, F.G. and M.H. Sayegh, *Memory T cells: a hurdle to immunologic tolerance*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(9): p. 2402-10.
268. Prlic, M., et al., *Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5664-8.
269. Heeger, P.S., et al., *Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2267-75.

270. Adams, A.B., et al., *Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1887-95.
271. Valujskikh, A., B. Pantenburg, and P.S. Heeger, *Primed allospecific T cells prevent the effects of costimulatory blockade on prolonged cardiac allograft survival in mice*. Am J Transplant, 2002. **2**(6): p. 501-9.
272. Kieper, W.C. and S.C. Jameson, *Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13306-11.
273. Tan, J.T., et al., *Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells*. J Exp Med, 2002. **195**(12): p. 1523-32.
274. Ploix, C., D. Lo, and M.J. Carson, *A ligand for the chemokine receptor CCR7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6724-30.
275. Cho, B.K., et al., *Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(4): p. 549-56.
276. Neujahr, D.C., et al., *Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4632-9.
277. Koyama, I., et al., *Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1055-61.
278. Yamada, A., et al., *CD70 signaling is critical for CD28-independent CD8⁺ T cell-mediated alloimmune responses in vivo*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1357-64.
279. Zheng, X.X., et al., *Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 503-14.
280. Knechtle, S.J., et al., *Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study*. Am J Transplant, 2003. **3**(6): p. 722-30.
281. Calne, R., et al., *Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients*. Transplantation, 1999. **68**(10): p. 1613-6.
282. VanBuskirk, A.M., et al., *Human allograft acceptance is associated with immune regulation*. J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 145-55.
283. Devlin, J., et al., *Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation*. Hepatology, 1998. **27**(4): p. 926-33.
284. Takatsuki, M., et al., *Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients*. Transplantation, 2001. **72**(3): p. 449-54.
285. Starzl, T.E., et al., *Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience*. Transplantation, 2004. **77**(6): p. 926-9.
286. Zoller, K.M., et al., *Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey*. Kidney Int, 1980. **18**(1): p. 110-4.
287. Burlingham, W.J., et al., *Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient*. Transplantation, 1995. **59**(8): p. 1147-55.
288. Christensen, L.L., et al., *Indications of immunological tolerance in kidney transplantation*. Tissue Antigens, 1998. **51**(6): p. 637-44.
289. Roussey-Kesler, G., et al., *Clinical operational tolerance after kidney transplantation*. Am J Transplant, 2006. **6**(4): p. 736-46.
290. Brouard, S., et al., *Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation*. Am J Transplant, 2005. **5**(2): p. 330-40.
291. Baeten, D., et al., *Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 294-304.
292. Louis, S., et al., *Contrasting CD25hiCD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance*. Transplantation, 2006. **81**(3): p. 398-407.
293. Brouard, S., et al., *Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15448-53.
294. Braudeau, C., et al., *Variation in numbers of CD4⁺CD25highFOXP3⁺ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome*. Transpl Int, 2007. **20**(10): p. 845-55.
295. Ballet, C., et al., *Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft*. Am J Transplant, 2006. **6**(11): p. 2796-801.
296. Xu, Q., et al., *Human CD4⁺CD25low adaptive T regulatory cells suppress delayed-type hypersensitivity during transplant tolerance*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3983-95.
297. Kawai, T., et al., *HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression*. N Engl J Med, 2008. **358**(4): p. 353-61.

-
298. Trikudanathan, S. and M.H. Sayegh, *The evolution of the immunobiology of co-stimulatory pathways: clinical implications*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(5 Suppl 46): p. S12-21.
299. Mackay, F., P.A. Silveira, and R. Brink, *B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 327-36.
300. Otto, C., et al., *Prolongation of small bowel allograft survival with a sequential therapy consisting of a synthetic MHC class II peptide and temporarily low-dose cyclosporine A*. Hum Immunol, 2002. **63**(10): p. 880-7.
301. Sakaguchi, S., *Immunologic tolerance maintained by regulatory T cells: implications for autoimmunity, tumor immunity and transplantation tolerance*. Vox Sang, 2002. **83 Suppl 1**: p. 151-3.
302. Duplan, V., et al., *Tracking antigen-specific CD8⁺ T cells in the rat using MHC class I multimers*. J Immunol Methods, 2007. **320**(1-2): p. 30-9.
303. van Mirre, E., et al., *Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory FcγRIII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines*. Blood, 2006. **108**(2): p. 584-90.
304. Aiba, Y., et al., *BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses*. Immunity, 2006. **24**(3): p. 259-68.

Annexes

ANNEXE I : Chronic rejection of human kidney allografts

Caroline Ballet¹, Magali Giral¹, Joanna Ashton-Chess¹, Karine Renaudin², Sophie Brouard¹ et Jean-Paul Soulillou¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643 : « Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035, Nantes, Cedex 01, France

²Département d'anatomopathologie, CHU-HOTEL DIEU, 44093 Nantes Cedex 01, France

Revue acceptée dans Expert Review in Clinical Immunology



CONTENTS

Chronic rejection as an uncommon feature of chronic allograft nephropathy

Implication of both allorecognition pathways in cell-mediated chronic rejection

Potentially altered regulatory function in chronic rejection

HLA & non-HLA humoral responses in chronic rejection

A place for autoimmunity in chronic rejection

Further complexity of immune-mediated graft injury

Predicting chronic rejection

Expert commentary

Five-year view

Key issues

References

Affiliations

[†]Author for correspondence
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Chu-hotel dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
jean-paul.souillou@univ-nantes.fr

KEYWORDS:
antibodies, autoimmunity, chronic rejection, kidney, prevention, T lymphocytes, transplantation, treatment

Chronic rejection of human kidney allografts

Caroline Ballet, Magali Giral, Joanna Ashton-Chess, Karine Renaudin, Sophie Brouard and Jean-Paul Souillou[†]

Human chronic rejection is an uncommon feature of chronic allograft nephropathy, the major cause of late graft loss in kidney transplantation. Chronic rejection is a complex process, mediated, at least in part, by immunological mechanisms. T cells with donor, tissue or pathogen specificities that react with donor cells damage the graft tissue in synergy with antibodies. The cellular and humoral components of the immune system may be preformed or appear at both early and late time points following kidney transplantation. Both slowly contribute to the development of vasculopathy, glomerulopathy, tubular atrophy and tissue fibrosis, as observed in chronic rejection biopsies. Characterization of the blood transcriptome of patients prone to develop chronic rejection is an objective that may soon be achieved. However, despite increasing knowledge of the pathogenesis of late allograft failure and advances in the identification of patients at high risk, chronic rejection remains poorly responsive to immunosuppressive treatment, reinforcing the implication of both immune and nonimmune causes. Efforts aimed at diminishing the incidence of risk factors, such as acute rejection episodes, transplantation injury and human leukocyte antigen mismatching, and at controlling inflammation and scar processes, are thus important in chronic rejection prevention and control.

Expert Rev. Clin. Immunol. 2(3), 392–402 (2006)

Chronic rejection as an uncommon feature of chronic allograft nephropathy

During the last decade, the short-term results of kidney transplantation have drastically improved [1]. However, long-term graft survival remains proportionally unchanged, despite some improvement in the rate of decline in allograft function in the new immunosuppressive drug era [2] and the beneficial impact of some of these new compounds acting through nonimmune mechanisms. The main cause of graft loss is chronic allograft nephropathy (CAN) [3], which is present in almost 60% of patients at 10 years [4]. The histological features of CAN are classified with increasing precision according to the Banff criteria, and include interstitial sclerosis, glomerulosclerosis, atherosclerosis and tubular atrophy [5,6]. The direct consequence of CAN is a progressive decline in renal function associated with proteinuria and arterial hypertension [7]. The histological lesions of chronic allograft nephropathy have

several features, sometimes presenting as a single prominent lesion but usually as a mixture of lesions resulting from chronic calcineurin nephrotoxicity, chronic allograft rejection or *de novo* and recurrent glomerulonephritis. Despite the complex link between immunology, inflammation and metabolic disorders, the physiopathology of CAN associates antigen-dependent and independent parameters (TABLE 1). Chronic allograft rejection, which only represents one component of CAN, involves antigen-specific cellular and/or humoral immune mechanisms. According to its histological definition, chronic rejection represents an uncommon feature of CAN that is estimated to be present in 6–27% of biopsies [4,8,9]. Three morphological features are considered to be specific to true chronic rejection (i.e., immune-driven graft injury). The first is chronic allograft glomerulopathy, defined by the duplication of basement membranes in glomerular capillaries (FIGURE 1) [5].

The second is fibrous intimal thickening of arteries with intimal lymphocyte infiltration and disruption of the elastica (FIGURE 1) [5]. The third is the splitting and lamination of the peritubular capillary basement membrane, only detectable by electron microscopy [10]. This review focuses on the immunological mechanisms involved in CAN, particularly those that play a role in the chronic rejection of kidney allografts in humans.

Implication of both allorecognition pathways in cell-mediated chronic rejection

Differences in histocompatibility are known to be a major barrier to long-term allograft survival [11], suggesting that after transplantation, foreign major histocompatibility complex (MHC) molecules are major targets for cell-mediated allo-immune responses. Some evidence from experimental models suggest that the indirect pathway of allorecognition, that is the self-restricted recognition of donor MHC peptides by recipient lymphocytes, is dominant during immune-mediated chronic rejection [12]. The major argument for this hypothesis is that a few weeks after transplantation, donor-derived antigen-presenting cells are rapidly eliminated from the graft and later from the host [13], thereby decreasing the odds for a direct priming of T cells, specifically the recognition of peptides presented in a nonself-restricted manner. Despite the fact that the precursor frequency of T cells stimulated through the indirect

pathway may be 100–1000-fold lower than that of directly primed cells [14], the implication of the indirect pathway of allorecognition during chronic rejection in human kidney transplantation is well documented. In a cohort of 22 long-standing kidney recipients, patients who developed chronic allograft nephropathy displayed higher frequencies *in vitro* of T cells indirectly activated by donor cell lysates than patients with stable graft function [15]. Donor human leukocyte antigen (HLA)-derived peptides have also been used as stimulators to measure the contribution of the indirect pathway in recipients undergoing chronic rejection. Higher frequencies of indirectly activated cells were found in patients at higher risk of developing chronic allograft nephropathy (i.e., with previous episodes of acute rejection) than in patients with stable renal function [16]. HLA epitopes recognized by indirect pathway-activated T cells might vary during the course of the chronic rejection process. Inter- and intramolecular epitopic spreading, which has been observed in the development of chronic heart [17] and kidney rejection [18], may also perpetuate the immune response, resulting in late graft loss. Unfortunately, these studies do not tell us which T-cell subset (CD4⁺, CD8⁺ or both) is concerned with the indirect pathway of allorecognition *in vivo*. It is likely that *in vitro* assays reflect the reactivation, in the presence of graft determinants, of indirectly primed allospecific CD4⁺ T cells circulating in the periphery. However, it is difficult to assess whether CD8⁺ T cells are also reactivated *in vitro* in the presence of donor-derived peptides, and whether they display indirect or direct specificity, since indirectly primed CD4⁺ T cells can provide help to both subsets [19]. For self-MHC-restricted CD8⁺ T cells with indirect specificities to mediate efficient effector function on donor cells, they would require the capacity to cross-react with MHC molecules on donor cells. Some molecular mimicry mechanisms [20], similar to those observed during acute rejection by the direct pathway priming of T cells in secondary lymphoid organs, could be involved in this case [21].

Despite compelling evidence for the involvement of the indirect pathway of allorecognition in chronic rejection, the role of the direct pathway of allorecognition cannot be excluded. First, nondonor-specific lymphocytes with direct specificity that cross-react with the graft could be involved in the chronic rejection process, since kidney recipients with chronic rejection present higher frequencies of cells activated against third party cells than patients with stable renal function [22]. This suggests that effector memory cells primed before grafting may cross-react with donor MHC molecules during the rejection process. Significantly higher numbers of CD8⁺CD28⁻ lymphocytes have been found in kidney recipients with chronic rejection compared with drug-free tolerant patients [23]. These cells, which are probably highly antigen-experienced (i.e., they no longer express CD28), display effector properties and a decreased susceptibility to apoptosis. One of the hypotheses proposed by the authors is that these cells are pre-existing cytotoxic CD8⁺ lymphocytes directed against viruses and pathogens that cross-react with the graft

Table 1. Artificial classification of antigen and nonantigen-dependent factors associated with chronic allograft nephropathy.

Antigen-dependent factors	Antigen-independent factors
Presensitization [40]	Ischemia/reperfusion [85]
Histoincompatibility [11]	Functional overload
Acute rejection episodes [27]	Donor age [86]
Viral infections	Hypertension [87]
Defect in immune regulation [38]	Metabolic disorders
	Drug toxicity
	Gene polymorphism

Presensitization (following transfusions, pregnancies or transplants), number of human leukocyte antigen mismatches, previous episodes of acute rejection and viral infections all increase alloresponsiveness to organ transplant. Antigen-independent factors also influence graft outcome. Ischemia/reperfusion injury is associated with delayed graft function and chronic allograft dysfunction. Functional overload, resulting from transplantation in large recipients, and old donor age also impair allograft outcome. Other factors, such as hypertension, metabolic disorders and drug toxicity, may have deleterious effects on the graft and lead to chronic dysfunction. However, antigen-dependent and independent factors may interact to cause chronic rejection. For example, ischemia/reperfusion injury, which is considered a nonimmunological factor, is also associated with the occurrence of immune-mediated acute rejection episodes. Ischemia/reperfusion injuries trigger inflammatory events leading to the upregulation of major histocompatibility complex expression, and thus increases graft immunogenicity.

