

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Immunothérapie
en allotransplantation chez le primate :
Inhibition du complément et de la
costimulation.

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : BIOLOGIE SANTE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée

et soutenue publiquement par

Nicolas POIRIER

Le 28 septembre 2009, devant le jury ci-dessous :

Président du Jury : Jean-Paul SOULILLOU, Professeur, Nantes

Rapporteurs : Pierre GIANELLO, Professeur, Bruxelles

Daniel OLIVE, Directeur de Recherche, Marseille

Examineur : Antoine DURRBACH, Professeur, Paris

Directeur de thèse : Gilles BLANCHO, Professeur, Nantes

Co-directeur : Bernard VANHOVE, Directeur de Recherche,
Nantes

« Veux-tu vivre gaiement ? Chemine avec deux sacs,
L'un pour donner, l'autre pour recevoir. »

GOETHE, *Maximes et réflexions*

Sommaire

<u>Liste des abréviations.....</u>	<u>6</u>
<u>Liste des figures.....</u>	<u>8</u>
<u>Liste des tableaux.....</u>	<u>8</u>
Avant-propos.....	11
Introduction.....	16
<u>I- Mécanismes effecteurs du rejet d'allogreffe.....</u>	<u>16</u>
<u>I.1- Histoire naturelle d'une allogreffe.....</u>	<u>16</u>
I.1.1. La mort cérébrale.....	16
I.1.2. La chirurgie.....	17
I.1.3. L'ischémie-reperfusion (I/R).....	18
I.1.4. La réponse allogénique.....	19
-1.4.1. La présentation allogénique.....	19
<i>La voie directe de présentation.....</i>	<i>19</i>
<i>La voie indirecte de présentation.....</i>	<i>20</i>
<i>La voie semi-directe de présentation.....</i>	<i>21</i>
-1.4.2. L'activation lymphocytaire T.....	21
<i>Signal 1 : Le signal antigénique.....</i>	<i>21</i>
<i>Signal 2 : Le signal de costimulation.....</i>	<i>22</i>
<i>Signal 3 : Le signal des cytokines.....</i>	<i>23</i>
-1.4.3. La phase effectrice.....	24
<i>La réponse cellulaire.....</i>	<i>24</i>
<i>La réponse humorale.....</i>	<i>25</i>
<u>I.2- Le rejet d'allogreffe : de la Biologie à la Clinique.....</u>	<u>27</u>
I.2.1. Le rejet hyper aigu.....	28
I.2.2. Le rejet aigu à médiation cellulaire.....	28
I.2.3. Le rejet aigu à médiation humorale.....	29
-2.3.1. Physiopathologie.....	29
-2.3.2. Diagnostic histologique.....	31
-2.3.3. Données cliniques.....	32
I.2.4. Dysfonction chronique d'allogreffe.....	33
<u>I.3- La tolérance.....</u>	<u>34</u>
I.3.1. La tolérance centrale.....	34
I.3.2. La tolérance périphérique.....	35
-3.2.1. L'ignorance.....	36
-3.2.2. La délétion.....	36
-3.2.3. L'anergie.....	37
-3.2.4. Régulation/suppression et modulation.....	38
I.3.3. Transposition aux modèles grands animaux.....	39
I.3.4. Tolérance clinique dite « opérationnelle ».....	41
<u>II- La costimulation.....</u>	<u>42</u>

II.1- La voie CD28/B7/CTLA-4/.....	42
II.1.1. Expression des molécules du trinôme.....	43
II.1.2. Les molécules de B7 (CD80 et CD86).....	44
-1.2.1. CD80 vs CD86.....	44
-1.2.2. Signalisation.....	45
II.1.3. CD28.....	47
-1.3.1. Signalisation de CD28.....	47
-1.3.2. Rôle de CD28 dans la réponse lymphocytaire.....	47
-1.3.3. La synapse immunologique et CD28.....	49
II.1.4. CTLA-4.....	52
-1.4.1. Signalisation de CTLA-4.....	52
-1.4.2. Rôle de CTLA-4 dans la réponse lymphocytaire.....	53
-1.4.3. La synapse immunologique et CTLA-4.....	54
II.1.5. Les modèles KO du trinôme CD28/B7/CTLA-4.....	55
-1.5.1. Les souris CD80, CD86, CD80/86 KO.....	55
-1.5.2. Les souris CD28 KO.....	57
-1.5.3. Les souris CTLA-4 KO.....	58
II.2- Le blocage de la costimulation.....	59
II.2.1. Stratégies en développement.....	59
II.2.2. Stratégies bloquant B7.....	61
-2.2.1. Chez le rongeur.....	61
-2.2.2. Chez le primate non-humain (PNH).....	63
-2.2.3. Chez l'homme.....	64
II.2.3. Les anti-CD28.....	64
-2.3.1. Les anti-CD28 conventionnels.....	65
<i>Les bivalents agonistes.....</i>	<i>65</i>
<i>Le bivalent modulant.....</i>	<i>66</i>
<i>Les bivalents Fc-silencieux.....</i>	<i>67</i>
<i>Les monovalents antagonistes.....</i>	<i>67</i>
-2.3.2. Les anti-CD28 superagonistes.....	68
<i>Chez le rongeur.....</i>	<i>68</i>
<i>Chez l'homme.....</i>	<i>70</i>
<i>Chez le primate non-humain.....</i>	<i>71</i>
III- Les lymphocytes T régulateurs.....	73
III.1- Les Treg CD4+ CD25+ Foxp3+.....	73
III.1.1. Les Treg naturels (nTreg).....	73
III.1.2. Les Treg induits (iTreg).....	74
III.1.3. Treg et la costimulation CD28/CTLA-4.....	75
-1.3.1. Rôle de CD28.....	75
-1.3.2. Rôle de CTLA-4.....	77
III.1.4. Les Mécanismes de suppression.....	79
III.1.5. Treg et transplantation.....	81
-1.5.1. Rôle des Treg en transplantation.....	81
-1.5.2. Treg et immunosuppression.....	83
<i>L'immunosuppression chimique.....</i>	<i>83</i>
<i>Les anticorps thérapeutiques.....</i>	<i>84</i>
IV- Le complément en transplantation.....	86
IV.1- L'activation du complément.....	86

IV.1.1. La voie classique.....	86
IV.1.2. La voie alterne.....	87
IV.1.3. La voie des lectines.....	87
IV.2- Les régulateurs naturels.....	88
IV.2.1. Le C1-inhibiteur.....	88
IV.2.2. Autres régulateurs.....	90
IV.3- Réponse cellulaire et complément.....	90
IV.4- Inhibition du complément en transplantation.....	92
IV.4.1. Chez le donneur	92
IV.4.2. Chez le receveur	93
V- Objectifs :.....	95
Résultats.....	98
I- Projet I.....	98
I.1- Article I :	98
I.2- Résultats complémentaires.....	132
I.3- Discussion.....	144
I.4- Perspectives :.....	151
II- Projet II.....	153
II.1- Article II.....	153
II.2- Article III.....	162
II.3- Article IV.....	166
II.4- Discussion.....	186
II.5- Perspectives.....	190
Conclusion.....	193
Bibliographie.....	197
Annexes.....	225
I- Annexe I.....	225
II- Annexe II.....	236
III- Annexe III.....	248
IV- Publications/Communications/Prix.....	263

Liste des abréviations

ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ag : Antigène
AICD : Activation Induced Cell Death
AP-1 : Activator Protein-1
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adenosine Triphosphate
BCR : B Cell Receptor
C1-INH: C1-inhibiteur
CAV: Vasculopathie Chronique d'Allogreffe
Cdk : Cyclin Dependant Kinase
CIVD :Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CNI : Inhibiteur de la calcineurine
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CPT : Capillaire Peri-Tubulaire
CsA : Cyclosporine A
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CVF : Cobra Venom Factor
DAF : Decay Accelerating Factor
DC: Cellule Dendritique
dKO : double Knock-out
DST : Donor Specific Transfusion
DTH : Delayed-Type Hypersensibility
EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EAU: Experimental Autoimmune Uveoretinitis
Fc : Fragment constant
FcγR : Fc gamma récepteur
FI/AT : Fibrose Interstitiel/Atrophie Tubulaire
GDF : Delayed Graft Function
GVHD: Graft Vs Host Disease
HLA : Human Leukocyte Antigen
I/R : Ischémie/Reperfusion
ICAM : Intercellular Adhesion Molecule

ICOSL : Inducible Costimulator Ligand
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
iTreg : Lymphocyte T régulateur induit
IVIg: Intravenous Immunoglobuline
KO : Knock-out
LB : Lymphocyte B
LFA : [Lymphocyte function-associated antigen](#)
LT : Lymphocyte T
MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells
MLR : Réaction Mixte Lymphocytaire
NF-AT: Nuclear Factor of Activated T cell
NK : Natural killer
NOD : Non-Obese Diabetic
Nrp-1 : Neuropiline 1
nTreg: Lymphocyte T régulateur naturel
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
pCMH : peptide-CMH
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PNH : Primate Non-Humain
RC : Rejet Chronique
rhC1INH: C1-inhibiteur humain recombinant
SI: Synapse Immunologique
sIg : Immunoglobuline de surface
TCR : T Cell Receptor
TGF : Transforming Growth Factor
Th : T Helper
TIM : T-cell O_g domain and mucin domain
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
Treg: Lymphocyte T Régulateur
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4 : Very Late Antigen-4
ZAP70 : ζ chain Associated Protein 70

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation.....	25
Figure 2 : Représentation schématique et principales caractéristiques des réponses humorales primaire et secondaire dans le temps.....	27
Figure 3 : Représentation schématique de la physiopathologie du rejet aigu à composante humorale.....	31
Figure 4 : Les divers mécanismes de tolérance périphérique.....	39
Figure 5 : Signalisation de B7 dans les APC après interaction avec CTLA-4 (A) ou CD28 (B).....	46
Figure 6 : Rôle respectif de CD28 et CTLA-4 sur l'activation du lymphocyte T.....	49
Figure 7 : Formation dynamique des microclusters TCR-CD28 et de la synapse immunologique.....	51
Figure 8 : Le modèle du « reverse STOP-signal » de CTLA-4.....	55
Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes du blocage de CD28 vs B7.....	65
Figure 10 : La molécule sc28AT.....	68
Figure 11 : Représentation des épitopes reconnus par les anti-CD28 superagoniste et conventionnels.....	70
Figure 12 : Théorie du modèle du « rhéostat » pour la fonction suppressives des Treg.....	77
Figure 13 : Principaux mécanismes par lesquels les Treg inhibent directement les lymphocytes T effecteurs (A) ou indirectement (B), en modulant la fonction des CPA.....	81
Figure 14 : L'activation du complément par la voie classique, alterne ou des lectines.....	88

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustive des principales voies de costimulation du lymphocyte T.....	23
Tableau 2 : Blocage de la costimulation en usage ou en développement clinique (haut) ou étudié expérimentalement (bas) en transplantation (liste non-exhaustive).....	61

Avant-propos

Avant-propos

Bref historique de l'allotransplantation

« *Simple curiosité opératoire aujourd'hui, la transplantation d'un organe pourra peut-être un jour avoir un certain intérêt pratique* ». Plus précurseur qu'il ne le croyait, le Docteur Alexis Carel fut le premier, avec le Viennois Emerich Ullmann, à tenter la transplantation d'organe chez l'animal. En 1902, à des intervalles proches, tous deux rapportent avoir transplanté le rein d'un chien à son propre cou. Les résultats semblent prometteurs. Toutefois, lorsqu'ils tentent des transferts d'animal à animal de la même espèce, c'est l'échec. Pour Carel et Ullmann, « *seule l'autogreffe peut fonctionner ; on ne peut pas transgresser la loi de la nature et chaque individu est unique* ».