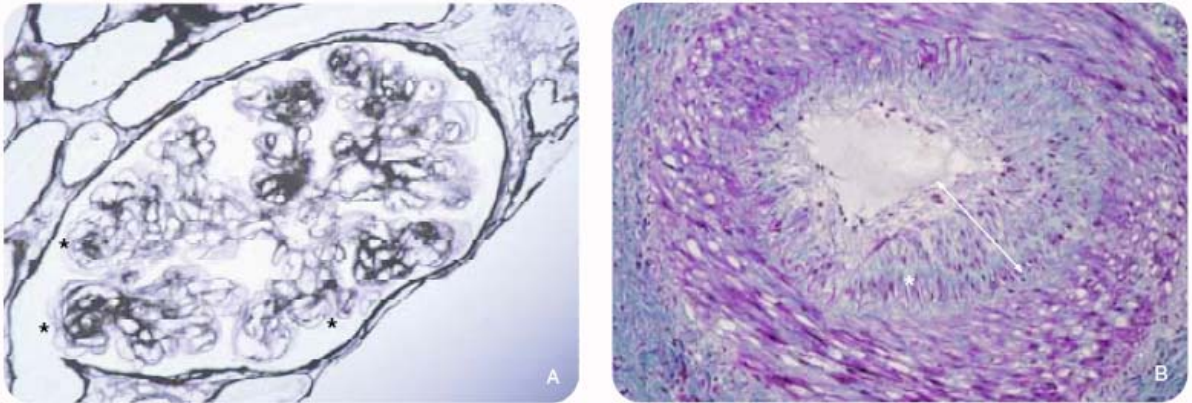


Figure 1. Morphological features considered specific for true chronic rejection in the Banff scheme. (A) Chronic allograft glomerulopathy defined by the duplication of basement membranes in glomerular capillaries (*). (Marinozzi x40). **(B)** Vascular narrowing of luminal area by fibrointimal thickening of artery with lymphocyte infiltration and disruption of the internal elastic lamina (*). (Masson Trichrome x20).

during chronic rejection. In addition to the commitment of nondonor-specific cells with direct specificity, other evidence suggests the implication of directly primed lymphocytes with antidonor specificities. Patients with chronic allograft nephropathy have a higher direct pathway reactivity against donor cells than kidney recipients with stable graft function [24]. Furthermore, in an analysis of a large series of CD4⁺ and CD8⁺ T cells derived from a cadaveric mismatched kidney rejected at 3 months and presenting a mixed pattern of acute and chronic rejection, it was particularly interesting to note that all clones reacted directly (assessed via cytotoxicity or proliferation) against donor MHC-bearing targets [25]. These data favor the possibility of a role for donor-reactive T cells with direct pathway specificity, primed during acute rejection, when passenger leukocytes are still present in the host and reactivated during chronic rejection to mediate a direct-type insult to graft parenchymal and endothelial cells [26]. The fact that patients with previous episodes of acute rejection are at a high risk of developing chronic rejection [27], particularly following episodes of vascular injury [28], supports this idea. T cells primed during acute rejection and reactivated during chronic rejection could lead to biased intra-graft V β usage, which would explain the stronger repertoire alterations observed in patients with chronic rejection who were presenting superimposed histological acute lesions, than those observed in patients with chronic rejection alone [29]. Once again, the studies conducted on the direct response are uninformative concerning the respective role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells, although experimental models show a significant activation of CD8⁺ T cells in the direct pathway [30].

Taken collectively, the data reviewed above reflect the complexity of the cell-mediated alloresponse during chronic rejection, which probably involves both long-lasting memory cells and *de novo*-activated cells with diverse specificities that act in concert to damage the allograft.

Potentially altered regulatory function in chronic rejection

The mechanisms by which a kidney graft maintains long-term function without developing chronic rejection are not clearly defined but appear to be dependent not only on the level of immunosuppression, HLA-matching [31] or preferential cytokine gene patterns [32], but also on regulatory mechanisms. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells expressing the forkhead-winged-helix transcription factor FOXP3 are known to have potent immunomodulatory effects in the periphery and are able to control autoimmune diseases and allogeneic responses in many experimental models [33]. These cells may act through cell-cell contact-dependent mechanisms or via production of cytokines (transforming growth factor [TGF]- β and interleukin [IL]-10) *in vitro* as well as *in vivo* [34]. The repertoire and specificity of regulatory T cells is a matter of debate but seems to be mostly self-oriented [35]. Thymus-generated CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells seem to be selected in the thymus according to their recognition of self-antigens and, despite a high affinity, are not deleted [33]. According to this hypothesis, regulatory cells may suppress alloreactivity in the periphery by cross-reacting with allopeptides presented in a self-restricted manner. However, accumulating data suggest that CD4⁺CD25⁺ regulatory cells might also be generated in the periphery from the pool of CD4⁺CD25⁺ cells, or from that of CD4⁺CD25⁻ cells, and may recognize many different antigens [36]. Several recent studies suggest that a downregulation of regulatory T cells can enhance recognition of donor determinants (and possibly self-determinants), and result in chronic rejection. Salama and colleagues studied a cohort of renal transplant recipients to assess whether the risk of graft loss was associated with a decrease in CD4⁺CD25⁺ T-cell regulation. They found that CD4⁺CD25⁺ T cells in six out of 15 patients (40%) with stable renal function displayed some regulation toward their mismatched HLA DR peptides compared with 12.5% of recipients with at least one episode of acute rejection [33,37]. Recently,

a phenotypic analysis of a cohort of kidney recipients showed that chronic rejection was associated with a significant decrease in the absolute number of peripheral CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells [38]. Despite normal cytotoxic T lymphocyte-associated antigen (CTLA)-4, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor (TNF) receptor (GITR), TGF- β 1 and IL-2 transcript levels, these cells exhibit significantly less FOXP3 transcripts in the CD4⁺ and CD8⁺ subsets. This finding needs to be analyzed in the context of the recent observation of Muthukumar and colleagues, who show that low levels of FOXP3 mRNA in the urine is a predictor of irreversible acute rejection and even human kidney graft failure in humans [39]. Low numbers of T-regulatory cells during acute or chronic rejection may not efficiently balance effector T-cell activity in these patients and thereby contribute to graft failure.

HLA & non-HLA humoral responses in chronic rejection

HLA antibodies

Increasing evidence suggest that antibodies directed against HLA molecules participate actively in graft injury and are significant risk factors for kidney graft survival. Patients presensitized with panel-reactive anti-HLA antibodies following pregnancies, blood transfusions or previous transplantations have an increased rejection rate compared with nonpresensitized patients [40]. Gerhard Opelz's group showed that sensitization against both class I and II molecules resulted in an increased rejection rate of HLA-mismatched grafts in 4000 kidney recipients [41]. In addition, a positive cross-match in patients before transplantation has been strongly associated with the ultimate development of chronic rejection in recipients of a first kidney allograft [42].

The implication of *de novo* HLA-antibody synthesis following transplantation has been acknowledged for nearly 3 decades [28], and antibodies elicited by the transplant itself and directed against B-cell alloantigens have been associated with early graft rejection. Several studies have reported a correlation between *de novo* anti-HLA antibodies and chronic rejection in renal transplantation in the calcineurin inhibitor era [43]. For example, *de novo* HLA antibodies were found in 72% of 39 patients who chronically rejected their grafts but only 46% of 26 patients with functioning grafts [44]. However, the presence of *de novo* antibodies in the serum of patients with renal failure does not indicate whether antibodies are a cause or a consequence of the immunological process leading to chronic rejection. Antidonor HLA antibodies detected before and at 1, 3, 6 and 12 months after kidney transplantation in a cohort of 235 recipients without preformed HLA antibodies revealed that apparition of donor-specific HLA antibodies was predictive of graft loss [45]. In a 2-year follow-up of 1564 kidney transplant patients without preformed antibodies, 16.7% of the 233 patients who secondarily developed anti-HLA antibodies post transplantation presented graft failure, compared with only 6.5% of the 1331 who did not [40]. Cumulatively, these data favor the idea of the presence of anti-HLA antibodies before rejection, thus implicating them in the induction of the chronic rejection process.

Although it has been demonstrated that both donor-specific and nonspecific antibodies are significantly associated with lower graft survival [46], it is likely that nondonor-specific antibodies formed after transplantation are only an indication of responsiveness. Donor-specific antibodies, although probably associated with non-donor-specific antibodies, may not always be detectable [47] because of their adsorption within the graft (anti-HLA antibodies have been shown to be more frequently eluted from kidneys lost through chronic rejection than other causes [48]). Thus, antidonor antibodies, and also the capacity to mount an immune response against a wide array of nondonor antigens, may be predictive factors of late graft failure [43] or graft glomerulopathy [49].

Despite the fact that the direct interaction of antibodies of different specificities has been shown to activate potentially deleterious processes in graft endothelial cells [50], the humoral component in the pathological process leading to chronic rejection has also been linked to complement following the discovery of C4d deposits in the graft (FIGURE 2) [51]. C4d is a split product of the complement component C4, which is a stable indicator of antibody deposition and complement activation. C4d deposits at the interface of the endothelium and the basement membrane of peritubular capillaries have been found in 61% of patients with chronic rejection (i.e., chronic allograft glomerulopathy and/or transplant vasculopathy) and only 2% of controls [9]. Using immunostaining on paraffin sections, C4d deposits along glomerular capillaries have also been associated with allograft glomerulopathy [49]. Glomerular C4d deposits were found in 10 out of 11 biopsies showing transplant glomerulopathy compared with 2 out of 13 controls. Moreover, C4d deposition along peritubular capillaries predicts the development of transplant glomerulopathy [8]. Interestingly, C4d deposits also correlate with the presence of antidonor HLA antibodies [9]; 88% of C4d-positive patients presenting chronic rejection also had antidonor HLA antibodies, compared with none of the C4d-negative patients. Together, these data strongly suggest a link between the humoral response and chronic rejection.

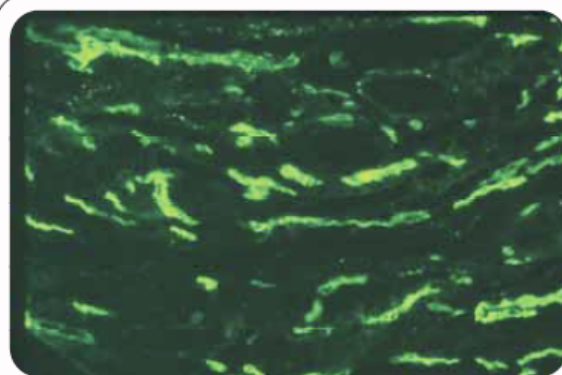


Figure 2. C4d deposition along peritubular capillaries. In association with chronic allograft nephropathy and/or specific changes of chronic rejection (i.e., fibrointimal thickening of arteries and allograft glomerulopathy) C4d deposition suggests the possibility of a chronic antibody-mediated rejection (indirect immunofluorescence for C4d-biogenesis).

Colvin and Smith proposed a sequence of events that summarize the processes leading to chronic rejection [52]. *De novo* antibodies directed against HLA molecules first appear sometimes years after transplantation (stage I). These antibodies probably activate complement in the graft, leading to C4d deposition (stage II). Next, the first symptoms of graft injury occur (stage III), followed by a progressive loss of graft function (stage IV). However, given the rapid graft failure triggered by a positive cross-match or by the early appearance of antidonor antibodies [28], the sequence proposed by the authors implies that antibodies mediating chronic rejection are less toxic or in lower amounts during chronic rejection episodes, or that the graft develops some level of accommodation allowing it to survive several years in the presence of circulating antidonor antibodies [53]. This could explain why Nickleit and colleagues observed that the survival of kidney grafts with C4d-positive staining, which is in theory associated with the presence of antidonor antibodies, does not differ from that of patients without staining [54]. Low concentrations of antidonor HLA antibodies, bound to donor endothelial cells, have been associated with a potentially protective expression of proteins, such as Bcl-2 and Bcl-xL [55]. In addition, anti-idiotypic antibodies, directed against antidonor antibodies from the recipient, may play a role in the regulation of antibody titers. Kidney recipients with antidonor antibodies who developed anti-idiotypic antibodies have a higher graft survival rate than those who did not [56]. Finally, the humoral response is evidence of some cellular helper activation and suggests that both of these immune components have a role in this complex process.

Although anti-HLA antibodies and T cells are probably important factors in the process of chronic kidney rejection, a role for non-HLA graft determinants in activating the recipient's immune system and mediating graft injury cannot be excluded. This idea is supported by recent data from Gerhard Opelz [57]. In a large study of 4048 HLA-identical kidney recipients, who should not have been affected by the presence of panel reactive antibodies (PRA) before grafting, preformed antibodies were still found to correlate with a poor graft outcome after the first post-transplant year. In this cohort of donor-matched kidney recipients, the target for antibodies causing late graft failure could have been minor histocompatibility antigens (non-HLA antigens). Preformed cross-reacting nondonor anti-HLA antibodies or anti-non-HLA antibodies that would appear in patients with high PRA levels could also have been involved. The effect of nonclassical HLA targets on endothelial cells able to elicit a vigorous response in these cells has been reported. MHC class I chain related gene A (MICA), a polymorphic, nonclassical class I molecule that is expressed at the surface of endothelial cells but not lymphocytes, has been suggested to be a target in acute or subacute vascular rejection [58]. Le Bas-Bernardet and colleagues also investigated the presence of anti-endothelial cell antibodies (AECA) in the pretransplant serum of kidney recipients after elimination of anti-ABO and anti-HLA antibodies. They found that 47% of HLA sensitized versus 16% of nonsensitized patients had AECA antibodies [59]. Therefore, the presence of

antibodies against HLA antigens is often associated with the presence of non-HLA antibodies. Whether non-HLA antibodies induced chronic damage in this study is not clear given the relatively short survey. However, a role for these antibodies in late graft failure is suggested by the observation of an increase in the level of creatinine ($p < 0.09$) at 1 year in the group of patients with AECA antibodies compared with patients without antibodies [COUPEL *ET AL.*, UNPUBLISHED].

A place for autoimmunity in chronic rejection

Despite a lack of evidence to enable a cause or effect relationship to be established, attention should be paid to the putative role of autoantibody-mediated graft injury following chronic exposure of tissue-specific host determinants. Key data obtained in mouse recipients of heart allografts revealed that, in the absence of an alloimmune response, chronic rejection could be associated with T-cell activity towards tissue-specific cardiac myosin [60]. Moreover, in patients with chronic transplant glomerulopathy, circulating antibodies for the tissue-specific antigen agrin, a component of the glomerular basement membrane, have been found [61]. Another tissue-specific antigen candidate in kidney transplantation is vimentin, an intermediate filament protein exposed in endothelial cells to the immune system following surgery. Clinical studies of heart allograft rejection suggest an autoimmune cellular component in the chronic rejection process [62]. Using tetramer staining, CD8⁺ T cells specific for vimentin peptides were detected in the blood of two out of six heart transplant patients after *in vitro* stimulation with the peptides. In another study, 48 kidney recipients with biopsy-proven chronic rejection and 115 nontransplanted patients were tested for the presence of antivimentin antibodies following graft failure [63]. The level of vimentin antibodies was significantly higher in the group of patients who rejected their graft than in the group of nongrafted patients.

Further complexity of immune-mediated graft injury

It is believed that, in the early post-transplant period, the vascular endothelium is altered by ischemia/reperfusion injury [64] and possibly by acute rejection episodes, contributing to chronic inflammation of the tissue. A slow process of tissue repair and scar formation could further enhance the late chronic rejection process.

The two main features of chronic rejection are transplant vasculopathy and transplant glomerulopathy associated with renal fibrosis and tubular atrophy. The process that leads to vascular injury may begin with the activation of the immune system during ischemia, with upregulation of interferon (IFN)- γ and subsequent expression of MHC class I and II antigens, thus enhancing endothelium immunogenicity [65]. Cross-linking of anti-HLA class I antibodies then promotes endothelial and smooth muscle cell migration to the intima and their proliferation via the induction of fibroblast growth factor receptors [55], leading to concentric intimal thickening of the vessels, ischemia and fibrosis. Whether allograft glomerulopathy represents alloimmune injury or another type of process, such as autoimmune

injury, for example, due to glomerular basement membrane-specific antibodies [61], remains unresolved. Graft interstitial fibrosis is a less specific process but is also a major feature of chronic rejection. It may result from antigen-dependent chronic inflammation of the tissue via the production of cytokines (TGF- β , platelet-derived growth factor, IL-1 β and TNF- α) by inflammatory cells invading the graft. Activated macrophages that infiltrate the graft during chronic rejection [66] also promote renal fibrosis, possibly via the overexpression of TGF- β [67], which induces extracellular matrix accumulation. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) involving injured epithelial cells also plays a key role in the progression of fibrosis in the kidney [68,69]. Robertson and colleagues have suggested that EMT may be immune mediated [70]. During acute rejection, allospecific CD8⁺CD103⁺ T cells migrate to the renal tubules and mediate cytolysis of epithelial cells. After episodes of rejection and ischemic injury, these cells could remain quiescent and subsequently be reactivated to provide stimuli, possibly linked to a membranous form of TGF- β , for local tubular epithelial cells to undergo a phenotypic transition from epithelial to proliferating mesenchymal cells. Proliferating activated fibroblasts contribute to the interstitial fibrosis observed in chronic rejection lesions.

Predicting chronic rejection

A novel technical approach that is starting to be adopted in the field of transplantation is genome-wide gene expression profiling using microarray technology. Such assays have great potential in transplantation in that they can be used not only to detect an established state of rejection but, more importantly, because they have the potential to be used as prognostic tools to identify grafts with stable function that are heading towards acute or chronic rejection. Given the generally poor response of chronically rejected organs to immunosuppressive treatment, such a predictive assay would be invaluable since it would allow for early medical intervention. To date, few studies in the literature have used microarray technology to specifically address the problem of chronic rejection in human kidney transplant recipients. One study by Donauer and colleagues, comparing biopsies from normal and transplanted kidneys with established chronic rejection and end-stage polycystic kidneys, revealed distinct gene expression profiles associated with each status [71]. The three groups could be distinguished on the basis of 571 differentially expressed genes, most of which encoded proteins involved in cellular metabolism, transport, signaling, transcriptional activation, adhesion and the immune response. Interestingly, this gene-profiling technique revealed two distinct subsets of chronically rejected kidneys that could not be explained by clinical data or histology. In a study aimed at comparing a calcineurin with a calcineurin-free protocol, Flechner and colleagues compared gene expression profiles of kidneys with high Banff scores (2 and 3) with those with low scores (0) [72]. They confirmed significant upregulation of genes responsible for immune/inflammation and fibrosis/tissue remodeling in the higher scoring biopsies. In a more predictive context, Scherer

and colleagues performed a prospective study of biopsies from two groups of renal transplant patients with stable function at 6 months; one maintained stable function and the other developed chronic rejection at 12 months. They identified ten genes differentially expressed between the two groups that could predict the occurrence or nonoccurrence of chronic rejection in 15 out of 17 patients at 12 months as well as the occurrence of chronic rejection at 18 months in patients displaying stable function at 12 months [73].

These studies highlight the value of microarray technology in understanding and predicting chronic rejection. Further studies using larger cohorts, kinetics and analysis of less invasive blood samples are now necessary to decide whether this technology is to become a widely used prognostic or diagnostic tool in this field.

Expert commentary

Recent studies suggest that the involvement of immune factors may be overestimated, given that current immunosuppressive regimens do not tend to significantly modify the long-term outcome of an organ transplantation. Moreover, randomized studies of low versus standard immunosuppressive maintenance regimens in the calcineurin era suggest that the risk-benefit ratio favors low-dose regimens [74].

Nevertheless, recent data suggest that new immunosuppressors, such as Cellcept® [75] and Prograf® [76], have slightly modified the rate of kidney graft loss following transplantation. Matching for HLA still significantly impacts long-term graft outcome, even with the modern immunosuppressive regimen [77]. Therefore, despite active analysis of the parameters governing the fate of a transplant, assessing the respective strength of immune and nonimmune factors is a subject that necessitates further investigation on the long range with histological evaluation.

Part of the answer may lie in the trend suggesting that drugs that are not only active on T cells but also have an activity on graft vessels have generated new hope to decrease the incidence of graft dysfunction and possibly chronic rejection. We therefore consider that further progress will be obtained from the use of antiproliferative and anti-inflammatory agents that may also have an impact on chronic rejection.

New concepts are being developed suggesting that low levels of immunoregulatory cells [38] and decreased expression of transcriptional factors [39] controlling this regulation might precede or characterize chronic rejection. In this respect it is interesting to consider that, although immune monitoring has until now been almost exclusively dedicated to the prevention or diagnosis of acute rejection, another major goal of immunomonitoring may be to predict chronic rejection onset before the graft is injured. The results of several studies support the idea that blood transcriptional patterns may be as efficient as the analysis of a graft to diagnose an acute rejection [78]. This may also be true for chronic rejection [BROUARD *ET AL.*, SUBMITTED]. The authors believe that a major task would be to analyze early transcriptional events in the blood to see whether a signature predicting chronic rejection can be defined as early as 2–3 months following transplantation, using 1-year protocol biopsies as a validation end point.

Post-transplantation monitoring of antidonor or PRAs also offers the possibility of delineating a population of patients at high risk of developing chronic rejection [46,79]. We suggest that available parameters, such as CD4⁺ or CD8⁺ T-cell phenotype or presence of post-transplantation antibody responses [79], should already be taken into account to adapt the treatment, before the modern tools of transcriptome or proteome analyses will allow for a more individual-based management of these patients. In addition, pursuing efforts to avoid nephrotoxic drugs – particularly calcineurin inhibitors – in the long term is crucial. Despite being associated with a rather high initial acute rejection rate, the recent data obtained with CTLA4 immunoglobulin (Ig) show that long-term treatment without calcineurin inhibitors is indeed associated with better graft function [80].

Five-year view

Organ transplantation will progress in the dual context of immune and nonimmune-driven lesions. However, this dichotomy is too simplistic. For example, kidneys from old donors may also influence the immune response [81]. Moreover, new immunosuppressive drugs have pronounced effects on non-immunological targets, such as smooth muscular cell growth, endothelial cell activation or viral replication [82]. The understanding of the exact part that chronic rejection (i.e., immune-driven graft destruction) plays in chronic dysfunction is recent. A more precise appraisal of the extent to which chronic rejection contributes to this process can now be expected.

Major efforts will be made to avoid the use of nephrotoxic calcineurin inhibitors in lifelong immunosuppressive regimens. Indeed, longitudinal studies have emphasized their chronic nephrotoxicity in long-term graft outcome [4]. Attempts to avoid calcineurin inhibitors have met some success with CTLA4Ig [80]; we can now expect that other bioagents will be tested using similar regimens.

However, whether long-term outcome will favor this strategy is unknown. The shift towards immunosuppressive drugs that are less toxic but less potent may lead to

rediscovering the importance of immunity in the long-term outcome of the graft. HLA matching is still recognized as a major parameter influencing long-term outcome in transplantation. The anti-HLA response has also been documented as being strongly associated with chronic rejection, reinforcing the concept that tissue compatibility is a key factor in determining long-term graft survival.

Besides the active research conducted in the field of medical prevention of the various types of kidney dysfunction, we also foresee the possibility of identifying patients at high risk of chronic rejection before graft injury onset. Although several factors have been associated with chronic rejection, the exact nature of the factors that make a recipient strongly prone to develop a chronic rejection is still elusive. To date, efforts to diagnose chronic rejection as early as possible are based on observations of lesions that have already developed in the graft tissue. However, recent analysis of transcriptional patterns associated with acute rejection have shown that blood sample analyses may be as powerful as graft tissue analysis [78]. We have found that this may also be possible for chronic rejection, opening a new area of noninvasive analysis. Another step would be that blood (or even kidney samples from protocol biopsies) may allow for the detection of patients prone to develop chronic rejection before the graft lesions occur, as early as the first month post transplantation, allowing an individual-based treatment. This may allow for early immunosuppression minimization in patients lacking a chronic rejection signature and more intensive treatment in patients identified as prone to developing chronic rejection.

Whether immune tolerance will be achievable in the clinic remains an entirely open question. So far, induction of microchimerism has been successful in some patients [83]. However, this approach is still deemed too risky for routine transplantation and is only theoretically easily applicable in the context of living-related donor transplantation. Bioreagents interacting with specific molecules involved in delivering the cosignals necessary for the development of effector and regulatory cells that may enable tolerance induction experimentally have so far been unsuccessful in humans [84].

Key issues

- Despite continuous improvement in the outcome of organ transplantation, the rate of long-term decline of graft function has been only poorly influenced by immunosuppressive drugs.
- Most of the recent progress on the long-term outcome has been linked to clinical targets (blood pressure, lipidemia and drug cytotoxicity).
- Semiquantitative consensual assessment of graft histology (Banff) has paved the way for a more accurate distinction between immune and nonimmune injury.
- Both humoral (antibodies and complement) and T-cell-mediated lesions contribute to immune injury in chronic rejection.
- The extent to which the direct pathway of recognition of donor major histocompatibility complex determinants specific to the allograft contributes to chronic rejection injury is still elusive.
- Recent data suggest that identification of patients prone to developing chronic rejection may be achieved through the analysis of blood transcriptional signatures.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- 1 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N. Engl. J. Med.* 342(9), 605–612 (2000).
- 2 Kasiske BL, Gaston RS, Gourishankar S *et al.* Long-term deterioration of kidney allograft function. *Am. J. Transplant.* 5(6), 1405–1414 (2005).
- 3 Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 68(1), 1–13 (2005).
- 4 Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 349(24), 2326–2333 (2003).
- The natural history of chronic allograft nephropathy (CAN) in a 120 kidney/pancreas recipient population, with the observation that CAN is present in 60% of the biopsies at 10 years and that immunological mediator-driven active chronic vascular rejection is rare (5.8% of the biopsies).
- 5 Racusen LC, Solez K, Colvin RB *et al.* The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int.* 55(2), 713–723 (1999).
- 6 Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H *et al.* International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int.* 44(2), 411–422 (1993).
- 7 Massy ZA, Gujjarro C, Wiederkehr MR, Ma JZ, Kasiske BL. Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int.* 49(2), 518–524 (1996).
- 8 Regele H, Bohmig GA, Habicht A *et al.* Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(9), 2371–2380 (2002).
- Strong evidence of a humoral contribution to chronic rejection by the observation that C4d deposition in graft peritubular capillaries are significantly associated with two specific features of chronic rejection: transplant glomerulopathy and multilayering of peritubular capillaries.
- 9 Mauviyedi S, Pelle PD, Saidman S *et al.* Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(3), 574–582 (2001).
- 10 Oikawa T, Morozumi K, Koyama K *et al.* Electron microscopic peritubular capillary lesions: a new criterion for chronic rejection. *Clin. Transplant* 13(Suppl. 1), 24–32 (1999).
- 11 Krieger NR, Becker BN, Halsey DM *et al.* Chronic allograft nephropathy uniformly affects recipients of cadaveric, nonidentical living-related, and living-unrelated grafts. *Transplantation* 75(10), 1677–1682 (2003).
- 12 Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front. Biosci.* 4, D476–D480 (1999).
- 13 Roussey-Kesler G, Brouard S, Ballet C *et al.* Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: marginally delayed rejection but strong alteration of graft infiltration. *Transplantation* 80(4), 506–513 (2005).
- 14 Liu Z, Sun YK, Xi YP *et al.* Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* 177(6), 1643–1650 (1993).
- 15 Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J. Immunol.* 167(12), 7199–7206 (2001).
- 16 Najafian N, Salama AD, Fedoseyeva EV, Benichou G, Sayegh MH. Enzyme-linked immunosorbent spot assay analysis of peripheral blood lymphocyte reactivity to donor HLA-DR peptides: potential novel assay for prediction of outcomes for renal transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(1), 252–259 (2002).
- 17 Ciubotariu R, Liu Z, Colovai AI *et al.* Persistent alloepitope reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J. Clin. Invest.* 101(2), 398–405 (1998).
- 18 Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B *et al.* Indirect allorecognition of major histocompatibility complex alloepitopes in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 64(6), 795–800 (1997).
- 19 Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 16(5), 550–557 (2004).
- 20 Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 385–402 (1993).
- 21 Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answers to an old question. *J. Immunol.* 166(2), 973–981 (2001).
- 22 Bendjeloul F, Desin TS, Shoker AS. Donor non-specific IFN- γ production by primed alloreactive cells as a potential screening test to predict the alloimmune response. *Transpl. Immunol.* 12(2), 167–176 (2004).
- 23 Baeten D, Louis S, Braud C *et al.* Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17(1), 294–304 (2005).
- 24 Poggio ED, Clemente M, Riley J *et al.* Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(7), 1952–1960 (2004).
- 25 Bonneville M, Moreau JF, Blokland E *et al.* T lymphocyte cloning from rejected human kidney allograft. Recognition repertoire of alloreactive T cell clones. *J. Immunol.* 141(12), 4187–4195 (1988).
- Clonal analysis of rejected kidney-infiltrating T cells, showing that all isolated clones react against donor human leukocyte antigen (HLA) molecule-bearing targets and that the direct response may be important in chronic rejection.
- 26 Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE *et al.* Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8⁺ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nature Med.* 8(3), 233–239 (2002).
- 27 Humar A, Kerr S, Gillingham KJ, Matas AJ. Features of acute rejection that increase risk for chronic rejection. *Transplantation* 68(8), 1200–1203 (1999).
- 28 Souillou JP, Peyrat MA, Guenel J. Association between treatment-resistant kidney-allograft rejection and post-transplant appearance of antibodies to donor B-lymphocyte alloantigens. *Lancet* 1(8060), 354–356 (1978).
- 29 Gagne K, Brouard S, Giral M *et al.* Highly altered V β repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J. Immunol.* 164(3), 1553–1563 (2000).
- 30 Illigens BM, Yamada A, Fedoseyeva EV *et al.* The relative contribution of direct and indirect antigen recognition pathways to the alloresponse and graft rejection depends upon the nature of the transplant. *Hum. Immunol.* 63(10), 912–925 (2002).