Quatre ans plus tard, le Professeur Mathieu Jaboulay est le premier à oser l'application de la greffe rénale à l'homme : il prélève le rein d'un porc et le greffe au coude d'une femme gravement malade. L'échec est immédiat. En 1933, le Russe Serguey Voronoy, qui travaille sur la transplantation depuis de longues années, parvient à une conclusion majeure : « *le rejet est un événement immunologique* ». Il décide alors de réaliser la première allotransplantation rénale chez l'homme à partir d'un donneur décédé. Quatre jours après greffe, la patiente décède, mais un nouveau pas a été accompli. S'ensuit alors une longue période de latence ; le contexte mondial n'est guère propice aux recherches. Il faut attendre l'après-guerre pour la reprise des travaux.

Ce sont, avant tout, les progrès chirurgicaux dans les années 1950 qui permettent à la transplantation d'organe de devenir techniquement possible. Ainsi, les premières allotransplantations rénales utilisant des donneurs vivants apparentés voient le jour en France en 1952, sous la conduite des Professeurs Jean Hamburger, Jean Vaysse et René Küss (MICHON et al. 1953), et par Merrill et Murray à Boston en 1954 entre de « vrais » jumeaux (MERRILL et al. 1956). Ce n'est qu'à la fin des années 1960 que le foie, les poumons et le cœur connaissent leurs premiers essais cliniques. Néanmoins, les différences antigéniques entre donneurs et receveurs, même dans le cas de donneurs vivants apparentés (excluant le cas des « vrais » jumeaux), impliquent que le rejet du greffon (organe étranger) reste inévitable. En absence d'immunosuppression, le receveur de rein à partir d'un donneur vivant apparenté ne survécu que 3 semaines (MICHON et al. 1953). La greffe entre de « vrais jumeaux », elle, est la première réussite. Désormais, un seul objectif pour les différents chercheurs de la planète : reproduire cette réussite chez des patients qui n'ont pas de jumeau. Une seule

solution : forcer la nature ! En 1958, Dausset en France (prix Nobel de médecine en 1980 (DAUSSET 1958)), Payne aux Etats-Unis (PAYNE et ROLFS 1958) et Van Rood au Pays-Bas (VAN ROOD et al. 1958) identifient l'expression tissulaires du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), responsable de ces différences antigéniques et appelé système HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme. Les connaissances sur le système HLA permettent ainsi d'établir la compatibilité donneur-receveur avant transplantation et de limiter considérablement les rejets sévères en transplantation. Néanmoins, cette avancée ne suffit pas encore à prévenir le rejet d'allogreffe. En 1959, les équipes bostonienne et parisienne réussissent les premières greffes rénales entre de « faux » jumeaux. Des séances d'irradiation totale et un traitement par corticoïdes permettent d'affaiblir suffisamment le système immunitaire du patient pour qu'il n'y ait pas de rejet. C'est la découverte de l'immunosuppresseur, Cyclosporine A, à la fin des années 1970 qui fut une percée majeure dans ce domaine (Calne 1970). La transplantation d'organe connaît un énorme succès et devient le traitement de choix en cas d'insuffisance terminale d'un organe vital. Toute une variété d'immunosuppresseurs a ensuite été développée puis utilisée, améliorant considérablement le taux de survie des patients (*e.g.* le taux de survie à un an d'une greffe rénale est aujourd'hui supérieur à 90% dans la plus part des centres contre moins de 30% dans les années 1970).

Limitations actuelles en allotransplantation

La transplantation d'organe est devenue une des avancées les plus spectaculaires de la médecine du XX^{ième} siècle. Les quelques 4600 greffes d'organes effectuées en 2007 en France en sont une parfaite illustration. Cependant, cet acte thérapeutique ne suffit plus aux réels besoins de nos populations vieillissantes ; avec une profonde pénurie d'organes. Si, en 2007, 2911 patients ont pu recevoir une greffe de rein en France, 6491 personnes (dont 3510 nouveaux inscrits) étaient encore en attente au 31 décembre, dont 128 sont décédés (1,3% de mortalité totale et plus de 10% de mortalité chez les personnes en attente d'une greffe cardiaque ou pulmonaire (données de l'Agence de la Biomédecine)). Le manque d'organe n'est cependant pas la seule ombre au tableau. En effet, l'immunosuppression chronique ne prévient ou ne traite toujours pas tous les types de rejet, comme le rejet chronique à long terme ou les rejets humoraux aigus. Elle peut aussi être responsable d'importants effets secondaires, tels que : toxicité médicamenteuse, notamment rénale, et diminuant les défenses du système immunitaire du patient, exposer à des risques majorés de certains types de cancers

ou d'infections opportunistes. Il incombe donc à la recherche et au corps médical d'améliorer les traitements anti-rejet et d'innover vers de nouvelles stratégies plus spécifiques ou encore idéalement d'évoluer vers un état de tolérance où le greffon ne serait pas rejeté même en absence d'immunosuppression.

Depuis plus de 50 ans, Billingham, Medawar et Brent ont établi le concept de tolérance (BILLINGHAM et al. 1953). La recherche expérimentale sur l'animal a permis de comprendre les différentes phases du rejet de greffe et les effecteurs impliqués dans ces mécanismes. Ainsi, cibler spécifiquement les effecteurs du rejet permet de mieux le prévenir. De nombreux protocoles expérimentaux d'induction de tolérance ont été mis au point ces dernières années chez l'animal. Ces expérimentations ont permis le développement de molécules utilisables potentiellement chez l'homme. Néanmoins, aucune de ces stratégies induisant un état de tolérance périphérique chez le rongeur ne peut s'appliquer directement chez l'homme, justifiant l'utilisation d'espèces intermédiaires, génétiquement plus proches de l'homme, afin de pouvoir relier, de manière translationnelle, la recherche expérimentale et l'application thérapeutique.

De l'intérêt des primates en transplantation

Comme la plupart des domaines de la recherche biomédicale (VIH, diabète, maladies neurodégénératives, ...), la recherche en transplantation a (peu) recours aux primates. Bien entendu, les modèles *in vitro* de culture cellulaire, ou les modèles rongeurs présentent une grande importance en recherche fondamentale. Ces solutions proposées comme « alternatives » à la recherche sur le primate non-humain (PNH) ne peuvent en aucun cas remplacer les essais thérapeutiques ou les modèles animaux expérimentaux s'approchant de la situation humaine. En effet, de par leur proximité phylogénétique avec l'homme, les PNH constituent les sujets expérimentaux de choix dans les recherches pré-cliniques mettant en jeu des considérations immunologiques, infectiologiques, pharmacologiques et physiologiques. Si leur destination originale depuis les années 1960 se faisait vers une utilisation en xénotransplantation humaine, leur rôle depuis les années 90 tend à se centrer sur la recherche préclinique uniquement. En effet, pour des raisons de sécurité virale et d'éthique principalement, les PNH ne constituent plus le premier choix en tant que donneurs potentiels d'organes pour l'homme. Le choix se porte désormais sur le porc. En revanche, l'importance des PNH demeure majeure dans les modèles expérimentaux de xéno greffes (combinaison porc-primate), ainsi qu'en allotransplantation pour tester de nouveaux immunosuppresseurs

ou encore de nouvelles stratégies de prévention du rejet ou d'induction de tolérance avant le passage chez l'homme. La recherche sur « nos cousins » les primates n'étant pas anodine d'un point de vue éthique et philosophique, ces considérations font partie intégrante des protocoles expérimentaux (règle des 3 Rs (Réduire, Raffiner et Remplacer), justification du modèle et de l'espèce étudiée, ...). Enfin, il demeure primordial de ne considérer les résultats issus de modèles précliniques, quand bien même de primates, que comme des résultats expérimentaux, proches de l'homme et des situations cliniques, mais en aucun cas comme vérité transférable intégralement à l'homme. En effet, bien que de nombreuses stratégies aient vu leur développement s'arrêter après des essais précliniques décourageants chez le primate, un faible nombre de stratégies (comme les anti-CD40L ou l'anti-CD28 superagoniste) ont pu se révéler très encourageantes chez le primate mais problématiques lors de premiers essais cliniques chez l'homme.

Cette thèse, basée sur des travaux de recherches précliniques chez le PNH, a pour principal objectif l'étude de nouvelles stratégies thérapeutiques en transplantation. Après un chapitre sur les différents types de rejets auxquels sont confrontés les patients, ainsi que les principaux mécanismes effecteurs impliqués, je présenterai la dynamique et l'importance des molécules de costimulation, en particulier la voie CD28/B7/CTLA-4, comme stratégie thérapeutique pour cibler spécifiquement les lymphocytes T. Enfin, l'introduction se terminera par la description du rôle du complément en transplantation et de l'intérêt de cette composante comme stratégie thérapeutique dans la prévention du rejet aigu humoral. En annexe sont joints des articles ou revues obtenus suite à différentes collaborations réalisées au cours de cette thèse : Dugast et al. 2008, Haudebourg, Poirier et al. 2009, Haudebourg, Poirier et al. (co-premier auteur, *en préparation*).

Introduction

Introduction

I- Mécanismes effecteurs du rejet d'allogreffe

Depuis ses premières descriptions cliniques, l'impact et la compréhension du rejet aigu d'allogreffe ont beaucoup évolué. A l'heure actuelle, le rejet aigu d'allogreffe précoce est le plus souvent contrôlé en augmentant l'immunosuppression. Il peut passer inaperçu (on parle de rejet infra-clinique). Toute transplantation implique une reconnaissance allogénique chez le receveur, via des mécanismes immunologiques beaucoup plus complexes qu'une simple réponse à un antigène soluble. D'un point de vue théorique, la transplantation d'organe ne devrait pas réussir, tant sont « fortes » les barrières d'histocompatibilité et tant la fréquence des lymphocytes précurseurs alloréactifs est significative. Pourtant, la transplantation d'organes est une thérapeutique efficace.

Il y a une cinquantaine d'années, Medawar démontrait qu'une greffe de peau était rejetée par un mécanisme actif, avec une mémoire et un rejet accéléré spécifique des allogreffes secondaires. Plus tard, Medawar, Brent et Billingham montraient que des animaux, rendus tolérants dès leur naissance par l'injection de cellules allogéniques, ne rejetaient pas les greffes de peau du même donneur. Ce concept de « rejet vs tolérance » continue, en grande partie, à dominer l'immunologie de transplantation.

I.1- Histoire naturelle d'une allogreffe

I.1.1. La mort cérébrale

Bien que la transplantation rénale, puisse se pratiquer à partir de donneurs vivants, la majorité des transplantations sont effectuées à partir de donneurs en mort cérébrale ou encéphalique, y compris à partir de donneur dits « marginaux » en France. Malheureusement, l'état physiologique anormal de mort cérébrale a un impact négatif sur le devenir du transplant. Les reins transplantés à partir de donneurs en mort cérébrale ont une survie diminuée par rapport à ceux de donneurs vivants de même tranche d'âge (Terasaki et al. 1995). Ces greffons sont potentiellement endommagés avant le prélèvement et/ou la préservation. En effet, l'état de mort cérébrale s'accompagne d'une cascade d'événements déclenchant des changements systémiques et hormonaux dès que la pression intracrânienne augmente, conduisant à des fluctuations chaotiques de la pression sanguine, à une hypotension, hypothermie, coagulopathie et anomalies biochimiques conduisant globalement à des phénomènes

ischémiques. Au final, un état d'hypoperfusion des reins du donneur conduit rapidement à une nécrose tubulaire.