- 31 Opelz G. New immunosuppressants and HLA matching. *Transplant Proc.* 33(1-2), 467-468 (2001).
- 32 Pawlik A, Domanski L, Rozanski J *et al.* The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection. *Transpl. Immunol.* 14(1), 49-52 (2005).
- 33 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6(4), 345-352 (2005).
- 34 von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunol.* 6(4), 338-344 (2005).
- 35 Hsieh CS, Rudensky AY. The role of TCR specificity in naturally arising CD25⁺CD4⁺ regulatory T cell biology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293, 25-42 (2005).
- 36 Taams L, Vukmanovic-Stejic M, Salmon M, Akbar A. Immune regulation by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: implications for transplantation tolerance. *Transpl. Immunol.* 11(3-4), 277-285 (2003).
- 37 Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(6), 1643-1651 (2003).
- 38 Louis S, Braudeau C, Giral M *et al.* Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 81(3), 398-407 (2006).
- First demonstration that chronic rejection of kidney allografts is associated with a deficit of CD25^{hi} CD4⁺ T cells and FOXP3 transcripts in the periphery, suggesting consequences of alterations in regulatory mechanisms in the development of chronic rejection.
- 39 Muthukumar T, Dadhania D, Ding R *et al.* Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N. Engl. J. Med.* 353(22), 2342-2351 (2005).
- First evidence that regulatory T cells are activated during episodes of acute rejection to temper effector cell-mediated graft destruction, by the demonstration that high FOXP3 mRNA levels in the urine identify subjects with reversible acute rejection.
- 40 Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 80(9), 1194-1197 (2005).
- Demonstration that HLA antibodies can be considered as predictors of graft failure since kidney recipients with HLA antibodies present a higher failure rate than those without antibodies in a 2-year follow-up period.
- 41 Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 73(8), 1269-1273 (2002).
- 42 El Fettouh HA, Cook DJ, Bishay E *et al.* Association between a positive flow cytometry crossmatch and the development of chronic rejection in primary renal transplantation. *Urology* 56(3), 369-372 (2000).
- 43 Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am. J. Transplant.* 3(6), 665-673 (2003).
- 44 Mizutani K, Terasaki P, Rosen A *et al.* Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am. J. Transplant.* 5(9), 2265-2272 (2005).
- 45 Worthington JE, Martin S, Al-Husseini DM, Dyer PA, Johnson RW. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. *Transplantation* 75(7), 1034-1040 (2003).
- 46 Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI *et al.* Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(9), 2804-2812 (2005).
- 47 Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK *et al.* All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* 74(8), 1192-1194 (2002).
- 48 Souillou JP, de Mouzon-Cambon A, Dubois C, Blanc M, Peyrat MA, Mahieu P. Immunological studies of eluates of 83 rejected kidneys: screening of antibodies directed against T and B lymphocytes, glomerular and tubular basement membranes, DNA, and IgG. *Transplantation* 32(5), 368-374 (1981).
- 49 Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC *et al.* Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int.* 65(6), 2409-2418 (2004).
- 50 Le Bas-Bernardet S, Coupel S, Chauveau A, Souillou JP, Charreau B. Vascular endothelial cells evade apoptosis triggered by human leukocyte antigen-DR ligation mediated by allopecific antibodies. *Transplantation* 78(12), 1729-1739 (2004).
- 51 Feucht HE. Complement C4d in graft capillaries - the missing link in the recognition of humoral alloreactivity. *Am. J. Transplant.* 3(6), 646-652 (2003).
- 52 Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Rev. Immunol.* 5(10), 807-817 (2005).
- 53 Salama AD, Delikouras A, Pusey CD *et al.* Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am. J. Transplant.* 1(3), 260-269 (2001).
- 54 Nicleleit V, Zeiler M, Gudat E, Thiel G, Mihatsch MJ. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(1), 242-251 (2002).
- 55 Jin YP, Jindra PT, Gong KW, Lepin EJ, Reed EF. Anti-HLA class I antibodies activate endothelial cells and promote chronic rejection. *Transplantation* 79(Suppl. 3), S19-S21 (2005).
- 56 Reed E, Ho E, Cohen DJ *et al.* Anti-idiotypic antibodies specific for HLA in heart and kidney allograft recipients. *Immunol. Res.* 12(1), 1-11 (1993).
- 57 Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 365(9470), 1570-1576 (2005).
- 58 Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 74(2), 268-277 (2002).
- 59 Le Bas-Bernardet S, Hourmant M, Coupel S, Bignon JD, Souillou JP, Charreau B. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant.* 3(2), 167-177 (2003).
- 60 Rolls HK, Kishimoto K, Dong VM *et al.* T-cell response to cardiac myosin persists in the absence of an alloimmune response in recipients with chronic cardiac allograft rejection. *Transplantation* 74(7), 1053-1057 (2002).
- 61 Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V *et al.* Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am. J. Transplant.* 5(2), 383-393 (2005).
- 62 Barber LD, Whitelegg A, Madrigal JA, Banner NR, Rose ML. Detection of vimentin-specific autoreactive CD8⁺ T cells in cardiac transplant patients. *Transplantation* 77(10), 1604-1609 (2004).
- 63 Carter V, Shenton BK, Jaques B *et al.* Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc.* 37(2), 654-657 (2005).

- 64 Lu CY. Ischemia, injury, and renal allograft rejection. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 5(2), 107–110 (1996).
- 65 Hidalgo LG, Halloran PF. Role of IFN- γ in allograft rejection. *Crit. Rev. Immunol.* 22(4), 317–349 (2002).
- 66 Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 64(2), 190–197 (1997).
- 67 Shihab FS, Yamamoto T, Nast CC *et al.* Transforming growth factor- β and matrix protein expression in acute and chronic rejection of human renal allografts. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6(2), 286–294 (1995).
- 68 Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(1), 1–12 (2004).
- 69 Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: the role of tubular cells in fibrogenesis. *Am. J. Transplant.* 5(6), 1367–1374 (2005).
- 70 Robertson, H, Ali S, McDonnell BJ, Burt AD, Kirby JA. Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(2), 390–397 (2004).
- 71 Donauer J, Rumberger B, Klein M *et al.* Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 76(3), 539–547 (2003).
- 72 Flechner SM, Kurian SM, Solez K *et al.* *De novo* kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am. J. Transplant.* 4(11), 1776–1785 (2004).
- 73 Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 75(8), 1323–1330 (2003).
- Identification of chronic rejection prognosis biomarkers by microarrays at a post-transplantation period when clinical and histological parameters are still normal.
- 74 Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D *et al.* Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351(9103), 623–628 (1998).
- 75 Weir MR, Ward MT, Blahut SA *et al.* Long-term impact of discontinued or reduced calcineurin inhibitor in patients with chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 59(4), 1567–1573 (2001).
- 76 Gjertson DW, Cecka JM, Terasaki PI. The relative effects of FK506 and cyclosporine on short- and long-term kidney graft survival. *Transplantation* 60(12), 1384–1388 (1995).
- 77 Opelz G. Strength of HLA-A, HLA-B, and HLA-DR mismatches in relation to short- and long-term kidney graft survival. Collaborative Transplant Study. *Transpl. Int.* 5(Suppl. 1), S621–S624 (1992).
- 78 Flechner SM, Kurian SM, Head SR *et al.* Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am. J. Transplant.* 4(9), 1475–1489 (2004).
- 79 Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am. J. Transplant.* 4(3), 438–443 (2004).
- 80 Vincenti F, Larsen C, Durrbach A *et al.* Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 353(8), 770–781 (2005).
- 81 Flechner SM, Modlin CS, Serrano DP *et al.* Determinants of chronic renal allograft rejection in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 62(9), 1235–1241 (1996).
- 82 Giral M, Nguyen JM, Daguin P *et al.* Mycophenolate mofetil does not modify the incidence of cytomegalovirus (CMV) disease after kidney transplantation but prevents CMV-induced chronic graft dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(8), 1758–1763 (2001).
- 83 Trivedi HL, Shah VR, Vanikar AV *et al.* High-dose peripheral blood stem cell infusion: a strategy to induce donor-specific hyporesponsiveness to allografts in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr. Transplant* 6(1), 63–68 (2002).
- 84 Knechtle SJ, Hamawy MM, Hu H, Fechner JH Jr, Cho CS. Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol. Rev.* 183, 205–213 (2001).
- 85 Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation* 66(12), 1697–1701 (1998).
- 86 Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM, Takemoto S, Cho YW. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clin. Transplant* 11(5 Pt 1), 366–372 (1997).
- 87 Opelz G, Wujciak T, Ritz E. Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study. *Kidney Int.* 53(1), 217–222 (1998).

Affiliations

- Caroline Ballet
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
caroline.ballet@univ-nantes.fr
- Magali Giral
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
magali.giral@chu-nantes.fr
- Joanna Ashton-Chess
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
joanna.ashton-chess@univ-nantes.fr
- Karine Renaudin
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
karine.renaudin@chu-nantes.fr
- Sophie Brouard
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
sophie.brouard@univ-nantes.fr
- Jean-Paul Souillou
Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Chu-hotel dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093, Nantes, Cedex 01, France
Tel.: +33 240 087 410
Fax: +33 240 087 411
jean-paul.souillou@univ-nantes.fr

ANNEXE II : Revisiting tolerance by donor cell priming

Caroline Ballet, Sophie Brouard et Jean-Paul Soulillou

Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643 :
« Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et
de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035,
Nantes, Cedex 01, France

Revue accepté dans Current Opinion in Organ Transplantation

Revisiting tolerance induction by donor cell priming

Caroline Ballet^{a,b}, Sophie Brouard^{a,b} and Jean-Paul Soulillou^{a,b}

Purpose of review

Donor-specific transfusion is one of the most potent approaches to induce tolerance to vascularized organs and has been extensively studied in the rat. Following donor-specific transfusion, immune activation and suppressive mechanisms involving T cells, dendritic cells and immunosuppressive cytokines have been described in tolerant recipients.

Recent Findings

Recent data on the donor-specific transfusion effect have led to the development of new concepts concerning this tolerance induction phenomenon, particularly concerning the role of the transplant itself and the coexistence of regulatory T cells able to transfer tolerance and chronic rejection lesions in the long-term surviving grafts.

Summary

Reviewing these mechanisms would help in the quest to improve strategies to achieve tolerance in the clinic.

Keywords

donor-specific transfusion, organ transplantation, tolerance

Introduction

Achieving long-term, drug-free graft acceptance in the absence of chronic rejection remains a major, yet inaccessible, goal in clinical allotransplantation. One of the most studied approaches leading to transplantation tolerance is donor-specific transfusion (DST). There have been many recent advances in understanding this phenomenon as well as its limitations. Reviewing recent observations made in the DST model may lead to a better understanding of tolerance inducing strategies in humans. In this review we will discuss the potential mechanisms by which donor transfusion promotes long-term graft survival as well as the paradox concerning the coexistence of tolerance and chronic rejection lesions in the long-term surviving grafts following DST.

A well functioning graft despite persistence of antigrraft immunity

Although tolerance to allogeneic tissue is 'immunologically' defined by the absence of a detectable immunological response to a functional graft in the absence of immunosuppression [1], tolerance induced by DST treatment should only be defined 'functionally' as the maintenance of good graft function, as 'tolerated' grafts are known to be abundantly infiltrated by leucocytes [2–4]. Nevertheless, the anti-donor immune response in tolerant recipients differs at multiple points from that observed in acutely rejected grafts, implying that regulatory events modify the host immunological system and thus participate in graft protection.

The immune response in the early post-transplant period

Considerable attention has been paid to the description of the immunological events that occur in the 'tolerated' graft, notably regarding the presence or absence of immunocompetent cells. In a rat model of major histocompatibility complex (MHC)-incompatible LEW.1W (RT1u) to LEW.1A (RT1a) heart transplantation [5], recipients pretreated with donor blood transfusions 14 and 7 days before transplantation tolerate their grafts (survival >100 days). The heart allografts of DST-treated recipients are infiltrated by roughly equivalent numbers of leucocytes at days 5 and 7 after transplantation as those from untreated animals, and are even more infiltrated at day 3 after transplantation than their rejected counterparts, probably a result of the priming procedure [6]. Tolerated grafts also express donor MHC class I more rapidly and express the same amount of class II as rejected grafts. Similar observations have been made in the RA (RT1p)

Curr Opin Organ Transplant 12:335–339. © 2007 Lippincott Williams & Wilkins.

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale and

^bImmunointervention in allo- and xenotransplantations and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITER), Nantes, France

Correspondence to Caroline Ballet, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale—Université de Nantes, Unité 643, Nantes, France

Tel: +33 240 087 410; fax: +33 240 087 411;

e-mail: Jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

Current Opinion in Organ Transplantation 2007, 12:335–339

Abbreviations

DST donor-specific transfusion
GIC graft infiltrating cell
MHC major histocompatibility complex

© 2007 Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

to PVG (RT1c) heart transplantation model [7], in which recipients tolerate their grafts after a single DST administered 12 days prior to transplantation, despite an infiltrate from days 2 to 9 after transplantation comparable to that observed in rejected hearts. In a model of kidney transplantation from DA (RT1a) to PVG (RT1c) rats, preoperative blood transfusions (day 7) also induced an accelerated cellular infiltration, and an upregulation of class I and II donor MHC antigens [8]. Whereas there is a predominant inhibition of most cytokines following DST (see below), upregulation of mRNA for the T-cell-oriented-chemokine RANTES in tolerated allografts 5 days after allotransplantation [9] may contribute to the magnitude of the infiltrate in these animals. The fact that in the initial days following transplantation, tolerated heart grafts display granzyme A and perforin mRNA accumulation [10] and that high levels of graft infiltrating cells (GICs) [4], spleen cells [8] and also cells from lymph nodes [11] mediate cytotoxic activity against donor antigens *in vitro* suggests that CD8⁺ T cells functions are largely unimpaired. In addition, other *in-vitro* analyses have revealed that the anti-donor proliferative properties of T cells harvested from blood [7,12], lymph nodes [13] or even spleen cells [11] are preserved, suggesting the persistence of CD4⁺ T cells (as CD4⁺ T cells are responsible for the proliferative response observed *in vitro* [13]). The fact that the expression of CD95L (FasL) and TNF α is downregulated in DST-treated allografts (and is thus accompanied by a decrease in the apoptosis of GICs) offers an explanation for the increase of GICs in tolerant animals [14]. Altogether, in the first week following transplantation, the strong infiltrate observed in tolerated grafts together with the presence of cells with cytotoxic or proliferative properties when reactivated *in vitro* (depending on the organ or the models analysed), strongly suggest that deletion of alloreactive cells is not the mechanism by which allografts are protected from acute rejection.

Nevertheless, analysis of tolerated grafts has also revealed a down-modulation of T-cell function [2,6,7] and monocyte/macrophage functions [9]. First, the level of IFN- γ mRNA peaks at day 6 [2] or day 9 [7] to a lesser extent and later than in rejected grafts (peak at day 4 or 5). IL-2 mRNA also accumulates, but with lower levels and delayed kinetics than rejected grafts [2,7]. The lack of these Th1 cytokines may play a central role in tolerance induction, since the injection of rIFN- γ or rIL-2 abrogates tolerance induction [2]. In a transgenic model of skin transplantation in mice [15], despite their expansion in the lymph nodes of DST-treated recipients, CD4⁺ T cells were unresponsive to recall antigen *in vitro* and produced lower levels of IL-2 and IFN- γ than mice having received a skin graft alone. Inhibition of Th2 cytokines in this tolerance model may also play a pivotal role, as IL-4 [6], IL-10 [6,7] and IL-13 [6] cytokine

mRNA levels in tolerated grafts are downregulated in the early days following transplantation. IL-10 and inducible nitric oxide synthase mRNA levels, markers of monocyte and macrophage activation, are also strongly decreased [9]. The global decrease in Th1 and Th2 cytokines observed in DST-treated animals was found to correlate with a defect in the anti-class I IgG response, despite the persistence of a low anti-class II IgG response [16]. This decrease may be the consequence of the Th1 defect and may also contribute to the state of tolerance, a theory supported by the observation that passive transfer of serum from untreated animals can restore the ability of tolerant animals to reject their grafts and that administration of rIFN- γ to tolerant animals restores their ability to produce antidonor antibody [17]. Analysis of the *in-vitro* proliferation of cells from DST-treated animals against donor cells in the initial days following transplantation revealed different patterns depending on the model studied and the compartments analyzed. For instance, in the LEW.1W to LEW.1A model, spleen cells recovered from DST-treated animals 5 days after transplantation did not proliferate against donor cells, contrasting with the strong proliferation of cells from rejecting animals. In the rat model of DST-induced tolerance developed by Kitade *et al.* [18], hyporesponsiveness to donor cells was also observed at day 14.

Taken together, the decrease in Th1 and Th2 cytokine production in the graft, the defect in the humoral response and the inability of cells from certain compartments to proliferate *in vitro* in the tolerant animals suggest that a control of the alloresponse by regulatory mechanisms is likely in DST-treated animals.

Regulatory mechanisms in the early post-transplant period

Among the cytokines whose production has been studied in the DST model, two in particular, TGF β [19] and IL-4 [19], both known for their immunoregulatory properties, have been found to be substantially upregulated in tolerated grafts from two different models at day 1 [19] and day 7 [20] post transplantation, respectively, thus suggesting the presence of regulatory mechanisms.

TGF β involvement in the suppression of Th-cell proliferation in the spleen 5 days after transplantation was demonstrated by the restoration of a strong proliferative response against donor cells *in vitro* in the presence of TGF β in combination with IL-2 [19]. More importantly, *in vivo*, neutralization of TGF β after transplantation in DST-treated animals abrogates tolerance induction, whereas its overexpression prolongs allograft survival in unmodified grafts [19]. Whether the upregulation of this cytokine is the result of T regulatory cell production or directly induced regulatory cells is not clear. The expansion of CD8⁺ T cell clones, however, bearing a

V β 18–D β 1–J β 2.7 rearrangement found in the GICs of tolerant animals as soon as day 1 after transplantation [21] (like TGF β production), was not observed in rejecting animals and may be related to TGF β . This clone may play a role in tolerance induction as DST-treated animals vaccinated against the V β 18–D β 1–J β 2.7 clone reject their allograft, a process that partially relies on an increase in TNF α and IL-10 production. This process is probably responsible for the recovery of IgG alloantibody production [22] and the restoration of spleen cell proliferation against donor cells. Recently, a link between the presence of regulatory T cells and the production of TGF β has been established by a (CD117⁺)-TGF β -producing mast cell subset. These data were obtained from a skin model of tolerance induced in mice by DST associated with costimulation blockade (anti-CD154) [23^{*}]. Grafts from mice rendered tolerant exhibited a substantial mast cell infiltrate (which was absent in rejected grafts) and mast cell-deficient mice were unable to accept their grafts long-term. Concomitantly, the study showed that upon activation, regulatory T cells can produce high levels of IL-9, a cytokine necessary for the development and function of mast cells. Whether this observation holds true in DST-induced tolerance in a vascularized transplant model is unknown. It is tempting, however, to speculate on an infiltration by mast cells and production of TGF β in the graft site following IL-9 production by activated regulatory T cells.

The increased production of the immunomodulatory cytokine IL-4 in a model of heart transplant tolerance in the rat induced by DST (day 12 before transplantation) also suggests regulatory mechanisms [20]. The fact that alloantigen-specific T regulatory cells operate in this model was also established by the capacity of splenocytes or lymph node cells from tolerant rats on day 5 after transplantation and GICs or thymocytes from tolerant animals on day 14, to adoptively transfer tolerance to naïve recipients [18]. Transfer was also more effective when splenocytes were taken at day 14 and later, suggesting that regulatory cells expanded following transplantation. In the regulatory activity this model is restricted to the CD4⁺ CD45RC⁺ memory subset [18].

Interestingly another cytokine, IFN- γ , for which a peak in mRNA production in the first days following transplantation is known to correlate with rejection in multiple organ transplantation models [3,20], was paradoxically found to reach higher levels in tolerated grafts than in rejected grafts in the very first few days (day 2 [20] or day 3 [2]) after transplantation. This cytokine was also elevated in lymph nodes [20]. Moreover, this early accumulation was shown to correlate with the protective effect of DST, as higher IFN- γ production was associated with more prolonged graft survival. Although this observation may reflect the memory response following the repeated

exposure to alloantigen, one can also argue in favour of a regulatory role for IFN- γ accumulation in tolerated grafts, which would be consistent with the observation that cells with regulatory properties produce IFN- γ [24].

Although it is clear that regulatory cells exist in tolerated grafts following DST treatment, the localization of their progenitors and the way in which they arise is a matter of debate. It is likely that donor dendritic cells participate early in this process, as interstitial donor dendritic cell-depleted grafts are acutely rejected upon transplantation into DST-treated recipients, and injection of donor dendritic cells at the time of dendritic cell-depleted heart transplantation restores tolerance [13]. The extent to which their tolerogenic effect could rely on the presence of DST-elicited anti-donor class II antibodies at the surface of dendritic cells is unknown [16]. It is possible that the regulatory induction occurs in the spleen following rapid dendritic cell migration from the graft [8], as no hyporesponsiveness is observed in the lymph nodes in this model [13]. This suggestion cannot be generalized, however, to models in which cells from lymph nodes are able to transfer tolerance [18].

Donor-specific transfusion, sensitization and tolerization

A strong alteration of the immune response has been observed in the graft as well as in many other compartments of DST-treated organ recipients. Whether DST is involved in this biased response to the graft and to what extent the graft itself contributes to tolerance induction are intriguing questions.

Accumulating data suggest that DST alone (without transplantation), which represents the first encounter of the donor antigen by the host, is not sufficient to induce the protective regulatory mechanisms that lead to graft survival and more likely results in anti-donor sensitization. This hypothesis, initially suggested in a study by Chevalier *et al.* [25], is supported by the fact that the adoptive transfer of cells from animals receiving a single DST but not organ transplantation does not lead to graft acceptance in the rat [26] or mouse [27]. This idea is also suggested by the normal proliferative response of spleen cells observed in animals pretreated with two DSTs alone (without organ transplantation) compared with the hyporesponsiveness of splenocytes from DST-treated organ transplant recipients [13]. In these models, a sensitizing effect of donor priming through intravenous injection is supported by the persistence of the cytotoxic activity of cells from lymph nodes or splenocytes harvested from DST-treated animals without transplantation [11,26] and by the presence of IFN- γ in the first few days following transplantation in tolerated grafts and lymph nodes, which accumulates too rapidly to be the result of graft priming only [12].

Nevertheless, although often insufficient to enable subsequent transfer of long-term allograft survival, some data suggest that suppressive activity is generated by DST alone [28]. Suppressive cells are also able to mediate their suppressive activity *in vitro* [28]. Moreover, in our model, a potential regulatory V β 18–D β 1–J β 2.7 clone appears in the blood following DST as early as day 7 after the first transfusion [21].

A unifying mechanism that would reconcile these two contrasting observations would be that, depending on the model, the antigen encounter by the intravenous pathway is sufficient to activate the threshold of suppressor cells capable of counterbalancing the antigen priming that occurs in parallel. In experiments conducted in a mouse model of DST [27], contrary to multiple DST, a single blood transfusion was unable to induce regulatory cells able to mediate the tolerance of a skin graft, suggesting a role for antigen persistence in generating the suppressive activity. Thus, it is tempting to speculate that in some cases, notably when the suppressive effect is observed in the spleen [13], the donor transfusions are sufficient to elicit a suppressive response probably driven by the indirect presentation of donor antigen (the regulatory clone V β 18–D β 1–J β 2.7 is not expanded in primary direct mixed lymphocyte reactions [21]). The suppressive activity engendered might not, however, be sufficient to transfer tolerance unless a boost is provided by the graft itself. Indirectly primed regulatory T cells generated by the DST could enhance the suppressive activities engaged once the organ has been put in place, maybe by transferring a tolerogenic effect to donor or recipient antigen presenting cells [29] for subsequent enhancement of the suppressive effect. In other cases, notably when the suppressive effect of DST takes place in the lymph nodes [28], no additional synergy with the graft is necessary, probably because suppressive cells with direct specificity induced by transfusions are rapidly mobilized in the graft.

Another explanation of the DST effect, which does not exclude regulatory mechanisms following antigen priming, comes from a recent publication by the group of Wang *et al.* [30^{*}]. In their mouse model, they demonstrated the capacity of donor apoptotic cells to induce tolerance to subsequent heart transplants when combined with anti-CD40 ligand treatment. Apoptotic cells in this model were unable to provide activating signals to splenic dendritic cells, preventing their maturation and conferring tolerogenic properties on them. In other DST protocols, a pool of apoptotic donor cells transfused may participate, when in the spleen, to blocking dendritic cell maturation and thereby contribute to tolerance induction.

Tolerance maintenance and chronic rejection

Recently, key data have emerged addressing the issue of maintenance of long-term graft survival following DST.

Indeed, at day 100 after transplantation, although graft function is maintained, chronic rejection develops, notably in heart transplantation models, with patches of mononuclear infiltrates within the myocardium, fibrosis, inflammatory intimal proliferation and fibrous intimal thickening [31,32]. Understanding the mechanisms by which these two states (long-term survival and chronic rejection) co-exist would be of great use for the improvement of chronic transplant rejection treatment in the clinic.

Experiments of adoptive transfer performed in our laboratory and others suggest that regulatory mechanisms persist late after tolerance induction. First, splenic T cells [33] transfer tolerance to naïve hosts [33]. Second, splenic anergic CD25[−] T cells that accumulate FoxP3 transcripts [34^{*}] and exhibit new suppressive activities *in vitro* by a mechanism that requires both cell contact and the soluble factors IL-10 and IFN- γ are important for the transfer of tolerance. In the model described by Pirenne *et al.* [32], CD4⁺ CD45RC[−] cells with regulatory properties that were present in the early days following transplantation (see above) also persisted later and displayed enhanced efficacy at day 30 post transplantation [7]. Although their presence at the graft site could not be proven by cell transfer experiments [33], it is clear that suppressive cells are maintained late after transplantation, which enables long-term graft survival, probably by controlling the deleterious effect against the transplant mediated by aggressive T cells, presenting high levels of perforin, granzyme and IFN- γ mRNA and for which there is evidence of circulation in the blood [33].

In this context, one possibility for the development of chronic rejection would be that the equilibrium between suppressive and active mechanisms is altered due to recent thymic emigrant production, as thymectomy partially abolishes the tolerogenic potential of the donor transfusions [7].

Nevertheless, chronic lesions observed in DST-induced tolerance are similar to those observed in chronic humoral rejection, thus, rather than looking for a cellular explanation to the chronic rejection process, Pirenne and colleagues [32] have proposed a humoral response. They noted a Th2 deviation with IL-4 and IL-10 overexpression at day 30, which correlated with the emergence of B cells in tolerated grafts, endothelial deposition of IgG and complement binding [7]. They suggested that the Th2-induced humoral response could be the result of suppressive activities induced by DST and suggested defining chronic rejection as a byproduct of tolerance induction [32].

Conclusion

In conclusion, DST, by itself or in conjunction with transplantation, is a potent inducer of regulatory

mechanisms, through the cooperation of various actors such as regulatory T and non-T cells, donor and recipient dendritic cells and cytokines with complex functions. Nevertheless, it appears that this strategy may be limited in its potential clinical application by its inability to protect the transplanted organ from chronic rejection, and may even induce it. Clinical DST strategies, however, that differ in the administration of adapted immunosuppression, may still be of interest.

Acknowledgements

We thank Joanna Ashton-Chess for editing this manuscript.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

Additional references related to this topic can also be found in the Current World Literature section in this issue (p. 432).

- 1 Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* 1999; 79:99–141.
- 2 Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, *et al.* Peripheral tolerance of an allograft in adult rats: characterized by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 1992; 54:219–225.
- 3 Bugeon L, Cuturi MC, Paineau J, *et al.* Decreased IFN-gamma and IL-2 mRNA expression in peripheral tolerance to heart allografts with conserved granzyme A, perforin, and MHC antigens mRNA expression. *Transplant Proc* 1993; 25 (1 Pt 1):314–316.
- 4 Dallman MJ, Wood KJ, Morris PJ. Specific cytotoxic T cells are found in the nonrejected kidneys of blood-transfused rats. *J Exp Med* 1987; 165:566–571.
- 5 Souillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; 38: 63–67.
- 6 Josien R, Pannetier C, Douillard P, *et al.* Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation* 1995; 60:1131–1139.
- 7 Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, *et al.* Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003; 76:588–596.
- 8 Armstrong HE, Bolton EM, McMillan I, *et al.* Prolonged survival of actively enhanced rat renal allografts despite accelerated cellular infiltration and rapid induction of both class I and class II MHC antigens. *J Exp Med* 1987; 165:891–907.
- 9 Gagne K, Brouard S, Guillet M, *et al.* TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokine down-regulation. *Eur J Immunol* 2001; 31:3111–3120.
- 10 Bugeon L, Cuturi MC, Paineau J, *et al.* Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats. *Transplantation* 1993; 56:405–408.
- 11 Quigley RL, Wood KJ, Morris PJ. Investigation of the mechanism of active enhancement of renal allograft survival by blood transfusion. *Immunology* 1988; 63:373–381.
- 12 Koshiba T, Giulietti A, Van Damme B, *et al.* Paradoxical early upregulation of intragraft Th1 cytokines is associated with graft acceptance following donor-specific blood transfusion. *Transpl Int* 2003; 16:179–185.
- 13 Josien R, Heslan M, Brouard S, *et al.* Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998; 92:4539–4544.
- 14 Josien R, Muschen M, Gilbert E, *et al.* Fas ligand, tumor necrosis factor-alpha expression, and apoptosis during allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 1998; 66:887–893.
- 15 Quezada SA, Fuller B, Jarvinen LZ, *et al.* Mechanisms of donor-specific transfusion tolerance: preemptive induction of clonal T-cell exhaustion via indirect presentation. *Blood* 2003; 102:1920–1926.
- 16 Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D, *et al.* Decreased antidonor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994; 24:1627–1631.
- 17 Josien R, Cuturi MC, Douillard P, *et al.* Recombinant IFN-gamma abrogates allograft tolerance induced by donor-specific blood transfusion by restoring alloantibody production. *Eur J Immunol* 1999; 29:317–326.
- 18 Kitade H, Kawai M, Rutgeerts O, *et al.* Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2005; 175:4963–4970.
- 19 Josien R, Douillard P, Guillot C, *et al.* A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 1998; 102:1920–1926.
- 20 Kitade H, Kawai M, Koshiba T, *et al.* Early accumulation of interferon-gamma in grafts tolerized by donor-specific blood transfusion: friend or enemy? *Transplantation* 2004; 78:1747–1755.
- 21 Douillard P, Pannetier C, Josien R, *et al.* Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157:1250–1260.
- 22 Vignes C, Chiffolleau E, Douillard P, *et al.* Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2000; 165:96–101.
- 23 Lu LF, Lind EF, Gondek DC, *et al.* Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 2006; 442:997–1002.
This presents the first evidence of a link between regulatory T cells and mast cells suppressive activity.
- 24 Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, *et al.* IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005; 201:1925–1935.
- 25 Chevalier S, Lacroix H, Moreau JF, Souillou JP. Blood transfusion plus allograft—but not blood transfusion alone—induce IL-2-producing suppressor cells in LEW-1A recipients of LEW-1W heart allograft. *Transplantation proceedings* 1987; 19 (1 Pt 1):544–546.
- 26 Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 2003; 171:204–211.
- 27 Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003; 76:449–455.
- 28 Quigley RL, Wood KJ, Morris PJ. Transfusion induces blood donor-specific suppressor cells. *J Immunol* 1989; 142:463–470.
- 29 Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, *et al.* Alloantigen specific CD8+CD28⁻ FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 2004; 16:1055–1068.
- 30 Wang Z, Larregina AT, Shufesky WJ, *et al.* Use of the inhibitory effect of apoptotic cells on dendritic cells for graft survival via T-cell deletion and regulatory T cells. *Am J Transplant* 2006; 6:1297–1311.
The authors demonstrate that a pool of apoptotic cells can be responsible for the tolerance generation.
- 31 Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, *et al.* New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82:1185–1193.
- 32 Pirenne J, Kitade H, Kawai M, *et al.* Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 2005; 79 (3 Suppl):S25–S27.
- 33 Lair D, Degauque N, Miqueu P, *et al.* Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am J Transplant* 2007; 7:538–549.
- 34 Degauque N, Lair D, Braudeau C, *et al.* Development of CD25⁻ regulatory T cells following heart transplantation: evidence for transfer of long-term survival. *Eur J Immunol* 2007; 37:147–156.
This is the first evidence that CD25⁻ with regulatory properties from long-term survival recipients can transfer tolerance.