En plus des nombreuses perturbations cardio-pulmonaires, d'importants mécanismes immunologiques sont associés à la mort cérébrale et conduisent à augmenter l'immunogénicité du greffon (E. M. Bos et al. 2007) par activation de l'endothélium, surexpression de molécules d'adhésion (E- et P- sélectines, VCAM, ICAM, LFA-1) et du CMH de classe II et sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-2, IL-6, TNF α , TGF β , IFN γ ...). Tous ces mécanismes induisent un gradient chimiotactique qui favorise l'infiltration leucocytaire dans les tissus et le futur greffon (qui sera amplifiée par les mécanismes d'ischémie/reperfusion) et expliquant que ces greffons sont sujets à des épisodes de rejet et de retard de démarrage plus fréquents (J Pratschke et al. 2005), mais également à des dysfonctions à long terme plus fréquentes (Johann Pratschke et al. 2008).

I.1.2. La chirurgie

Le stress d'une chirurgie invasive de transplantation est également inducteur de cytokines pro-inflammatoires, telles que TNF α , IL-1, IL-6 (produit notamment par les macrophages péritonéaux), et activateurs de l'immunité innée cellulaire ou humorale. Une simple incision chirurgicale est suffisante pour générer une réponse de type Th1 (activation des monocytes et des lymphocytes T), alors qu'une déviation vers une réponse de type Th2 (activation des éosinophiles, des mastocytes et de certains types de lymphocytes B produisant notamment des IgE) est plutôt décrite dans les interventions chirurgicales plus invasives, telles qu'une transplantation d'organe ou une chirurgie « ouverte » (E. Lin et al. 2000). La chirurgie peut également être responsable d'un désordre de la microvascularisation, souvent observée chez les patients ayant subi une hypoperfusion prolongée secondaire à une perte de sang intra-opératoire significative (Ni Choileain et Redmond 2006). Cette dysfonction de la microvascularisation est notamment caractérisée par une accumulation de leucocytes adhérents à l'endothélium de ces vaisseaux et une augmentation de la perméabilité vasculaire. De même, une réponse inflammatoire secondaire à l'acte chirurgical peut être augmentée juste par la manipulation des tissus ou des organes. Des études expérimentales ont ainsi montré que, chez le lapin, l'extériorisation mésentérique après une laparotomie conduit à une rapide accumulation de leucocytes dans cette microvascularisation, par une augmentation des molécules d'adhésion (Fiebig et al. 1991).

I.1.3. L'ischémie-reperfusion (I/R)

Le phénomène d'I/R est un des facteurs « non-immunologiques » influençant le plus le devenir du greffon. L'ischémie chaude (durant le prélèvement) et l'ischémie froide sont toutes deux délétères, même si le froid freine ce processus en ralentissant le métabolisme. La première raison est la privation en oxygène et le phénomène d'hypoxie cellulaire avec l'accumulation de produits du métabolisme et de radicaux libres. Le passage du métabolisme en mode anaérobie ne génère qu'un minimum de phosphates de hautes énergies (ATP), qui sont insuffisants pour la demande des tissus aérobie, conduisant à l'acidose tissulaire. La privation en ATP induit également l'inhibition de certaines pompes nécessaires au maintien des potentiels de membrane. C'est le cas de la phosphatase membranaire Na^+/K^+ , qui va laisser alors le sodium entrer et s'accumuler dans la cellule, entraînant une importante entrée d'eau dans le cytoplasme et par conséquent un œdème du tissu (Johann Pratschke et al. 2008). Ce n'est cependant pas tant l'ischémie qui est la plus délétère, mais plutôt la reperfusion du greffon qui est la phase inductrice des lésions dues à l'ischémie. Les processus de réparation, qui se développent durant plusieurs heures à plusieurs jours après l'ischémie, s'accompagnent également de nombreux mécanismes d'apoptose, d'autophagie et de nécrose. Comme l'apoptose requiert énergie et synthèse de protéines, elle se déclenche principalement après reperfusion.

La reperfusion est également responsable d'une activation importante de l'immunité innée, de la création d'un environnement pro-coagulant et de l'augmentation de l'immunogénicité du greffon. Comme la mort cérébrale, elle induit la surexpression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et le recrutement leucocytaire, en particulier de polynucléaires neutrophiles qui à leur tour vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires dans le greffon. Ce phénomène créant un gradient chimiotactique va ainsi initier le recrutement d'autres leucocytes. « La théorie du danger » de Matzinger pourrait être à l'origine de ce recrutement et de cette activation leucocytaire dans le phénomène de reperfusion (Kosieradzki et Rowiński 2008). Les signaux de danger pourraient être des ADN ou ARN du greffon, des protéines oxydées, des lipides ou de l'acide urique activant les différentes voies des TLRs, dont principalement la voie du TLR-4.

En transplantation rénale, le phénomène d'I/R prend une ampleur importante au-delà de 24h de conservation, justifiant une logistique importante pour réduire les temps de transplantation. La première conséquence du phénomène d'I/R est le retard de démarrage du greffon, défini par une insuffisance fonctionnelle de l'organe greffé. Enfin, l'I/R n'est pas délétère qu'au

début de la transplantation ; il existe une corrélation en greffe de rein entre son existence et des dysfonctions chroniques qui apparaissent à plus long terme (Johann Pratschke et al. 2008).

I.1.4. La réponse allogénique

La capacité du système immunitaire à reconnaître, par réactivité croisée des cellules ou des tissus d'un individu différent mais de la même espèce que l'hôte afin de l'éliminer, forme l'alloreconnaissance. Les principaux effecteurs cellulaires de la réponse immune contre des tissus allogéniques sont les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Après reconnaissance du complexe CMH/peptide des CPA, les lymphocytes T vont recevoir des signaux des CPA pour déclencher une réponse immune effectrice de type Th1 ou Th2 principalement. L'alloreconnaissance peut se faire selon deux mécanismes différents : la voie directe et la voie indirecte de présentation antigénique. Ces deux voies peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée ou non. Un nombre important d'études a proposé l'existence d'un troisième mécanisme d'alloreconnaissance, la voie semi-directe.

- 1.4.1. La présentation allogénique

La voie directe de présentation

L'alloreconnaissance directe est définie comme la reconnaissance, par des lymphocytes T du receveur (qu'ils soient CD4+ ou CD8+), de molécules intactes du CMH de classe I ou de classe II portées par des cellules étrangères, comme les CPA du donneur dans le greffon qui ont été activées par l'inflammation consécutive à la greffe et qui migrent alors vers les organes lymphoïdes du receveur (C Daniel et al. 1998). Les lymphocytes T CD4+ reconnaissent le complexe porté par les molécules du CMH de classe II exprimées de façon assez restreinte par les cellules impliquées dans la présentation (e.g. les CPA, les cellules endothéliales, les lymphocytes B ou lymphocytes T activés) ; tandis que les lymphocytes T CD8+ reconnaissent le complexe présenté par les molécules de CMH de classe I exprimées de façon quasi ubiquitaire (toutes les cellules sauf les globules rouges). Cette activation des lymphocytes par la voie directe a été mise en évidence dès 1976. Lafferty a ainsi montré que la déplétion des leucocytes passagers du greffon (CPA du donneur) par une culture *in vitro* préalable à la greffe peut prévenir le rejet (Talmage et al. 1976). *In vivo*, l'implantation du greffon dans un hôte intermédiaire permet d'en prolonger sa survie (J. R. Batchelor et al. 1979), alors que la reconstitution du greffon par injection de CPA du donneur restaure son immunogénicité (R I Lechler et J. R. Batchelor 1982). La réponse directe des lymphocytes T naïfs est générée dès les premiers jours après la transplantation. Son intensité est alors

déterminée par la fréquence des lymphocytes T spécifiques des molécules de CMH allogéniques (Lindahl et D. B. Wilson 1977). Plus tard, cette reconnaissance a été caractérisée comme étant le premier événement conduisant au rejet d'allogreffe (Sherman et Chattopadhyay 1993). L'importance de cette voie directe de présentation décroît au cours du temps au fur et à mesure que les CPA du donneur disparaissent. Lors d'une greffe cardiaque (van Besouw et al. 2005) ou rénale (R. J. Baker et al. 2001) chez l'homme, la fréquence des lymphocytes T présentant une allospécificité directe décroît au cours du temps. Cependant, la réponse directe peut être maintenue au cours du temps via l'endothélium du greffon. En effet, il a été montré que les lymphocytes T CD8⁺ peuvent être activés par la voie directe de présentation via les cellules endothéliales du greffon (Lodge et Haisch 1993; Epperson et J S Pober 1994; Kreisel, Krupnick, Gelman, et al. 2002) qui expriment notamment des molécules de costimulation (B7 pour la souris (Kreisel, Krupnick, Balsara, et al. 2002) et ICOSL pour l'homme (Klingenberg et al. 2005)).

La voie indirecte de présentation

Par la voie de présentation indirecte, des antigènes du donneur, en particulier les molécules de CMH, sont capturées par les CPA du receveur (suite à la destruction des cellules du donneur), puis apprêtées pour être présentées comme peptide aux lymphocytes T du receveur (K. Inaba et al. 1998). Ce mécanisme est la voie normale de présentation des antigènes lors de toute réponse immunitaire. En transplantation, cette alloreconnaissance indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique (Benichou et al. 1999; Peter S Heeger 2003) avant que son importance soit également démontrée dans le développement du rejet aigu d'allogreffe chez le rongeur (Fangmann et al. 1992) et chez l'homme (Z Liu et al. 1996). D'autres études ont montré que la voie indirecte de présentation peut, à elle seule, suffire à induire un rejet de greffe (Fluck et al. 1999). Il a également été montré que des receveurs déficients pour les molécules de classe I du CMH sont capables de rejeter une greffe de peau d'un donneur déficient pour le CMH de classe II. Dans ce cas, les lymphocytes T CD4⁺ du receveur peuvent reconnaître indirectement des peptides issus des molécules du CMH de classe I du donneur présentées par les molécules du CMH de classe II du receveur (Auchincloss et al. 1993). Plusieurs études cliniques ont mis en évidence que la fréquence des lymphocytes T activés par la voie indirecte de présentation augmentait au cours du temps chez les patients présentant un rejet chronique à la suite d'une greffe de cœur, de foie ou de rein (Hornick et al. 2000; Vella et al. 1997; Z Liu et al. 1996). La migration de cellules dendritiques (DC) du donneur dans les tissus lymphoïdes, étant une source d'antigène, est décrite pour générer cette

voie indirecte de présentation (Austyn et C P Larsen 1990). Enfin, d'après quelques études, les lymphocytes T CD8⁺ peuvent être activés par l'intermédiaire de la présentation croisée (Morón et al. 2004), où les molécules de CMH de classe I présentent des peptides non endogènes aux lymphocytes T CD8⁺ (M L Albert et al. 1998).

La voie semi-directe de présentation

L'existence d'un transfert de molécules intactes de CMH entre les cellules a été décrite par différentes études (J F Huang et al. 1999; Tsang et al. 2003). Les DC du receveur peuvent alors acquérir des molécules intactes de CMH de classe I ou de classe II provenant de cellules du donneur (*e.g.* dendritiques ou endothéliales) afin de stimuler de façon directe les lymphocytes T naïfs CD4⁺ ou CD8⁺. Les DC peuvent également, par cette troisième voie, présenter simultanément des molécules intactes de CMH de classe I du donneur aux lymphocytes T CD8⁺ par la voie directe, tout en présentant des peptides digérés et apprêtés aux lymphocytes T CD4⁺ par la voie indirecte. Enfin, les cellules endothéliales du receveur, qui recolonisent peu à peu l'endothélium du greffon, pourraient également activer les lymphocytes T CD8⁺ par ce mécanisme semi-direct. Par ailleurs, l'activation T par la voie directe peut notamment s'effectuer en dehors des organes lymphoïdes secondaires, probablement au niveau de la greffe elle-même (Baratin et al. 2004). Ainsi, il se pourrait que cette activation semi-directe puisse, elle aussi, se dérouler au niveau du greffon.

-1.4.2. L'activation lymphocytaire T

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

Signal 1 : Le signal antigénique

Le TCR α/β est composé d'une chaîne α et d'une chaîne β dérivées du réarrangement multiple des segments V, D et J nécessaires à la création d'un répertoire fonctionnel divers. Le TCR étant quasiment dépourvu de domaine intracytoplasmique, la transduction du signal suite à son interaction avec les molécules de CMH de classe I ou II de la CPA est fournie par l'intermédiaire de son association non-covalente avec le complexe CD3. Ce complexe est, quant à lui, constitué de 6 sous-unités : δ , γ et 2 sous unités ϵ et ζ , qui en plus des deux

chaînes α et β du TCR s'associent aux co-récepteurs CD4 ou CD8 qui déterminent le type de CMH (classe II ou I respectivement) reconnu par le TCR. L'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide est la première étape nécessaire à la formation de la synapse immunologique qui influence les signaux induits par le TCR. En effet, elle permet l'oligomérisation et la phosphorylation du CD3 par la protéine kinase p56Lck au niveau des domaines ITAM (A. Weiss et Littman 1994; Iwashima et al. 1994) afin d'enclencher la cascade de signalisation nécessaire à la transduction efficace du signal antigénique.

Signal 2 : Le signal de costimulation

La théorie du « second signal » date des années 1970 : tout d'abord décrite puis proposée comme modèle d'activation des lymphocytes B par Bretscher et Cohn en 1970 (Bretscher et Cohn 1970), elle fut rapidement proposée par Lafferty et Cunningham en 1975 pour expliquer également l'activation des lymphocytes T (Lafferty et Cunningham 1975). Ce second signal de costimulation est nécessaire à l'activation complète des lymphocytes T. En son absence, les lymphocytes T deviennent anergiques : incapables de répondre à une nouvelle stimulation (M K Jenkins et R H Schwartz 1987; Gimmi et al. 1993; Harding et al. 1992). Cette anergie peut être levée en court-circuitant le second signal par un apport exogène d'IL-2, composant majeur du troisième signal (Beverly et al. 1992). Ce signal de costimulation, fourni par un ensemble de molécules, augmente l'avidité de l'interaction TCR/CMH-peptide et amplifie le signal transduit par le complexe TCR-CD3. Enfin, les molécules de costimulation elles-mêmes transduisent un signal aux lymphocytes T, indépendamment du CD3 (Bjorndahl et al. 1989). Quatre grandes familles de molécules de costimulation sont décrites dans la littérature et de nouvelles molécules de costimulation sont découvertes régulièrement. Entre autres, sont distinguées la superfamille des immunoglobulines (dont CD28 et CTLA-4), la superfamille du TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor ; dont CD40L), la superfamille des intégrines (dont LFA-1, VLA-4) et la superfamille des TIM (T-cell Ig domain and mucin domain). Chacune d'entre elles étant composée de molécules de costimulation activatrices et régulatrices. Le **tableau 1** résume les principales molécules de ces superfamilles de costimulation impliquées dans l'activation lymphocytaire. Notre étude s'étant intéressée plus particulièrement à la voie CD28/B7/CTLA-4 de la superfamille des immunoglobulines, seule cette dernière sera détaillée ici.

	Récepteur	Ligand	Effet	Expression
Superfamille des Ig	CD28	CD80<CD86	Activateur	Constitutive
	CTLA-4	CD80>CD86	Inhibiteur	Inductible
	ICOS	ICOSL	Activateur	Inductible
	PD-1	PD-L1/PD-L2	Inhibiteur	Inductible
	B7H3	?	Inhibiteur	Inductible
	B7H4	BTLA(?)	Inhibiteur	Inductible
	LAG-3	MHC II	Inhibiteur	Inductible
Superfamille du TNFR	CD40L	CD40	Activateur	Inductible
	4-1BB	4-1BBL	Activateur	Inductible
	OX40	OX40L	Activateur	Inductible
	CD27	CD70	Activateur	Constitutive
	CD30	CD30L	Activateur	Inductible
	BTLA	HVEM	Inhibiteur	Inductible
	HVEM	LIGHT	Activateur	Constitutive
	TRANCE	RANK	Activateur	Inductible
	GITR	GITRL	Activateur	Constitutive
Intégrines	LFA-1	ICAM-1	Activateur	Constitutive
	VLA-4	VCAM-1	Activateur	Inductible
TIM	TIM-1	TIM-4	Activateur	Inductible
	TIM-3	galectin-9	Inhibiteur	Inductible

Tableau 1 : Liste non exhaustive des principales voies de costimulation du lymphocyte T.

Signal 3 : Le signal des cytokines

A la suite des signaux 1 et 2, les lymphocytes T progressent dans leur cycle cellulaire jusqu'à la mitose. Lors de ce processus, les signaux émanants des cytokines sont décisifs et déterminent le devenir des cellules. L'IL-2 joue notamment un rôle pivot en induisant des signaux de prolifération et de différenciation. C'est pourquoi son expression est finement régulée par les signaux émanant du TCR, de ses co-récepteurs et de certaines molécules de costimulation. Certaines molécules immunosuppressives, tels que la Cyclosporine A (CsA) ou le Tacrolimus (FK506), agissent en inhibant la calcineurine nécessaire à la synthèse d'IL-2, bloquant ainsi la prolifération des cellules alloréactives (Clipstone et G R Crabtree 1992).

-1.4.3. La phase effectrice

La réponse cellulaire

La réponse effectrice cellulaire varie selon le type de réponse Th (T helper) des lymphocytes T CD4⁺ générés durant la phase d'amplification de la réponse T. En effet, les lymphocytes T CD4⁺, véritables chefs d'orchestre des réponses immunes, jouent un rôle primordial dans le rejet d'allogreffe (Krieger et al. 1996). En fonction du phénotype des DC, du milieu cytokinique et de l'incompatibilité CMH, les précurseurs CD4 alloréactifs Th0 peuvent se différencier en cellules de phénotype Th1 ou Th2 principalement (Mosmann et Sad 1996). D'autres types de réponse Th sont maintenant décrits : les Th17 (dont l'implication en transplantation demeure encore obscure), les Th3 (cellules T régulatrices via l'IL-10 et le TGF- β) ou autres phénotypes régulateurs induits seront abordés dans la partie correspondante. Les cellules Th1 se développent sous l'influence de l'IL-12 et de l'IFN γ et produisent principalement de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2. Ces cytokines sécrétées provoquent la production d'IL-12 par les DC et la réactivité des lymphocytes T CD8⁺ qui vont également produire de l'INF- γ , générant une pression supplémentaire vers le phénotype Th1. Les macrophages et les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques jouent alors un rôle majeur dans cet environnement Th1. Les CD8, pouvant être activés de manière directe par la présentation du CMH du donneur, ont des actions cytotoxiques spécifiques de l'antigène. Ils peuvent détruire leurs cibles par divers mécanismes : l'interaction Fas/FasL (Rouvier et al. 1993) ou la sécrétion d'enzymes cytotoxiques comme Granzyme B ou les Perforines (Kägi et al. 1994, 1994) qui initient l'apoptose (mort cellulaire programmée) de leurs cibles. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également devenir cytotoxiques, exerçant leur activité de lyse notamment par l'interaction Fas/FasL (Kägi et al. 1996). La production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ favorise également l'activation et l'infiltration des macrophages qui contribuent de manière importante à la destruction de l'organe via la sécrétion de médiateurs oxydants et pro-inflammatoires (*i.e.* l'hypersensibilité retardée) (K. Kobayashi et al. 2001) (**Figure 1**).

En transplantation, la présence d'incompatibilités CMH de classes I et II favorise la réponse Th1 à cause de la reconnaissance simultanée du classe I et du classe II par les CD8 et les CD4. Les CD8 produisent alors l'IFN- γ nécessaire pour générer une réponse Th1 des CD4 activés par les voies directe et indirecte. Une réponse Th1 est également prédominante lors d'incompatibilités de classe I isolées, toujours due à la production d'IFN- γ par les CD8 activés agissant alors sur les CD4 activés de manière indirecte. En revanche, dans le cas d'incompatibilités CMH de classe II uniquement, l'absence de la composante CD8 et donc de l'IFN- γ , favorise l'orientation vers un environnement Th2 pour les CD4 activés par les voies

directe et indirecte (Le Moine et al. 2002). La réponse Th2 se développe notamment sous l'influence principale de l'IL-4 et conduit à la production d'IL-5, 6, 9, 10 et 13, qui vont contribuer directement à générer une réponse humorale, et à activer et recruter des éosinophiles qui exercent une action de destruction par dégranulation (**Figure 1**).

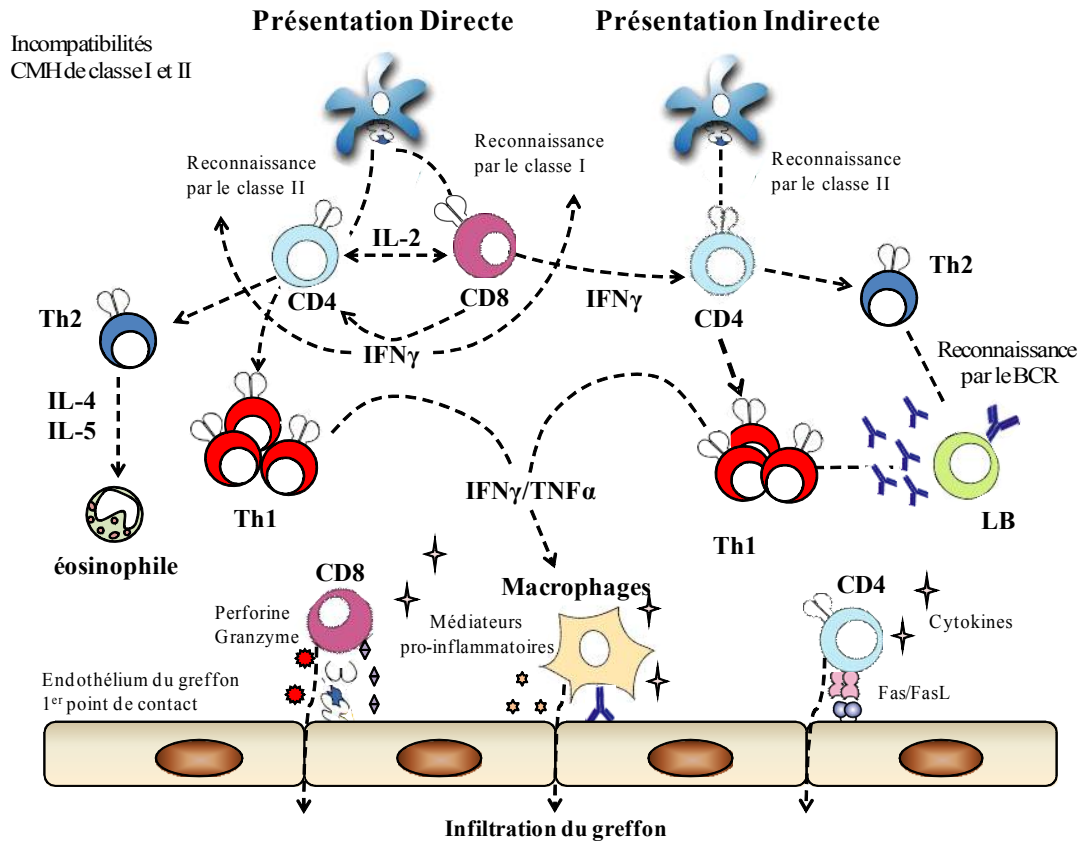


Figure 1 : Représentation schématique des réponses cellulaires en transplantation

La réponse humorale

Les lymphocytes B sont les cellules pivots de l'immunité humorale spécifique. Ils accomplissent cette fonction par l'intermédiaire du récepteur spécifique pour l'antigène qu'ils expriment à leur membrane, l'immunoglobuline de surface (sIg). Les lymphocytes B ne possèdent qu'une seule spécificité antigénique (un site anticorps unique) qui reste la même sur des isotypes différents. Le stade ultime de l'activation des lymphocytes B par leur antigène spécifique les différencie en plasmocytes dont la seule fonction est de sécréter un anticorps porteur du même paratope que l'sIg des lymphocytes B primordiaux.