ANNEXE III : Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: Marginally delayed rejection but strong alteration of graft infiltration

Gwénaëlle Roussey-Kesler¹, Sophie Brouard¹, Caroline Ballet¹, Frédérique Moizant¹, Anne Moreau², Marina Guillet¹, Helga Smit¹, Claire Usal¹, et Jean-Paul Soulillou¹

¹Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (I.N.S.E.R.M), Unité 643 : « Immunointervention dans les allo et xénotransplantations » et Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T), CHU Hôtel Dieu, 30 bd Jean Monnet, 44035, Nantes, Cedex 01, France

²Département d'anatomopathologie, CHU-HOTEL DIEU, 44093 Nantes Cedex 01, France

Article accepté dans transplantation

Exhaustive Depletion of Graft Resident Dendritic Cells: Marginally Delayed Rejection but Strong Alteration of Graft Infiltration

Gwenaëlle Roussey-Kesler,¹ Sophie Brouard,¹ Caroline Ballet,¹ Frederique Moizant,¹ Anne Moreau,² Marina Guillet,¹ Helga Smit,¹ Claire Usal,¹ and Jean-Paul Soulillou^{1,3}

Background. Donor dendritic cells (DDC) are believed to sustain direct recognition leading to acute allograft rejection. However, DDC are also required for tolerance induction in various models.

Methods. We studied the effect of DDC depletion on major histocompatibility complex (MHC) mismatched rat heart allografts in a strain combination characterized by a DDC-dependant tolerance induction. Grafts were depleted of DDC either by pretreating donors with cyclophosphamide (CyP) or by being parked in an intermediate recipient treated with cyclosporine A (CsA).

Results. CyP depleted 95% of resident DC and no specific donor MHC class II staining was observed in parked grafts. Parked grafts survived significantly but only moderately longer than untreated grafts (10.8 ± 1.9 days vs. 6.5 ± 0.5 days; $P < 0.05$). Compared to unmodified grafts, on day 5 after transplantation, the magnitude of the graft infiltrate was dramatically decreased in DDC-depleted grafts, with IgG deposition within the grafts at the time of rejection. In parallel, the cytokine transcript levels were also lower in these grafts on day 5, but reached levels similar to those of unmodified grafts by day 7, indicating a delayed pattern of rejection.

Conclusions. Taken collectively, these data suggest that DDC depletion has a greater effect on the capacity of tolerance induction than the rejection process.

Keywords: Leukocytes passenger, Direct, Rat, Allograft.

(*Transplantation* 2005;80: 506–513)

The T cell immune response to an allograft requires two types of antigen recognition: the indirect and direct pathways. The indirect pathway of allopeptide presentation, where allogeneic proteins are processed and presented by self antigen presenting cells (APC) to the recipient T cells (1, 2), is restricted by the recipient's major histocompatibility complex (MHC) (3, 4). In the direct pathway, crossreactive naïve and memory T cells interact with donor class II and class I molecules on graft APC (5, 6). Whereas both contribute to acute rejection, chronic rejection is mostly controlled by the indirect pathway (7–13). Despite several convincing lines of evidence that the indirect pathway can trigger the subacute or acute rejection of a vascularized allograft, particularly in pre-

immunized recipients (14, 15), the direct pathway is almost certainly instrumental in early acute allograft rejection in unmodified recipients (16, 17). Experimental transplantations performed using class I or class II knockout (KO) donors have shown a moderately delayed rejection time, partly supporting this concept (15, 16, 18). However, in the latter model, the indirect pathway is also affected (lack of donor MHC-derived peptides) and the role of resident dendritic cells (DC) or other MHC-positive graft cells in the rejection process cannot be discriminated.

Because professional APC mobilize naïve T cells to differentiate into effector cells, bone marrow-derived dendritic cells resident within a transplanted organ (formerly referred to as "passenger leukocytes") (19, 20) are considered to sustain the direct pathway of recognition which drives acute rejection. The role of these cells in acute rejection is suggested by the effect of their depletion before transplantation in rodent models. In the rat, for example, tolerance can be achieved by kidney graft parking prior to transplantation, which depleted the graft in donor dendritic cells (21, 22) and can be reversed by donor dendritic cell infusion into the recipient (5,6). Prolongation of cardiac allograft survival has also been observed in rats after DDC depletion (23, 24) or in mice when donors lacking Flt3 ligand were used (25). However, these effects, which appear to suggest a "universal"

This work was supported in part by a R.O.T.R.F grant (#559688078).

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 643, "Immunointervention dans les Allo et xenotransplantations" and Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France.

² Department of Anatomopathology, Nantes, France.

³ Address correspondence to: Jean-Paul Soulillou, M.D., INSERM U643, Chu-Hotel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. E-mail: jps@nantes.inserm.fr.

Received 14 January 2005. Revision requested 9 February 2005.

Accepted 15 March 2005.

Copyright © 2005 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/05/8004-506

DOI: 10.1097/01.tp.0000168367.39204.07

mechanism of early acute graft rejection, are restricted to only certain strains (23, 26), indicating that the actual role of donor APC in acute rejection should be interpreted with caution. Moreover, recent studies from our laboratory (27, 28) and from others groups (29, 30) have shown that graft resident APC are required for tolerance induction in several models. This was the case in rat liver transplantation (29, 30), in cardiac transplantation (31) following donor-specific transfusion (DST) (27), and in kidney transplantation after injection of antidonor MHC class II antibodies on the day of transplantation (28). Because the resident dendritic cells were needed for tolerance induction in the MHC mismatch combination, we analyzed the role of these cells on the occurrence of acute rejection in the same strain combination. In addition, the effect of DDC depletion had never been studied in detail at the level of the graft infiltrate.

In this paper, we show that exhaustive donor APC depletion results in a significant but borderline graft survival prolongation (+ 4 days). However, graft APC depletion is associated with major quantitative and qualitative changes in graft infiltration by T cells as well as in inflammatory cytokine transcript accumulation during the early posttransplant period. The roles of donor APC in acute rejection and the mechanisms of acute rejection of grafts lacking resident dendritic cells are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Surgical Procedure

Inbred adult 8-12 week-old male rats from the LEW.1W (RT.1^u) and LEW.1A (RT.1^a) congenic strains were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were maintained under standard conditions according to European and Institutional Guidelines. LEW.1W rats were used as heart donors and LEW.1A rats as recipients. Heterotopic cardiac transplantation was performed as previously described by Ono and Lindsey (32). Graft function was evaluated daily by abdominal palpation. Heart grafts and spleens were harvested on day 5 or 7 posttransplantation or during rejection.

Experimental Groups

The first group consisted of LEW.1A recipients grafted with LEW.1W hearts without treatment. In the second group, LEW.1A recipients were grafted with hearts from LEW.1W donors treated with cyclophosphamide (300 mg/kg, ip) 5 days prior to transplantation (n = 10). The third group consisted of LEW.1A recipients grafted with LEW.1W hearts parked for 20 to 40 days in LEW.1A intermediate recipients treated with daily cyclosporine A (CsA, 10 mg/kg per os) (n = 16). A control group consisted of LEW.1A recipients grafted with hearts from LEW.1W donors treated with CsA for 10 to 21 days (n = 7).

Immunohistology

Spleen and heart tissue samples were collected from untreated LEW.1W rats, from cyclophosphamide-treated LEW.1W rats 5 days after the CyP injection, and from intermediate recipients in which LEW.1W hearts were parked for 20 to 40 days. Grafts were also collected from the recipients 5 days after the transplantation (whether they were previously

depleted of DDC or not) and during rejection (on day 7 for CyP-depleted grafts and on day 13 for parked grafts). For immunohistochemical analyses, samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound; Bayer Diagnostics, Puteau, France), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C. Five-micrometer cryostat sections were cut, air-dried and fixed in acetone for 10 min at room temperature. All sections were then labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique using either the monoclonal Abs OX1+OX30 (anti-CD45, all leukocytes), OX6 (anti-MHC class II) or OX3 (specific for the MHC class II RT1^u antigen). Graft sections were also studied using R7.3 (recognizing the β -chain of the TCR $\alpha\beta$, specific for T cells), OX33 (recognizing the CD45 isoform only present on B cells), OX8 (anti-CD8), ED2 (specific for macrophages), and 3.2.3 (specific for NK cells). Nonspecific staining was checked by omission of the first antibody.

The area of each section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis. Sections were examined at a magnification of 400 $\times$. Positively stained cells were counted using point counting analysis, with a 121 intersection squared grid in the eyepiece of the microscope. The percentage of the area of each section occupied by cells labeled by a particular antibody was calculated as follows: (number of positive cells under grid intersection) / 121 = (the total number of grid intersections) $\times$ 100.

Fifteen fields were counted for each labeled section. The results were expressed as the percentage of the area of the tissue section infiltrated by leukocytes (determined by OX1-OX30 labeling) or the subpopulations of the infiltrating cells as percentages of the leukocyte population, as previously described (33).

For histological studies, the 4- μ m thick sections obtained from paraffin embedded hearts were colored with HPS (hematoxylin phloxin safran).

Intragraft Antidonor-Specific Antibody Deposition

The presence of antidonor-specific IgM and IgG isotypes within the heart grafts of LEW.1A rats was evaluated on day 5 following transplantation and at rejection for DDC-depleted grafts. Deposition of the various rat Ig isotypes was studied by immunochemistry. Ungrafted hearts were used as controls. Heart grafts harvested on day 5 posttransplantation were sectioned, snap frozen, embedded in Tissue Tek (OCT compound; Bayer Diagnostics, Puteaux, France), cut into 5- μ m sections, and fixed in acetone for 10 min at room temperature. Sections were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with mouse anti-rat IgM-FITC (MARM-4) or IgG-FITC (MARG1) (University of Louvain, Brussel, Belgium) monoclonal antibodies for 45 min. Sections were then rinsed 3 times with PBS, conserved at 4°C, and examined in the following hours with a fluorescent microscope.

RNA Extraction, cDNA Synthesis, TCR Repertoire Analysis, and Cytokine Transcript Quantification

Total RNA was extracted with Trizol solution (Gibco, Life Technology, South America) according to the manufacturer's instructions. RNA (2 μ g) was reverse transcribed us-

ing a cDNA synthesis kit (Roche, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 75 μ L, as previously described (33).

cDNA was amplified by PCR using a C β primer and one of the 21 V β -specific primers, as previously described (34). Each amplification product was used for an elongation reaction using a dye-labeled C β primer, then heat-denatured, loaded onto a 6% acrylamide-8 M urea gel, and electrophoresed for 5 hours using an Applied Biosystems 373A DNA sequencer (PerkinElmer). Immunoscope software provides distribution profiles of CDR3 lengths of the amplified and elongated products (35). For each sample, the CDR3 length profile was compared with those obtained in naive rats. TcLandscape top views were then obtained: the x-axis displays the 21 V β families, the y-axis gives the 13 possible CDR3 lengths of a Gaussian pattern and the color indicates the percentage of alterations.

cDNA was amplified with primers specific for C β , IL2, IL6, IL10, IFN γ , TGF β and HPRT, as previously described in details (28). To normalize the levels of the target sequences, the number of copies of each cytokine was related to the quantity of HPRT transcripts obtained for the same sample.

Statistical Analysis

Allograft survival times were compared using the Kaplan-Meier test. Mann Whitney tests were performed to compare the number of RNA copies and the percentage of CDR3 length distribution alteration. The magnitude and composition of the graft infiltrates were compared using the Student test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Donor Pretreatment or Parking of Heart Grafts Before Transplantation Differentially Depletes Resident Class II Positive Cells

Because heart dendritic cells live for a few days (36), donor pretreatment with cyclophosphamide inhibits bone-marrow dendritic cell production and depletes hearts of such cells. Administration of cyclophosphamide (300 mg/kg ip) 5 days prior to collection of LEW.1W hearts depleted 94.4% of class-II⁺ cells and 95.7% of CD45⁺ cells (Fig. 1). Because this depletion might not be functionally sufficient, we also utilized LEW.1W hearts "parked" in intermediate LEW.1A recipients treated with Cyclosporin A. An immunohistological study performed on day 19 following the parking procedure showed CD45 (OX1-OX30) and MHC class II molecules (OX6) expression only on infiltrating recipient cells. No staining of donor MHC RT1^u class II (OX3) molecules was detected (Fig. 1). Interestingly, however, this procedure significantly increased the number of recipient newly "resident" dendritic cells in the graft compared to the number of donor type dendritic cells in a "naive heart" before grafting. A histological evaluation of grafts parked in an intermediate recipient treated with CsA showed a subnormal myocardium, with no vascular lesions and only mild infiltration of the myocardium and fibrosis (Fig. 2A). Because parking seemed to be the most efficient procedure for depleting DDC, parked grafts were used in most of the subsequent experiments.

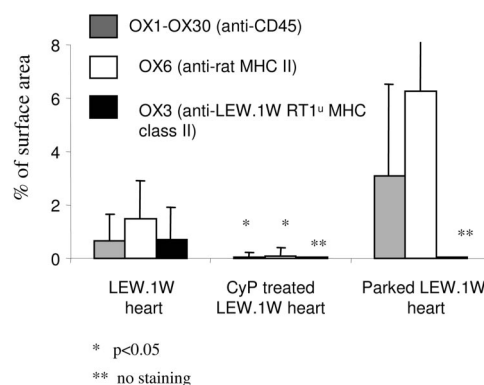


FIGURE 1. Heart dendritic cell depletion after the cyclophosphamide injection or parking procedure. Immunohistological studies using OX1 + OX30 (anti-CD45), OX6 (anti-class II MHC) and OX3 (anti-RT1^u specific, LEW.1W MHC class II) mAbs were performed on normal LEW.1W hearts, Cyclophosphamide-treated LEW.1W hearts (5 days after injection) and LEW.1W hearts parked in LEW.1A intermediate recipients. CyP treatment depletes class II⁺ and CD45⁺ cells (dendritic cells) by 95%. Increased CD45 and OX6 staining was observed in parked grafts, due to an intermediate recipient immune cell infiltrate. No specific staining of donor MHC class II molecules (OX3) was detected in parked grafts or in cyclophosphamide-treated LEW.1W hearts, confirming the donor dendritic cell depletion.

Exhaustive DDC Depletion of LEW.1W Hearts is Associated with a Significant but Borderline Prolongation of Graft Survival

Heart graft survival in unmodified LEW.1W rats was 6.5 ± 0.5 days. When DDC were depleted with cyclophosphamide before transplantation, graft survival was not significantly increased (7.3 ± 0.5 days) compared to the control group. Because DDC depletion was exhaustive following parking in an intermediate host, parked LEW.1W grafts were then used. Grafts parked for more than 20 days in an intermediate immunosuppressed LEW.1A host exhibited a moderate but significant survival prolongation (10.8 ± 1.9 days) compared to that of unmodified grafts ($P < 0.05$) (Fig. 3), confirming that graft survival was only (slightly) affected after highly efficient depletion of donor class II⁺ cells. However, because a possible carryover of cyclosporine A remaining within the parked graft could contribute to this borderline effect, control grafts were performed where hearts from LEW.1W donors were treated in a similar way to the intermediate LEW.1A recipients during parking. However, following 10 to 21 days of CsA treatment, graft survival was 7.7 ± 3.3 days (22–24 ng/ml of residual circulating cyclosporinemia 24 hr following retransplantation), a nonsignificant difference compared to the survival of parked grafts and unmodified grafts. Taken together, these data do not confirm that the borderline graft prolongation was due to CsA carryover.

Donor Dendritic Cell Depletion Strongly Decreases Graft Cellular Infiltration by Day 5 Posttransplantation, but No Longer by Day 7

Histological studies were performed on day 5 for unmodified grafts and on day 5 as well as at time of rejection

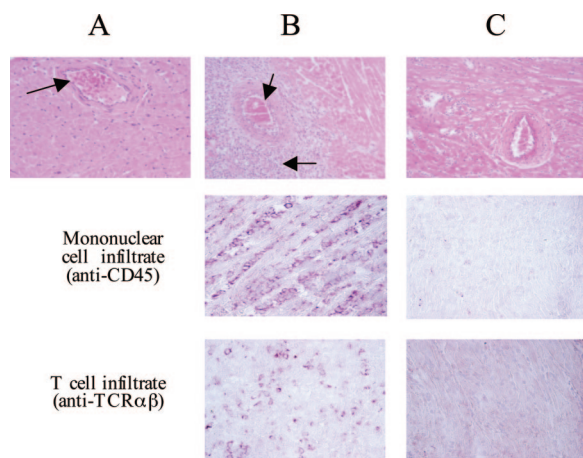


FIGURE 2. Graft histological analysis on day 5. (A) LEW.1W heart parked in an intermediate recipient treated with CsA. No fibrosis and mononuclear cell infiltration were observed. The endothelium was intact with no signs of vasculitis. (B) An untreated graft 5 days following transplantation. The histological examination showed a large mononuclear cell infiltrate with myocardial fiber necrosis. Vasculitis was observed, with inflammatory endarteritis and vascular narrowing. Anti-CD45 staining confirmed an abundant mononuclear cell infiltrate with a large proportion of T cells (anti-TCR $\alpha\beta$ staining). (C) A parked graft 5 days following transplantation. A mild infiltrate was observed, mainly composed of macrophages. Myocardial fiber structure was conserved and no vasculitis was observed. An immunohistological examination revealed a low-grade infiltration, with little or no TCR $\alpha\beta$ staining.

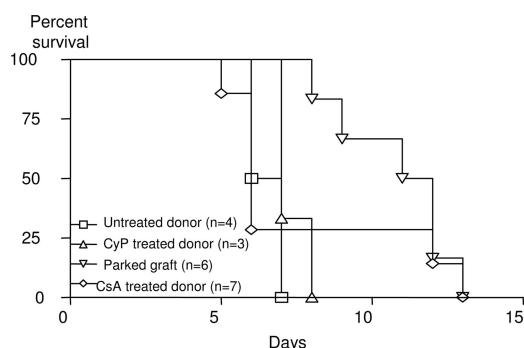


FIGURE 3. Graft survival. Untreated donor ($\square$) and CyP treated donor ($\triangle$) graft survival was 6.5 ± 0.5 and 7.3 ± 0.5 days respectively, a nonsignificant difference. Parked graft (∇) survival was moderately but significantly prolonged (10.8 ± 1.9 days, $P < 0.05$) compared to that of untreated grafts. No significant prolongation was also observed following treatment of LEW.1W donors with CsA ($\diamond$), suggesting that a CsA carryover could not account for the prolonged survival of parked grafts.

when modified donors were used. Grafts from untreated donors showed widespread mononuclear cell infiltrate, associated in one case with focal necrosis of myocardial fibers and mild inflammatory endarteritis (Fig. 2B). In contrast, previously parked graft showed no signs of vascular rejection on day 5, only a mild mononuclear cell infiltrate and no myocar-

dial fiber necrosis (Fig. 2C). The cell infiltrate was then quantified in graft sections of normal hearts or following DDC depletion (Fig. 2B and 2C). The mononuclear infiltrate in grafts from untreated donors represented $25.9 \pm 11.7\%$ of the surface area, whereas it was only $5.9 \pm 7\%$ (78% less) in grafts from cyclophosphamide pretreated donors ($P < 0.05$), and only $1.7 \pm 2\%$ (96% less) in grafts parked in an intermediate recipient ($P < 0.05$). Moreover, the infiltrate not only changed in magnitude but also in composition. The infiltrate in normal donor grafts was composed of 37% macrophages, 52% T cells, 12% CD8+ cells, 1.6% B cells and 8% NK cells. In contrast, grafts from cyclophosphamide-treated donors were mainly infiltrated by macrophages; with only 31% T cells and 4% B cells. Parked grafts were also mainly infiltrated by macrophages, with only 10% T cells and no B or NK cells. Of note, no donor class II expression were observed in DDC-depleted grafts on day 5, in contrast to unmodified grafts.

As these day 5 differences could lead only to different kinetics of immune lesion apparition within the grafts, an immunohistochemical analysis was performed at rejection (on day 7 for CyP-pretreated grafts and on day 13 for parked grafts). At this time, the magnitude and composition of the graft infiltrate had roughly reached that observed in grafts from unmodified donors at day 5, indicating a delay in the rejection process kinetics in DDC-depleted hearts. The graft infiltrate represented 31% and 29% of the surface area of the CyP-treated and parked grafts respectively, with 53% and 43% T cells for CyP-pretreated and parked grafts, respectively.

A delayed kinetics in TCR C β transcript accumulation (quantitative PCR) was also observed on days 5 and 7 following transplantation in the grafts depleted of passenger leukocytes. The C β /HPRT ratios were significantly decreased on day 5 in grafts from cyclophosphamide-injected donors and in parked grafts, as compared to untreated donors (0.2 ± 0.14 , 0.3 ± 0.5 and 1.5 ± 0.5 respectively, $P < 0.05$). In parallel to the infiltration scores, the C β /HPRT ratios also increased on day 7 (1.09 ± 0.37 in grafts from cyclophosphamide-pretreated donors, 0.8 ± 0.66 in parked grafts on day 7, compared to 1.5 ± 0.5 in grafts from unmodified donors on day 5, $P > 0.05$) (Fig. 4).

In DDC-Depleted Grafts, Cytokines Transcription Decreases by Day 5, but Reaches Unmodified Graft Values by Day 7

Intragraft Th1 and Th2 cytokines transcript levels (IL2, IL6, IL10, IFN γ , and TGF β) were quantified on day 5 and 7 following transplantation. On day 5, the IL2, IL6, IL10 and IFN γ / HPRT transcript ratios were decreased in grafts depleted either by cyclophosphamide treatment or by parking. However, this difference did not reach statistical significance when compared to grafts from unmodified donors, except for IL10 ($P < 0.05$). The levels of cytokine transcripts in day 7 DDC-depleted grafts had reached levels similar to those detected in unmodified grafts on day 5 (Fig. 5). Taken together, these data indicate that, as for the infiltrate and C β /HPRT transcript level, the decrease in cytokines transcripts observed on day 5 is the result of a normal response with different kinetics.

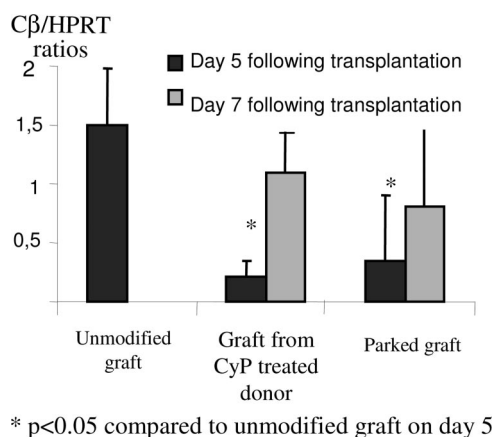


FIGURE 4. C β /HPRT transcript ratios. Compared to unmodified grafts, the C β /HPRT ratio was significantly decreased on day 5 in DDC-depleted grafts (either by CyP or by the parking procedure). These ratios increased on day 7, reaching levels that did not significantly differ from those in unmodified grafts on day 5, thus suggesting a delayed kinetics.

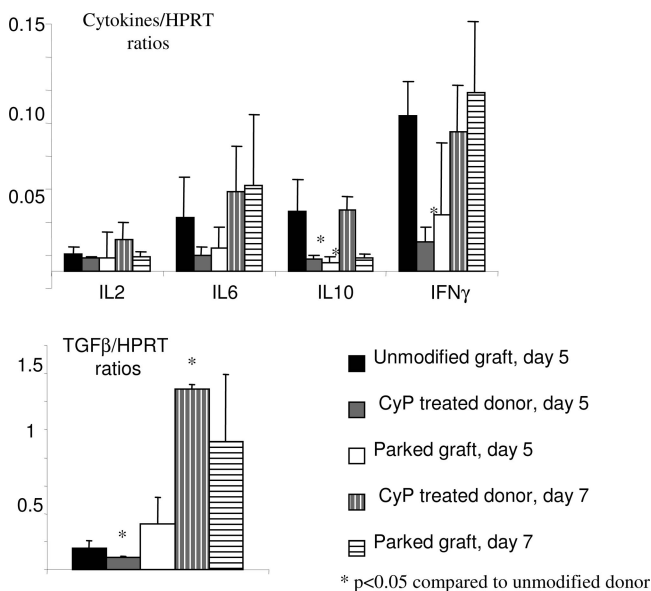


FIGURE 5. Cytokine/HPRT transcripts-ratios in allografts on days 5 and 7. mRNA transcripts for IL2, IL6, IL10, IFN γ , and TGF β were measured by competitive RT-PCR and divided by the number of mRNA copies of the nonregulated gene HPRT. The transcript levels of all cytokines, except TGF β , decreased on day 5 in DDC-depleted grafts, but on day 7, they reached similar levels to those observed on day 5 in unmodified grafts, suggesting the immune response to have a delayed kinetics.

Effect of Donor Dendritic Cells Depletion on Antibody Response

Because no peripheral humoral response (measured in the serum) could be observed despite the presence of Ig deposition in graft tissues, attention was paid to the IgM and IgG deposits within the grafts of the various experimental groups. On day 5 following transplantation, no IgG deposition was

observed in any graft, irrespective of donor resident dendritic cell depletion. IgM staining, which was present in all grafts, was less pronounced in DDC-depleted grafts. However, at the time of rejection of parked grafts, a marked IgG deposit was observed, with a weak IgM staining (Fig. 6).

Graft Infiltrating T Cell Repertoire Patterns are Unaffected by Donor Dendritic Cell Depletion

The maximal accumulation of C β RNA occurred on day 5 following transplantation, when both donors and recipients were untreated. In agreement with a previous report (34), the global CDR3 length pattern was only poorly altered during acute rejection of hearts from unmodified donors ($16.6 \pm 2.7\%$ variation in CDR3 length distribution (LD) from the normality reference). As a shift towards a more altered TCR repertoire usage could reflect low frequency dominant clones and a more pronounced role of the indirect pathway, TCR repertoires were analyzed in both situations. Grafts from cyclophosphamide-pretreated donors and parked grafts presented a similar level of CDR3 length distribution alteration on day 5 ($17 \pm 2.5\%$ and $16.5 \pm 3.5\%$ variation in CDR3 LD from the normality reference, respectively), which did not significantly differ from that of the unmodified grafts.

DISCUSSION

The fine mechanisms of acute allograft rejection are still not fully understood (37), particularly the role of resident graft dendritic cells, which has long been considered as central in the initiation of rejection (5, 6, 19, 20). These professional APC are believed to directly present donor MHC/peptide complexes to cross-reactive naïve and memory recipient T cells (38, 39). Indeed, experimental depletion of donor dendritic cells by bone marrow toxic agents (23) or the use of grafts from animals with chimeric bone marrow (40) or lacking MHC genes (15), delays rejection in rodent models. Furthermore, long-term survival has been reported using F1 transplants (5, 6), a characteristic potentially allowing graft targeting by recipient regulatory T cells (41). However, the exact role for resident DC in the rejection of fully MHC-

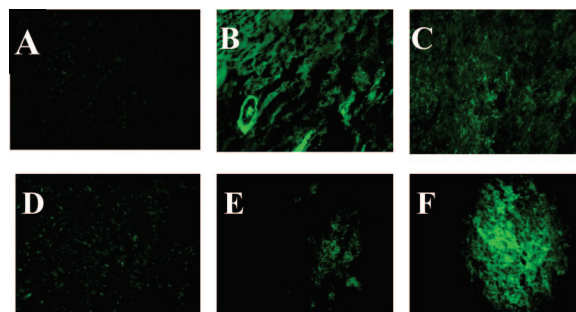


FIGURE 6. Graft immunoglobulin deposits. On day 5 following transplantation, IgM deposits were observed in all grafts, but were much more pronounced when grafts were not previously depleted of DDC (B: untreated LEW.1W heart in a LEW.1A recipient) as compared to DDC-depleted grafts (C: CyP-treated donor; D: previously parked LEW.1W heart). Ungrafted LEW.1W hearts showed no IgM deposits (A). At the time of rejection however, previously parked grafts displayed weak IgM (E) and marked IgG deposits (F), suggesting a role for antibody-mediated rejection.

mismatched grafts is tempered by several additional observations, including a strain-dependant effect (20, 23, 24, 26) and a modest effect of donor class II gene invalidation (16). The survival of DDC-depleted grafts is generally prolonged in F1 to parent combinations (5, 6, 26). Strain-dependent differences in resident dendritic cell numbers (42, 43) have been proposed to partly explain this strain-dependent effect of graft dendritic cell depletion (23). In addition, some treatments or manipulations, such as "passive enhancement," to inhibit the immune response of the intermediate recipient during a parking phase, aimed at depleting allogenic resident dendritic cells (5, 6), may affect the antigenicity of the transplant and favor carryover of regulatory cells (see below). Finally, recent studies using different experimental strain combinations (29, 30), including studies by our own laboratory (27, 28), have demonstrated that donor dendritic cells are paradoxically required for tolerance, particularly in spontaneous liver tolerance induction (29, 30) and when using DST (27) or antidonor class II antibodies (28).