En périphérie, les lymphocytes B naïfs vont rencontrer leur antigène spécifique dans le ganglion lymphatique au sein du follicule lymphoïde. Leur maturation finale nécessite la présence de cellules folliculaires dendritiques qui leur présentent l'antigène. Pour la majorité

des antigènes, il est nécessaire d'avoir également la collaboration d'une sous population particulière de lymphocytes T auxiliaires CD4+ dits Th2. Ces derniers interagissent avec les lymphocytes B qui leur présentent l'Ag par leurs molécules de CMH de classe II, l'interaction de molécules de costimulation (CD40/CD40L, ICOS/ICOSL et CD28/B7) et de cytokines qu'ils sécrètent (IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10). Cette différenciation a lieu dans le centre clair germinatif du follicule secondaire : par un mécanisme d'hypermutations somatiques, les centroblastes de la zone sombre augmentent la diversité et l'affinité de leurs sIg que leurs descendants (centrocytes) sélectionnent au contact de l'antigène dans la zone claire du centre germinatif, avant de donner naissance soit à des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit à des lymphocytes B de type mémoire.

Lors d'une première rencontre avec un antigène donné (réponse primaire) ou lors de la réintroduction du même antigène (réponse secondaire), la réponse diffère par le délai d'apparition, sa rapidité et son intensité, l'affinité et la classe des anticorps. La réponse anticorps secondaire apparaît après une phase de latence plus courte. Elle atteint un plateau de niveau plus élevé avec des anticorps d'affinité plus forte et de nature IgG principalement, alors qu'ils sont de classe IgM pour la réponse primaire (**Figure 2**). Ainsi les anticorps, qui sont les médiateurs de l'immunité humorale, remplissent leur rôle de défense grâce à quatre modes d'actions : la neutralisation des micro-organismes et de leurs toxines, l'opsonisation facilitant l'ingestion par les cellules phagocytaires, l'ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity), et surtout l'activation du complément (pour les IgM et IgG) conduisant à l'opsonisation et la lyse des cellules ciblées.

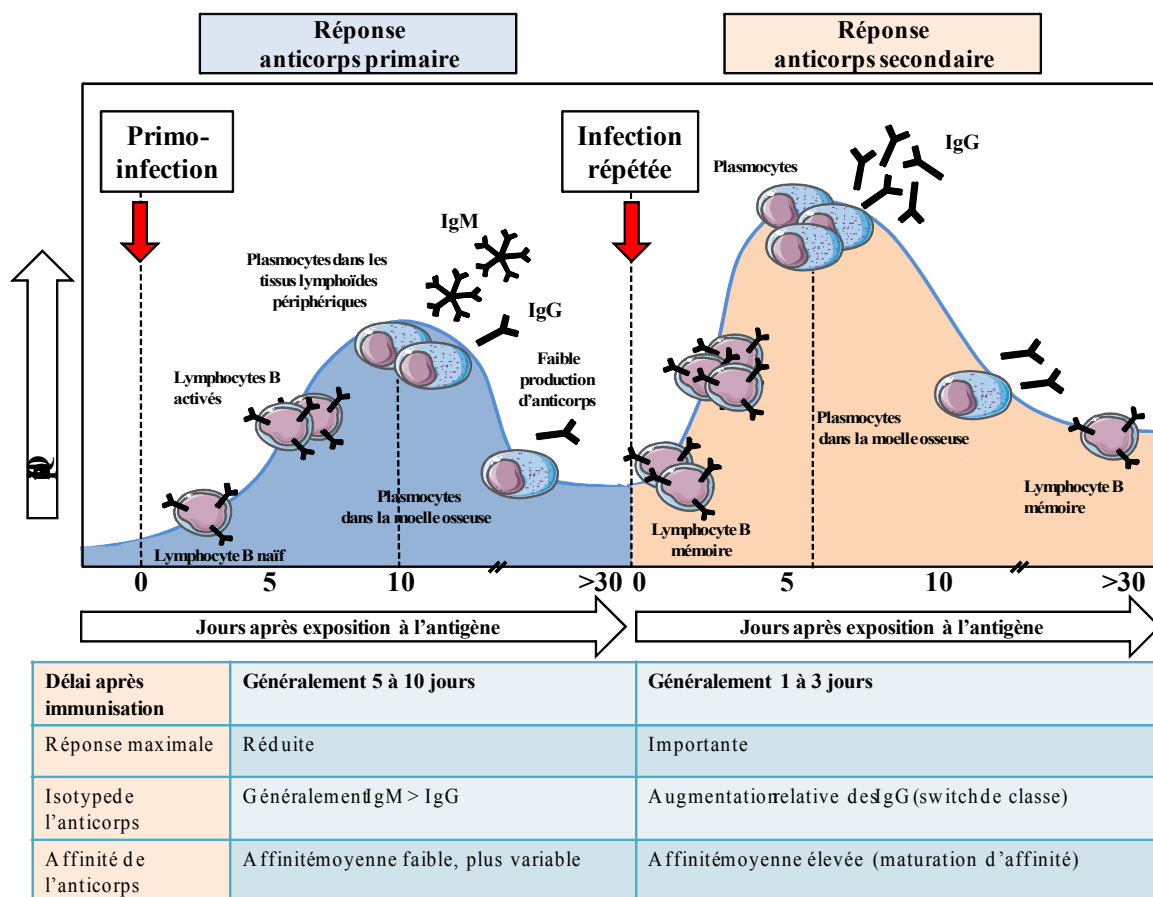


Figure 2 : Représentation schématique et principales caractéristiques des réponses humorales primaire et secondaire dans le temps.
(D'après Abbas, *Bases de l'immunologie Fondamentale*, 2005)

I.2- Le rejet d'allogreffe : de la Biologie à la Clinique.

La conséquence naturelle, d'une transplantation de cellules, de tissus ou d'organes entre individus de la même espèce mais génétiquement différents, est le rejet d'allogreffe. Si l'allotransplantation est devenue une réalité clinique, c'est bien parce que la recherche a su trouver des solutions pour inhiber/prévenir ces rejets d'allogreffe en se basant principalement sur les diverses phases de l'activation des lymphocytes T. L'inhibition du signal 1, 2, 3 ou déplétion plus ou moins totales des populations lymphocytaires sont autant d'outils qui ont permis à l'allotransplantation de contourner les lois de la Nature. Néanmoins, ces thérapeutiques ne sont pas toujours efficaces et ne permettent pas de prévenir ou de traiter tous les types de rejets auxquels peut être confronté un patient en cas d'échec thérapeutique ou d'incompliance.

I.2.1. Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu intervient seulement quelques minutes à quelques heures après une transplantation d'organe chez des patients dits hyperimmunisés. Le terme d'hyperimmunisés en allotransplantation se réfère à des individus ayant des titres élevés d'anticorps dirigés contre la majorité (>80%) des molécules du CMH de classe I ou II (HLA chez l'homme) (G M Williams et al. 1968). Ces anticorps ont généralement été induits par une précédente greffe, des transfusions sanguines ou une (des) immunisation(s) foeto-maternelle(s) (Sumitran 2000). Lors de la revascularisation, ces anticorps, s'ils reconnaissent leur cible sur l'endothélium, induisent l'activation de ce dernier. Celle-ci se traduit par l'acquisition rapide d'un phénotype pro-coagulant conduisant à une thrombose des vaisseaux. Par ailleurs, ces anticorps préformés activent également la voie classique du complément qui va agresser l'endothélium par des phénomènes de cytotoxicité induits par le complexe d'attaque membranaire (C5b-9) et de désorganisation du cytosquelette. Cliniquement, cette activation se traduit par de très violents rejets (parfois avant même que les chirurgiens n'aient refermé le patient) qui conduisent à l'arrêt brutal des fonctions du greffon et qui se caractérisent notamment par des lésions endothéliales, des thromboses capillaires et une nécrose hémorragique du greffon. En transplantation humaine, grâce aux travaux de Dausset et Terasaki en 1980, l'analyse systématique de la présence de ces anticorps avant la greffe (test de cross match) et la recherche de compatibilité HLA entre donneur et receveur ont permis de prévenir ce type de rejet, devenu rarissime. De fait, ces patients développant un grand nombre d'anticorps préformés, restent souvent sur liste d'attente sur une longue période jusqu'à obtention d'un greffon compatible. Des protocoles expérimentaux de désensibilisations offrent cependant quelques espoirs de greffer même dans un contexte de cross-match historique positif.

I.2.2. Le rejet aigu à médiation cellulaire

Hormis le rejet hyperaigu devenu exceptionnel, le rejet cellulaire est chronologiquement le premier type de rejet auquel est exposée une allogreffe. En absence de traitement immunosuppresseur, le rejet aigu à médiation cellulaire apparaît dans la semaine suivant la transplantation dans les modèles petits ou grands animaux, plus généralement durant les premiers mois suivant la transplantation chez l'homme sous immunosuppression. Ce rejet aigu à médiation cellulaire est dépendant de l'activation lymphocytaire T du receveur : CD4 auxiliaires et CD8 cytotoxiques (Auchincloss et al. 1993; Pietra et al. 2000). L'activation lymphocytaire T est amorcée à la suite de la reconnaissance d'antigènes alloréactifs dans les organes lymphoïdes secondaires et après revascularisation, au niveau de l'endothélium du

greffon (Lakkis et al. 2000). Le contexte proinflammatoire au niveau des cellules endothéliales du greffon (T Collins et al. 1984; J S Pober et Cotran 1990) va alors faciliter le recrutement de cellules T effectrices et de macrophages au niveau du site de l'inflammation. Suite à l'activation endothéliale, ces cellules envahissent alors le greffon et en altèrent directement son fonctionnement. De plus, l'activation de cellules cytotoxiques induit des phénomènes cytolytiques au sein du greffon via l'activation de la voie proapoptotique Fas/FasL et par l'exocytose de perforines et de granzymes (Kreisel, Krupnick, Balsara, et al. 2002). Tant que l'élément étranger déclenchant le rejet est reconnu, le processus inflammatoire perdure et l'infiltrat leucocytaire se densifie. Les lymphocytes B ne semblent pas directement jouer un rôle prépondérant dans ce type de rejet ; pourtant leur présence dans les biopsies semble corrélée avec les formes les plus sévères, constituant un facteur de mauvais pronostic de survie de la greffe (Sarwal et al. 2003). En clinique, le rejet aigu à médiation cellulaire est plus ou moins rapide et violent (suivant l'immunosuppression en cours) et se caractérise par une infiltration interstitielle, tubulaire (pour le rein) et vasculaire, plus ou moins dense de lymphocytes et de macrophages auxquels peuvent s'associer dans certains rejets de grade élevé des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles. Ce type de rejet est maintenant assez bien prévenu par les protocoles classiques d'immunosuppression (prévalence autour de 7 à 10%) et, en général, répond bien à son traitement par des bolus de corticostéroïdes. Globalement, le renforcement de l'immunosuppression (comme l'ajout de traitements lymphodépétants) est assez efficace.

I.2.3. Le rejet aigu à médiation humorale

-2.3.1. Physiopathologie

Un rejet à composante humorale peut survenir après quelques semaines à quelques mois après transplantation (Mohamed H Sayegh et Robert B Colvin 2003). Il associe, dans la plupart des cas, la présence d'anticorps cytotoxiques dirigés contre des antigènes du donneur et des lésions tissulaires particulières : atteintes de la microvascularisation avec des lésions de capillarite ou d'endothélite conduisant globalement à une souffrance des greffons évoluant vers des phénomènes de microthromboses et d'ischémie (Leventhal, Matas, et al. 1993). Dans la plupart des cas, les alloanticorps sont dirigés directement contre les molécules de CMH du donneur. Chez l'homme, ces alloanticorps sont le plus souvent des anticorps cytotoxiques dirigés contre des molécules du CMH de classe I ou moins fréquemment de classe II (30% des rejets à composante humorale) (Shamila Mauiyyedi et Robert B Colvin 2002). Enfin, des antigènes autres que le CMH (antigènes érythrocytaires du système ABO, antigènes mineurs

ou spécifiques du tissu) ont également été mis en évidence, mais de façon beaucoup plus anecdotique (Sumitran 2000).

La fixation des anticorps sur les cellules endothéliales active la voie classique du complément jusqu'à la formation du complexe d'attaque membranaire, le C5b-9. Il s'agit là d'un des mécanismes principaux de ces rejets dits « humoraux ». Il a également été montré que ces alloanticorps facilitent l'opsonisation des cibles pour les macrophages et les cellules NK (natural killer), qui grâce à leurs récepteurs de fragments Fc d'immunoglobulines, peuvent fixer et lyser les cellules endothéliales. Ce phénomène est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

L'endothélium joue également un rôle important dans cette physiopathologie. Son activation, notamment par des cytokines telles que l'IL-1 et l'IFN- γ , induit l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM), du facteur tissulaire et de l'inhibiteur de l'activité du plasminogène (PAI), entraînant un état globalement plus pro-coagulant et pro-inflammatoire de la cellule endothéliale. De plus, l'ischémie-reperfusion induit une stimulation des plaquettes, ainsi qu'une activation du complément (comme les anticorps) par la voie classique ou alterne, renforçant encore à l'activation de ces cellules endothéliales. Les cellules NK peuvent rompre l'intégrité de cet endothélium et aussi l'activer. Enfin, les alloanticorps seuls pourraient délivrer un signal activateur via les intégrines des cellules endothéliales (Saadi et al. 2004). D'autres mécanismes pathogéniques impliquent l'apoptose de la cellule endothéliale, induite par l'ischémie, des cytokines ou des cellules inflammatoires, causant ainsi la libération de cellules endothéliales de leur matrice dans la circulation (éléments inflammatoires dans le sang). Cette perte de l'intégrité vasculaire expose la matrice sous-endothéliale à la coagulation. Enfin, l'apoptose prive l'endothélium de ses fonctions normales telles que l'inhibition de la coagulation et de l'inflammation (Z. E. Holzknicht et al. 2002). Une représentation de cette physiopathologie de rejet « humoral » est illustrée en **Figure 3**.

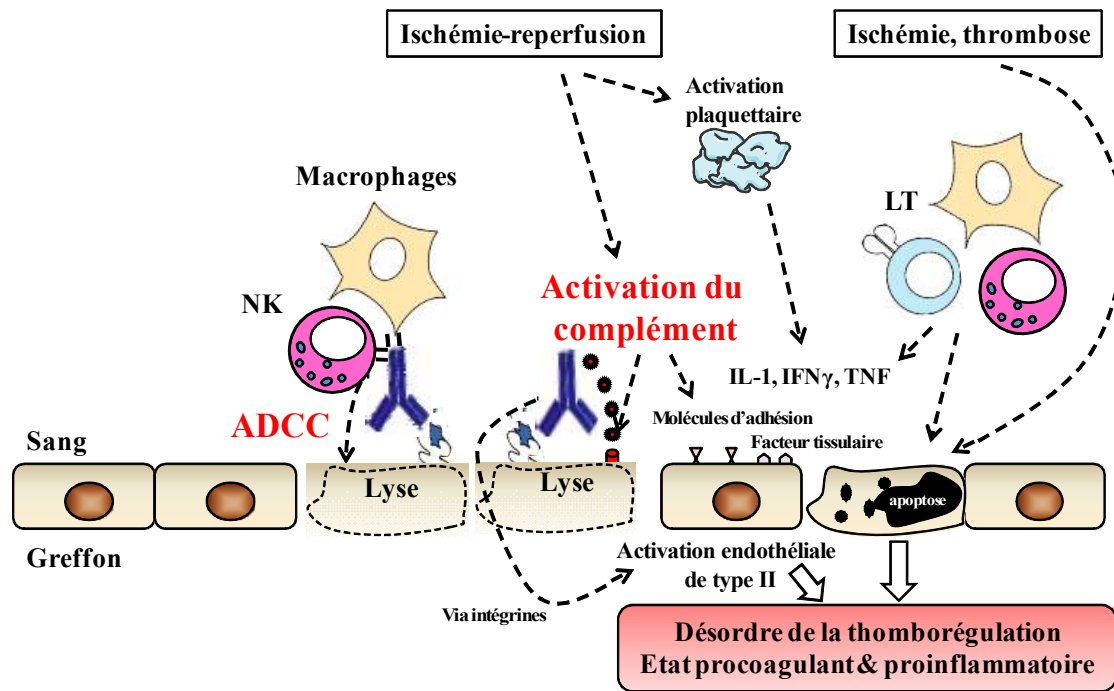


Figure 3 : Représentation schématique de la physiopathologie du rejet aigu à composante humorale.

-2.3.2. Diagnostic histologique

Le rejet humoral aigu s'accompagne, le plus souvent, de lésions hémorragiques, de thromboses intra-vasculaires, d'atteintes endothéliales à type d'endothélite avec une infiltration sous endothéliale d'éléments lymphocytaires activés, de macrophages activés, de polynucléaires neutrophiles, et de lésions de nécrose avec œdème et lyse de la membrane cellulaire (McCarthy et Ian S D Roberts 2002). Contrairement au rejet aigu à médiation cellulaire où l'on retrouve un infiltrat interstitiel cellulaire massif, dans le rejet aigu à composante humorale, l'infiltrat cellulaire se limite le plus souvent à la périphérie des vaisseaux. Au niveau immuno-histologique, la médiation humorale de ces rejets se révèle notamment par le dépôt de facteurs de dégradation du complément au sein du greffon, tels que le C3c et surtout le C4d (devenu le marqueur histologique majeur dans les capillaires péri-tubulaires (CPT), en association avec la présence d'anticorps anti-donneur circulants) (K Solez et al. 2008). En clinique, le C5b-9 de même que les IgM et IgG sont peu recherchés car ils sont rarement positifs du fait de leur rapide élimination des surfaces cellulaires.

-2.3.3. Données cliniques

L'amélioration des traitements immunosuppresseurs des 30 dernières années (basés essentiellement contre les lymphocytes T) n'a eu que peu d'impact sur ce type de rejet, dont l'incidence demeure constante (2 à 5% en transplantation rénale), avec une réversibilité très inconstante et un mauvais impact sur le pronostic (27-40% de perte de greffon à 1 an) (Lorraine C Racusen et al. 2003; K Solez et al. 2008). Parmi toutes les stratégies, il est possible d'extraire les alloanticorps circulants par des plasmaphérèses ou immunoadsorption tout en exerçant un contrôle renforcé de leur production (anti-CD3, IVIg fortes doses et optimisation de l'immunosuppression de base) (Moll et Manuel Pascual 2005). La plasmaphérèse et/ou IVIg (pool d'anticorps polyclonaux permettant entre autre de bloquer le complément en fixant certains facteurs, de moduler les alloanticorps et d'en faire chuter le titre, d'induire de l'apoptose des lymphocytes B, ...) peuvent être également utilisés pour « désensibiliser » les patients préimmunisés (Gloor et al. 2008). Plus récemment, la déplétion des lymphocytes B par un anti-CD20 (Y. T. Becker et al. 2004), avec ou sans protocole de désensibilisation, a permis d'améliorer le traitement de ce rejet en dépletant les lymphocytes B circulants, mais aussi empêchant leur présentation de l'antigène aux lymphocytes T. Néanmoins, cette nouvelle stratégie spécifique des lymphocytes B ne permet pas de traiter tous ces rejets humoraux, avec des rejets réfractaires, probablement dus à des lymphocytes B mémoires et des plasmocytes à longue demi-vie dans la moelle osseuse (ces deux types cellulaires n'expriment plus le CD20). Certains groupes américains proposent la splénectomie comme thérapie de secours sur certains rejets réfractaires pour éliminer la majorité du pool de lymphocytes et potentiellement de certains plasmocytes (Locke et al. 2007).

Malgré les thérapeutiques immunosuppressives conventionnelles, en cas de rejet aigu humoral, le taux de survie des greffes à 1 an oscille entre 50% et 70% dans la plupart des centres (M Crespo et al. 2001). Il est donc devenu crucial d'innover dans les thérapies contre ce rejet médié par les anticorps ; d'autant plus que ces alloanticorps semblent également être impliqués dans le rejet chronique et ne se limitent pas qu'aux patients pré-sensibilisés (Shamila Mauiyyedi et al. 2002). En effet, toutes les stratégies proposées s'intéressent principalement à diminuer le titre en alloanticorps ou à dépleter les cellules les produisant. Aucune stratégie ne s'intéresse vraiment à bloquer le bras effecteur de ce rejet humoral aigu, notamment l'activation de la voie classique du complément. Seules les IVIG à très fortes doses ont un effet inhibiteur sur l'activation du complément *in vitro* (J. Watanabe et Scornik 2005).