In this paper, we revisited the effects of donor dendritic cell depletion on subsequent graft survival in a rat model of MHC-incompatible cardiac allotransplantation and extended the study to an analysis of graft infiltration. We found that cyclophosphamide was neither able to totally deplete resident dendritic cells (4–5% of donor class II positive cells remained within the hearts on day 5 after injection) nor to delay graft rejection. Because the sensitivity of dendritic cells to toxic agents may vary according to the rat strain used (23) and because minute amounts of dendritic cells have been shown to efficiently stimulate naïve T cells in mixed lymphocyte reactions, we also investigated parking of LEW.1W hearts in LEW.1A intermediate recipients. This procedure was associated with a lack of donor class II staining in hearts at the time of organ collection. This was not surprising given that DDC are known to migrate into host lymphoid organs within the first few days following transplantation (44, 45). However, interestingly, this parking procedure resulted in a significant accumulation of intermediate recipient dendritic cells. Whether this increase may or may not influence the fate of the subsequent graft, and to what extent, is questionable because of the effect of "forced" dendritic cell infiltration in murine transplant models (46, 47). Conditioning the intermediate host with antidonor MHC-antibody (5, 6) is associated with an abundant inflammatory infiltrate in the "enhanced" graft (28), which may interfere with the mechanisms of subsequent graft survival prolongation. Moreover, DST-induced tolerance is associated with regulatory cells within the graft itself (48, 49). Cyclosporine A has thus been preferentially used in our experiments to maintain the graft in a viable state in the intermediate host during the parking procedure. Cyclosporine A has been shown to downregulate class II expression in rat tissues (50–52). Furthermore, donor interstitial dendritic cells disappear after the second week of transplantation in CsA treated recipients (53). Finally, we checked that treating LEW.1W donors with a dosing schedule of CsA similar to that given to the intermediate host in the parking experiments did not affect, per se, the occurrence of rejection.

Despite a roughly similar graft survival in recipients of LEW.1W hearts lacking any donor class II positive cells, the procedure affected the magnitude and kinetics of the infiltrate and the transcriptional cytokine pattern within the graft.

Indeed, on day 5 posttransplantation, dendritic cells depletion was associated with a decrease in both macrophage and T-cell infiltration, with a more profound effect on T cells, particularly when parked hearts were used. Such quantitative data are not available in other reports on DDC depletion in the literature, although a dominant macrophage infiltrate was reported in the case of chimeric bone marrow donors (40). This observation is strengthened by a decrease in inflammatory/potentially "regulatory" Th1/Th2 cytokines (IL2, IL6, IL10, IFN γ), in immunosuppressive cytokine TGF β and in macrophage/monocyte-related cytokines (IL6 and IL10). Similarly, whereas IgM deposits were only observed on day 5, IgG was present on day 13 in parked hearts. These data suggest that although the resident dendritic cells are not required for rejection, they condition the kinetics of graft infiltration, probably by rapidly recruiting recipient naïve T cells to the graft, with little effect on macrophages. However, as suggested by the modest effect on graft survival and by the immunohistochemical study performed at the time of rejection, the infiltrate was mostly affected in its temporal kinetics, in that its composition and magnitude at rejection a few days later was similar to that observed in unmodified grafts.

The mechanisms accounting for the rejection of dendritic cell-depleted grafts are likely to be associated with an indirect pathway of allorecognition (16) and have not been directly studied here. Indeed, endothelial cells, even those expressing class II, seem unable to initiate an efficient direct response *in vivo* (54). In addition, we were unable to demonstrate donor class II molecules in DDC-depleted rejecting hearts in our experiments. The IgG deposits observed at the time of rejection in parked grafts may contribute to rejection and further suggest the role of indirect presentation (55). Unfortunately, no counterpart controls are available for the data concerning IgG deposition on day 13, because unmodified hearts were all rejected by day 7. Similarly, indirect presentation, which can also trigger rapid acute rejection (16, 56, 57), probably takes precedence over direct presentation in the absence of DDC. Paradoxically, the need for graft resident DC during the tolerance induction phase (27, 28, 31) suggests that the lack of potentially tolerogenic resident DC could favor the rapid tempo of acute rejection through an indirect pathway. One could hypothesize that, in contrast, the respective effect in tolerance and rejection could be influenced by the number of resident dendritic cells.

Finally, taken collectively, our data emphasize that in the very same strain combination (LEW.1W hearts transplanted into MHC-mismatched LEW.1A recipients), donor dendritic cell depletion, which had only a borderline effect on graft survival in our experiments, dramatically affected tolerance induction in two different models (27, 28), suggesting that resident dendritic cells play a more prominent role in tolerance rather than in acute rejection.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. J. Ashton-Chess for editing the manuscript and R. Lechler for discussion of the data.

REFERENCES

1. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, et al. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992; 175(1): 305–308.

2. Waaga AM, Chandraker A, et al. Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation* 1998; 65(7): 876–883.
3. Sayegh MH, Carpenter CB. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 1996; 13(3): 221–229.
4. Gallon L, Watschinger B, Murphy B, et al. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation* 1995; 59(4): 612–616.
5. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982; 155(1): 31–41.
6. Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982; 156(6): 1835–1841.
7. Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, et al. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation* 1997; 64(6): 795–800.
8. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, et al. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001; 167(12): 7199–7206.
9. Game DS, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2002; 10(2–3): 101–108.
10. Lee RS, Yamada K, Houser SL, et al. Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(6): 3276–3281.
11. Szeto WY, Krasinskas AM, Kreisel D, et al. Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2002; 73(7): 1116–1122.
12. Stanford RE, Ahmed S, Hodson M, et al. A role for indirect allorecognition in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant* 2003; 3(6): 736–742.
13. Ensminger SM, Spriewald BM, Witzke O, et al. Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2002; 73(2): 279–286.
14. Benichou G, Tam RC, Soares LR, et al. The influence of two distinct alloresponse pathways on the design of peptide-based strategies for allograft tolerance. *Res Immunol* 1996; 147(6): 377–387.
15. Auchincloss H, Lee R, Shea S, et al. The role of “indirect” recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(8): 3373–3377.
16. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, et al. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* 2000; 106(8): 1003–1010.
17. Braun MY, Grandjean I, Feunou P, et al. Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells. *J Immunol* 2001; 166(8): 4879–4883.
18. Qian S, Fu F, Lu L, et al. Impact of donor MHC class I or class II antigen deficiency on first- and second-set rejection of mouse heart or liver allografts. *Immunology* 1996; 88(1): 124–129.
19. Talmage DW, Dart G, Radovich J, Lafferty KJ. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science* 1976; 191(4225): 385–388.
20. Fabre J, Morris P. The role of passenger leucocytes in the rejection of renal allografts in the rat. *Transplantation* 1973; 15(6): 631–633.
21. Batchelor JR, Welsh KI, Maynard A, Burgos H. Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. *J Exp Med* 1979; 150: 455.
22. Welsh KI, Batchelor JR, Maynard A, Burgos H. Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. II. Retransplantation of (ASx AUG)F1 kidneys from AS primary recipients into (ASx WF)F1 secondary hosts. *J Exp Med* 1979; 150: 465.
23. McKenzie JL, Beard ME, Hart DN. The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival. *Transplantation* 1984; 38(4): 371–376.
24. Stegall MD, Tezuka K, Oluwole SF, et al. Interstitial class II-positive cell depletion by donor pretreatment with gamma irradiation. Evidence of differential immunogenicity between vascularized cardiac allografts and islets. *Transplantation* 1990; 49(2): 246–251.
25. Wang Z, Castellana A, De Creus A, et al. Heart, but not skin, allografts from donors lacking Flt3 ligand exhibit markedly prolonged survival time. *J Immunol* 2004; 172: 5924–5930.
26. Hart DN, Fabre JW. Graft adaptation: studies on possible mechanisms in long-term surviving rat renal allografts. *Transplantation* 1980; 30(1): 73–80.
27. Josien R, Heslan M, Brouard S, et al. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998; 92(12): 4539–4544.
28. Gagne K, Brouard S, Guillet M, et al. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* 2001; 31(10): 3111–3120.
29. Sun J, McCaughan GW, Gallagher ND, et al. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 1995; 60(3): 233–236.
30. Sriwatanawongsa V, Davies HS, Calne RY. The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nat Med* 1995; 1(5): 428–432.
31. Ko S, Deiwick A, Jager MD, et al. The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med* 1999; 5(11): 1292–1297.
32. Ono K, Lindsey E. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967; 57: 225–229.
33. Gagne K, Brouard S, Giral M, et al. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164(3): 1553–1563.
34. Guillet M, Brouard S, Gagne K, et al. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168(10): 5088–5095.
35. Seville F, Gagne K, Guillet M, et al. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilises specific Vb families without skewing of the CDR3 length distribution. *J Immunol* 2001; 167(6): 3082–3088.
36. Hart DN, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981; 154(2): 347–361.
37. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1(2): 97–102.
38. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR, et al. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11(3): 83–88.
39. Morelli AE, Thomson AW. Role of dendritic cells in the immune response against allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9(6): 607–613.
40. Krasinskas AM, Eiref SD, McLean AD, et al. Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000; 70(3): 514–521.
41. Miranda V, Berton I, Read J, et al. Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(4): 987–997.
42. Darden AG, Clarke RD, Guttman RD. Rat cardiac dendritic cells: frequency in inbred and congenic rats. *Transplant Proc* 1987; 19(1 Pt 1): 208.
43. Darden AG, Forbes RD, Darden PM, Guttman RD. The effects of genetics and age on expression of MHC class II and CD4 antigens on rat cardiac interstitial dendritic cells. *Cell Immunol* 1990; 126(2): 322–330.
44. Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Donor dendritic leukocytes migrate from cardiac allografts into recipients’ spleens. *Transplant Proc* 1990; 22(4): 1943–1944.
45. Saiki T, Ezaki T, Ogawa M, Matsuno K. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation* 2001; 71(12): 1806–1815.
46. Fu F, Li Y, Qian S, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* 1996; 62(5): 659–665.

47. Coates PT, Duncan FJ, Colvin BL, et al. In vivo-mobilized kidney dendritic cells are functionally immature, subvert alloreactive T-cell responses, and prolong organ allograft survival. *Transplantation* 2004; 77(7): 1080–1089.
48. Douillard P, Pannetier C, Josien R, et al. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157(3): 1250–1260.
49. Vignes C, Chiffolleau E, Douillard P, et al. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2000; 165(1): 96–101.
50. Groenewegen G, Buurman WA, Jeunhomme GM, van der Linden CJ. Effect of cyclosporine on MHC class II antigen expression on arterial and venous endothelium in vitro. *Transplantation* 1985; 40(1): 21–25.
51. Rincon J, Parra G, Quiroz Y, et al. Cyclosporine A reduces expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. *Clin Exp Immunol* 2000; 121(2): 391–398.
52. Charreau B, Coupel S, Boulday G, Soulillou JP. Cyclosporine inhibits class II major histocompatibility antigen presentation by xenogeneic endothelial cells to human T lymphocytes by altering expression of the class II transcriptional activator gene. *Transplantation* 2000; 70(2): 354–361.
53. Milton AD, Spencer SC, Fabre JW. The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in the rat. *Transplantation* 1986; 42(4): 337–347.
54. Kreisel D, Krasinskas A, Krupnick A, et al. Vascular endothelium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection. *J Immunol* 2004; 173(5): 3027–3034.
55. Sauve D, Baratin M, Leduc C, et al. Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation. *Am J Transplant* 2004; 4(8): 1237–1245.
56. Reed AJ, Noorchashm H, Rostami SY, et al. Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *J Immunol* 2003; 171(12): 6502–6509.
57. Jurcevic S, Chandler P, Sacks SH, Simpson E. Rapid rejection of HLA-A2 transgenic skin graft due to indirect allorecognition. *Transplantation* 2001; 72(6): 994–997.

Contribution à l'étude de la tolérance et du rejet chronique en allotransplantation

Mots-clés : tolérance, rejet chronique, allotransplantation.

La toxicité des traitements immunosuppresseurs et la survenue du rejet chronique sont deux obstacles majeurs à la survie à long terme du greffon en transplantation humaine. Dans cette thèse est analysée la réponse immunitaire face à une stimulation antigénique connue, la vaccination anti-grippale, d'une rare cohorte de patients greffés rénaux « opérationnellement » tolérants. Les résultats montrent que la plupart des ces individus sont immunocompétents, ce qui suggère que la survie du greffon chez ces patients ne dépend pas d'une immunodépression globale mais qu'elle résulte d'une tolérance spécifique. Ces données ont constitué le prérequis à la recherche d'une signature de l'état de tolérance, qui pourrait permettre la diminution des traitements immunosuppresseurs chez des patients greffés présentant un tel profil. Nous avons par ailleurs caractérisé les modalités de la survenue du rejet chronique chez le rat, dans un modèle où la survie à long terme des greffons cardiaques est induite par une transfusion de sang du donneur avant la transplantation. Nous montrons chez ces animaux l'activation par voie indirecte de cellules CD4⁺ dans les premiers jours, puis la production d'anticorps spécifiques du donneur associée à des dépôts de C4d dans les greffons. La transfusion de sang du donneur avant la greffe induit donc dans cette combinaison un rejet chronique mimant celui induit par les anticorps en clinique. Ce modèle pourrait servir d'outil pour tester de nouvelles molécules pharmacologiques dédiées au traitement du rejet chronique chez l'homme.

Contribution to tolerance and chronic rejection characterisation in allotransplantation

Keywords: tolerance, chronic rejection, allotransplantation.

Immunosuppressive regimens toxicity and chronic rejection are major hurdles to long term graft acceptance in human transplantation. In a part of this work, humoral and cellular responses to influenza vaccination were analysed in a rare cohort of patients "operationally" tolerant to a kidney allograft. Results show that most of these patients were immunocompetent suggesting that this state of tolerance was not related to a global immunodeficiency but was specific to the graft. This constituted the prerequisite for a potential establishment of a tolerance signature, which would allow for the down-modulation of immunosuppressive drugs administration in patients presenting a similar pattern. In another part of this thesis, we studied chronic rejection of heart allografts in a rat model following DST treatment. The data suggest that the chronic graft lesions developing in long-term graft recipients are the result of progressive humoral activation (i.e donor-specific antibodies associated with C4d deposits in the grafts) associated with a persisting indirect T helper response. These features may represent a useful model for understanding sub acute antibody-mediated and chronic active humoral rejection in human.