I.2.4. Dysfonction chronique d'allogreffe

La dysfonction chronique du greffon à long-terme, longtemps appelée sous le terme générique de rejet chronique puis de vasculopathie chronique d'allogreffe (CAV), est caractérisée par une destruction lente, progressive et irréversible des structures et fonctions du greffon. Au cours de ces dernières années, elle est devenue une des causes principales de retour en dialyse. De physiopathologie toujours mal définie, la dysfonction chronique du greffon ne répond que faiblement aux traitements immunosuppresseurs, renforçant l'idée que réponses immunes et non immunes se cumulent pour altérer le greffon. Diverses études par biopsies de greffons développant des dysfonctions chroniques ont permis de mieux les caractériser histologiquement, ainsi qu'en atteste la nouvelle classification de Banff pour le rein (K Solez et al. 2008). Ainsi, le CAV est subdivisé en deux parties : le rejet chronique actif médié par les anticorps (RC) et la néphropathie chronique du transplant. Le RC est défini par la présence d'anticorps anti-HLA spécifiques ou non du donneur et de produits issus de l'activation du complément au sein du greffon, comme le C4d. Histologiquement, ce RC est également associé à divers signes de souffrance chronique : glomérulopathie d'allogreffe (dédoublé de la membrane basale du glomérule) et/ou épaissement fibreux de l'intima des artères et/ou des capillaires péri-tubulaires (CPT) multicouches et/ou fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (FI/AT). Ce RC doit être distingué, en pratique clinique, de la néphropathie chronique du greffon ou FI/AT, qui est la résultante de lésions non immunologiques, comme l'hypertension artérielle chronique, la toxicité des inhibiteurs de la calcineurine (CNI), des pyélonéphrites bactériennes ou infections virales, ...

Cette nouvelle classification, qui prend en compte les aspects non immunologiques (précédemment cités) et immunologiques (comme les alloanticorps et l'activation du complément), ne prend cependant pas en compte la composante cellulaire dans ce rejet chronique actif. Pourtant, de nombreuses études expérimentales chez le rongeur démontrent l'importance des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, et notamment, de la voie de présentation indirecte de l'antigène (Benichou 1999). Par ailleurs, la diminution de Treg en périphérie semble également être corrélée au développement de ces lésions chroniques, alors qu'elles ne sont pas augmentées chez les patients opérationnellement tolérants par rapport à des individus sains (Stéphanie Louis et al. 2006). Enfin, de nombreuses études mettent en évidence le rôle du blocage de la costimulation (notamment de la voie CD28/B7) et l'absence de développement de rejet chronique chez le rongeur (Haspot et al. 2005; Guillonnet et al. 2005).

I.3- La tolérance

La tolérance immunologique se caractérise par l'absence de réactivité spécifiquement vis à vis d'antigènes particuliers. Chez les individus normaux, ces antigènes sont ceux du soi et la rupture de cette tolérance aboutit au développement de l'autoimmunité. Dans le cas de l'allogreffe, le développement d'une tolérance permet, par un hôte immunocompétent (capable de répondre à d'autres antigènes), l'acceptation sur le long cours du greffon malgré l'interruption du traitement immunosuppresseur. L'obtention d'un état de tolérance devrait permettre, chez l'homme, de supprimer les traitements immunosuppresseurs dont l'usage à long terme a de nombreux effets secondaires et de prévenir le rejet chronique. Un état de tolérance a été décrit chez de rares patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur à cause d'une non compliançe ou de l'apparition d'un cancer. L'induction de la tolérance a été initialement décrite dans les années 1960 (MEDAWAR 1961; Brent et Medawar 1967; Gowans 1977). Aujourd'hui, deux types de tolérance sont définis : la tolérance centrale et la tolérance périphérique qui regroupe elle même plusieurs mécanismes.

I.3.1. La tolérance centrale

La possibilité que les lymphocytes T développent une réponse immune dépend de la capacité de son récepteur, le TCR, à reconnaître un antigène présenté par une molécule de CMH du soi. Le thymus joue un rôle important dans la génération du répertoire lymphocytaire T (MILLER 1961; M J Bevan 1977) et donc dans l'induction de tolérance. A leur arrivée dans le thymus, les précurseurs des lymphocytes T, les thymocytes, subissent deux types de sélection : la sélection positive et la sélection négative. Les thymocytes double positifs (CD4+ et CD8+) sont tout d'abord sélectionnés positivement (environ 5% des cellules (G. Anderson et al. 1998)) selon la capacité de leur récepteur à reconnaître avec une affinité moyenne les complexes CMH-peptide du soi présentés par les cellules épithéliales corticales du thymus (Hogquist et M J Bevan 1996). Selon la classe du CMH que leur TCR a pu lier, les thymocytes double-positifs perdent l'un des deux marqueurs et deviennent simple-positifs. Les cellules ne reconnaissant aucun complexe ne recevront pas de signal de survie et meurent par apoptose. Les clones autoréactifs, ayant un TCR de haute affinité pour les complexes CMH/peptides, sont ensuite éliminés par une sélection négative afin d'éviter le déclenchement de maladies auto-immunes par ces cellules. Le processus de maturation se poursuit ensuite dans la médulla et est accompagné de la délétion de cellules autoréactives ayant échappé à la sélection négative dans le cortex (Kyewski et Derbinski 2004).

Outre l'élimination des clones autoréactifs permettant d'induire une tolérance aux molécules du soi, la médulla favorise également la sélection positive de cellules T régulatrices naturelles CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Shimon Sakaguchi 2004; N. Watanabe et al. 2005). Les cellules épithéliales médullaires permettent le développement des cellules T régulatrices (Treg) en favorisant l'expression de Foxp3 dans les thymocytes doubles positifs de façon dépendante des signaux via CD28 (Shimon Sakaguchi 2005; Aschenbrenner et al. 2007; Shimon Sakaguchi et al. 2008). Une étude a suggéré que l'expression des ligands de CD28 (les molécules CD80 et CD86) n'était pas restreinte à la zone médullaire du thymus et qu'elle s'étendait aussi aux cellules épithéliales du cortex rendant la localisation de la sélection positive des Treg incertaine (Daniel H D Gray et al. 2006).

En transplantation, une tolérance centrale peut être obtenue à la suite du développement d'un chimérisme hématopoïétique, correspondant à la colonisation du thymus par des cellules hématopoïétiques du donneur qui vont participer à la sélection du répertoire lymphocytaire (Goldrath et M J Bevan 1999). Les thymocytes capables de reconnaître les auto-antigènes, mais également les antigènes du donneur, comme éléments du soi meurent ainsi par apoptose suite à la sélection négative dans le thymus. De nombreuses études montrent ainsi que l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique en allotransplantation conduit à un état de tolérance immunologique, non seulement chez le rongeur, mais aussi chez le porc, le primate et chez l'homme (M Sykes et D H Sachs 1988; T Kawai et al. 1995; Bühler et al. 2002; Tatsuo Kawai et al. 2008). Cependant, les applications cliniques restent limitées et peu développées, notamment en raison de la toxicité des traitements d'induction (greffe de moelle combinée, irradiation totale ou thymique, ...).

I.3.2. La tolérance périphérique

L'étude du développement du répertoire cellulaire T chez des souris thymectomisées a permis de démontrer que les lymphocytes T peuvent également subir une sélection négative en dehors du thymus (Colson et al. 1999). En effet, des cellules T potentiellement autoréactives échappent aux mécanismes de tolérance centrale, car de nombreux antigènes sont absents ou présents en quantité insuffisante dans le thymus. Ainsi chez l'homme, des lymphocytes T sanguins d'individus « normaux » capables de répondre *in vitro* contre des auto-antigènes, telle la protéine basique de la myéline sont retrouvés. Pour ne pas générer de pathologies autoimmunes, ces cellules peuvent être sujettes à divers mécanismes de tolérance périphérique dans les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 4**).

-3.2.1. L'ignorance

L'ignorance immunologique correspond à une absence de réponse des lymphocytes T vis à vis d'antigènes pour lesquels ils possèdent cependant un TCR fonctionnel. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine du phénomène d'ignorance. Ainsi, une barrière anatomique engendre la non reconnaissance d'antigènes (ou à de faibles taux, insuffisant pour engendrer une activation) par les lymphocytes T. Dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris en absence d'organes lymphoïdes secondaires, la rencontre entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques ne se fait pas. L'ignorance s'installe et favorise la tolérance (Lakkis et al. 2000). De même, l'encapsulation d'îlots pancréatiques de porc dans une membrane d'alginate semi-perméable permet une survie du xénogreffon supérieur à 6 mois chez le primate en absence d'immunosuppression (Dufrane et al. 2006). Par ailleurs, les antigènes peuvent être séquestrés dans des sites immunologiquement privilégiés d'organes vitaux où une réaction inflammatoire pourrait s'avérer délétère (*e.g.* le cerveau, la chambre antérieure de l'œil ou les testicules). Enfin, l'ignorance est un des plus vieux mécanismes naturels, sélectionné et conservé par la nature, de tolérance foeto-maternelle chez les insectes, les arachnides, les poissons, les amphibiens, les reptiles, les oiseaux, mais aussi l'ornithorynque et l'échidné (seules exceptions des mammifères).

-3.2.2. La délétion

Bien qu'essentielle dans le thymus, la délétion clonale des cellules alloréactives peut également avoir lieu en périphérie par plusieurs mécanismes. Ainsi, l'interaction TCR-CMH/peptide en absence de signaux de costimulation peut induire l'anergie mais également l'apoptose des cellules T (Ferber et al. 1994). De même, l'absence de facteur de croissance durant une activation T peut également conduire à l'apoptose des lymphocytes (Förster et al. 1995), alors que de fortes concentrations d'IL-2 peuvent programmer la mort cellulaire des lymphocytes T par AICD (Activation Induced Cell Death) à la suite de stimulations répétées par le même antigène. L'AICD peut également survenir lors de stimulations par de fortes concentrations en antigène chez les lymphocytes T CD8⁺ (Alexander-Miller et al. 1996) ou CD4⁺ (Liblau et al. 1994) et par un mécanisme mettant essentiellement en jeu la voie Fas/FasL (Dhein et al. 1995). Cette voie Fas/FasL est par ailleurs un des mécanismes impliqués dans la tolérance foeto-maternelle chez l'homme où les trophoblastes (qui expriment FasL) peuvent induire une apoptose des lymphocytes T maternels activés (qui expriment Fas) (Makrigiannakis et al. 2001). D'autres mécanismes de délétion en périphérie existent également, puisqu'une tolérance à l'allogreffe cardiaque, mettant en jeu un

mécanisme de délétion clonale en périphérie, peut également être induite chez des souris déficientes pour la molécule Fas (X C Li et al. 1999). C'est, par exemple, le cas de la délétion par les Treg, qui au lieu d'inhiber l'activation d'autres lymphocytes T, peut les éliminer via la sécrétion de granzyme B ou de perforine (Q. Tang et Jeffrey A Bluestone 2008). Enfin, ces mécanismes de délétion clonale en périphérie sont également à la base de certaines stratégies thérapeutiques. C'est le cas notamment des anticorps anti-CD40L, puisqu'une forme modifiée du Fc (empêchant l'activation du complément) n'a plus d'effet dans la greffe de rein ou d'îlots chez la souris et le primate (Monk et al. 2003; Ferrant et al. 2004) ; mais également de certains anti-CD28 agoniste induisant une apoptose sélective des lymphocytes T activés par un mécanisme dépendant de l'IFN- γ (Yu et al. 2004).

-3.2.3. L'anergie

L'anergie est caractérisée par l'incapacité des lymphocytes T activés par un antigène à proliférer lorsqu'ils sont restimulés par celui-ci (M K Jenkins et R H Schwartz 1987). Cet état anergique peut résulter soit d'une absence d'un signal de costimulation lors de l'engagement du TCR, soit d'une altération du signal transmis par le TCR (Sloan-Lancaster et al. 1996). L'anergie peut également nécessiter l'expression de CTLA-4, puisque son absence rend les cellules résistantes à l'induction d'anergie (R J Greenwald et al. 2001), et peut être levée *in vitro* et *in vivo* par un apport exogène d'IL-2 (Ronald H Schwartz 2003). L'anergie n'est pas un phénomène passif, puisque des cellules anergiques peuvent inhiber la prolifération de cellules naïves de façon contact-dépendante *in vitro* (J G Chai et al. 1999) et retarder, après injection, le rejet de greffe d'îlots ou de peau chez la souris (J G Chai et al. 1999; Luo et al. 2000). Enfin, l'interaction de ces cellules anergiques avec des cellules dendritiques diminue la capacité de ces dernières à présenter l'antigène (diminution de l'expression du CMH et des molécules B7), les rendant ainsi tolérogènes (Vendetti et al. 2000; Loredana Frasca et al. 2002). L'anergie est par ailleurs à la base de quelques (peu) stratégies thérapeutiques, comme le transfert de lymphocytes T allogéniques rendus anergiques *in vitro* par le blocage de B7 sur les APC du donneur, qui induit une tolérance à une allogreffe rénale chez le primate après une courte induction par une immunosuppression classique (Bashuda et al. 2005).

-3.2.4. Régulation/suppression et modulation

La tolérance périphérique peut être induite par des cellules suppressives inhibant l'activation ou les fonctions effectrices de ces cellules voisines. Parmi ces cellules suppressives, les cellules T régulatrices (Treg) naturelles et induites, toutes les deux CD4+CD25+Foxp3+, constituent les populations les plus étudiées. Certaines populations de cellules peuvent également moduler l'action d'autres cellules. C'est par exemple encore le cas des Treg qui, via l'interaction de leur CTLA-4 (exprimé de façon constitutive à leur surface) avec son récepteur B7, peuvent induire l'expression de IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) dans les CPA (Francesca Fallarino et al. 2003). Cette expression d'IDO a pour conséquences directes de priver le microenvironnement en tryptophane nécessaire à l'activation T et de rendre les CPA tolérogéniques (Andrew L Mellor et Munn 2004). Ces Treg peuvent en outre induire une sous-expression de B7 sur les CPA, encore une fois par CTLA-4, les rendant ainsi immatures et tolérogéniques ou non-immunogéniques (Wing et al. 2008). Enfin, bien d'autres mécanismes impliquant HO-1 (Heme Oxygenase 1), LAG-3 (Lymphocyte-Activation Gene 3), PDL-1 ou encore HLA-G ont été largement décrits dans la tolérance allogénique (Q. Tang et Jeffrey A Bluestone 2008). Nombre de ces mécanismes ont par ailleurs été sélectionnés puis conservés depuis plusieurs millions d'années par la nature dans la tolérance fœto-maternelle (greffe semi-allogénique) chez les mammifères. Y figurent notamment l'expression placentaire de HLA-G inhibant l'action cytolytique des cellules NK par les récepteurs KIR (P. Moreau et al. 1998), d'IDO inhibant les lymphocytes T, et surtout un rôle majeur des Treg maternelles mais également celles du fœtus. En effet, la déplétion des Treg chez des souris gestantes induit le rejet de la plupart des fœtus (Aluvihare et al. 2004; Darrasse-Jèze et al. 2006), alors que récemment chez l'homme des cellules maternelles traversant le placenta pour résider dans les ganglions du système immunitaire fœtale ont été décrites. Elles induisent la génération de Treg chez le fœtus qui à leur tour inhibent les réponses fœtales dirigées contre la mère ; phénomène qui persiste au moins jusqu'à l'adolescence (Mold et al. 2008).

Les modes d'actions et rôles physiologiques de ces populations régulatrices/modulatrices seront plus amplement décrits dans la suite de cette introduction.

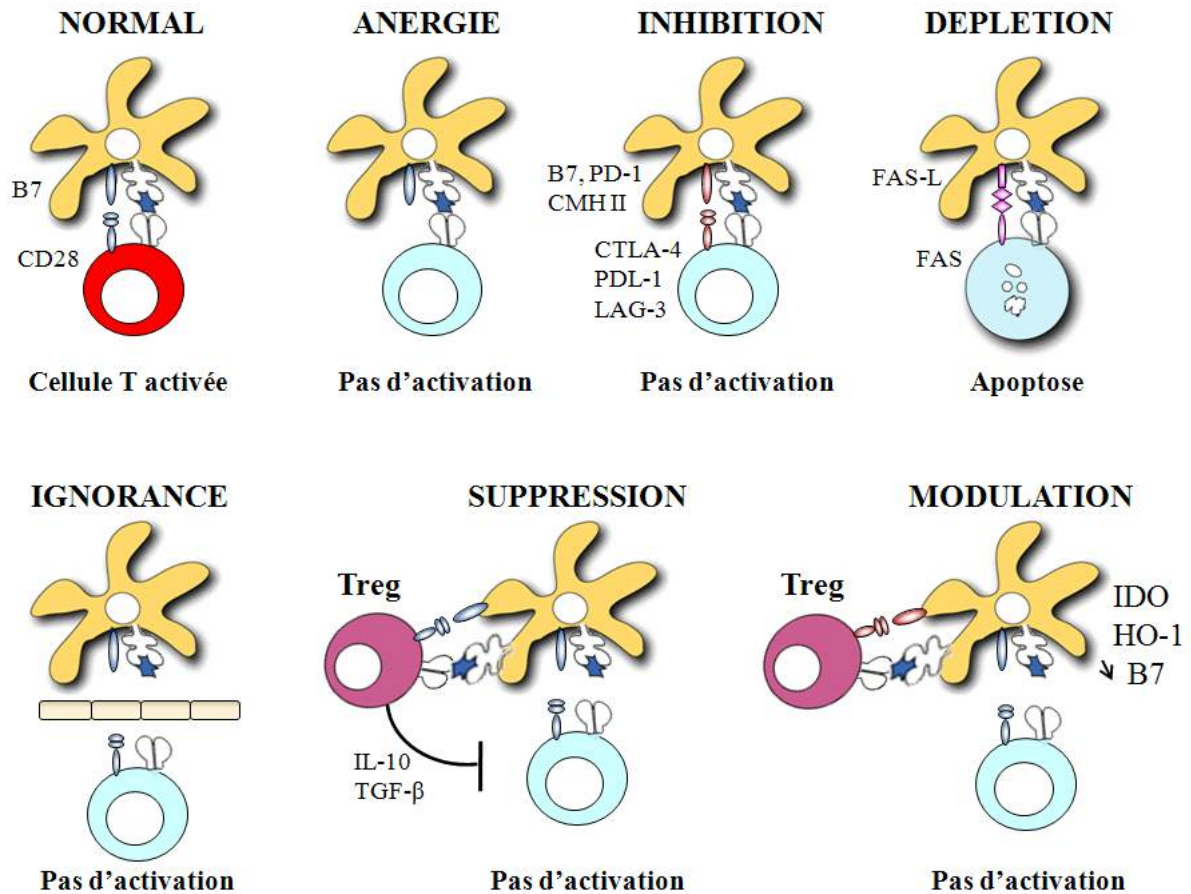


Figure 4 : Les divers mécanismes de tolérance périphérique. (D'après (Kamradt et Mitchison 2001))

I.3.3. Transposition aux modèles grands animaux

De nombreuses stratégies thérapeutiques sont capables d'induire un état de tolérance à un greffon dans divers modèles rongeurs. En revanche, très peu ont montré une telle efficacité dans les modèles chez le primate non-humain, et aucune n'est reproductible à 100% dans ces modèles grands animaux. Ceci demeure un problème majeur pour la recherche en transplantation, car même si l'utilité de ces modèles petits animaux est fondamentale, leur manque de prédictivité et de transposition aux modèles primates ou situations cliniques en limite leur portée. Divers facteurs différentiels expliquent cette discordance entre petits et grands modèles. Une première différence peut venir du choix du modèle : l'allogreffe implique certes de manière importante la reconnaissance des molécules de CMH de classe I et II, elle ne peut se résumer à cette différence antigénique. Or, certains modèles rongeurs en transplantation utilisent des donneurs et receveurs génétiquement identiques, sauf pour les molécules du CMH (par exemple : Lewis 1W sur Lewis 1A). Or les situations cliniques sont généralement l'inverse : les individus sont génétiquement complètement différents (hormis le

cas des greffes familiales), mais le minimum d'incompatibilité HLA entre le donneur et le receveur est recherché. Le rôle des antigènes mineurs d'histocompatibilité n'est donc pas abordé dans ces modèles.

Par ailleurs, une différence fondamentale entre les rongeurs élevés dans un environnement sans pathogènes (qui sont en plus souvent de jeunes animaux) et des primates élevés en plein air ou des patients en clinique (le plus souvent âgés), est l'histoire de leur système immunitaire et l'exposition préalable ou non à des pathogènes. En effet, les cellules mémoires, ayant un seuil d'activation particulièrement faible, répondent plus rapidement à une restimulation, parfois même en dehors des zones lymphoïdes et selon certaines de manières indépendantes de la costimulation. Elles expriment également plus de récepteurs cytokiniques et de molécules anti-apoptotiques (Lanzavecchia et Sallusto 2000). Ces cellules T mémoires sont relativement peu nombreuses à la naissance, mais elles s'accumulent ensuite avec l'âge pour atteindre chez certains adultes jusqu'à 40-50% du pool de lymphocytes T périphériques (Adams et al. 2003). Un taux comparable de cellules mémoires accumulées a été mesuré chez des macaques rhésus captifs à l'âge de 2-3 ans (Pitcher et al. 2002). Il est maintenant bien établi qu'une exposition au préalable du système immunitaire à divers pathogènes et la mémoire résultante influencent les futures réponses immunes et autoimmunes (diabète, sclérose en plaque) par un phénomène nommé « immunité hétérologue » (R. M. Welsh et Selin 2002). Celui-ci comprend deux principaux mécanismes : la cross-réactivité du TCR et/ou l'activation non-spécifique « bystander ». Dans ce contexte, les lymphocytes T alloréactifs ne sont donc plus naïfs, mais avec un phénotype mémoire au moment de la transplantation plus difficile à contrôler. En effet, une simple infection ou un épisode viral après transplantation peut réactiver les clones alloréactif. Enfin, une différence entre les rongeurs et les grands animaux pouvant expliquer les différences de réponses en allotransplantation est l'absence d'expression du CMH de classe II par les cellules endothéliales de rongeurs alors que celles des primates ou de l'homme l'expriment constitutivement (David H Sachs 2003). Ces molécules du CMH de classe II sont de forts stimulateurs des CD4 dans les processus de rejet. Ainsi, le groupe de David Sachs a pu montrer avec des lignées de mini-porcs identiques pour le CMH de classe II qu'un court traitement avec de la Cyclosporine permet l'induction de tolérance de manière uniforme (B R Rosengard et al. 1992).

I.3.4. Tolérance clinique dite « opérationnelle »

Malgré les développements importants de l'industrie pharmaceutique en termes d'immunosuppresseurs, réduisant considérablement les risques de rejets aigus et prolongeant la survie des greffons, aucun traitement à l'heure actuelle ne prévient à 100% le développement du rejet chronique actif. Comme noté précédemment, l'induction reproductible de tolérance fait toujours défaut chez l'homme. La tolérance opérationnelle se définit chez l'homme par le maintien d'une fonction stable du greffon, sans signe de dysfonction chronique, en absence de tout traitement immunosuppresseur accompagnée d'une réponse immunitaire compétente (Ansari et Mohamed H Sayegh 2004). Etant donné que l'accès à la biopsie n'est pas toujours réalisable, l'état de tolérance opérationnelle ne repose pas systématiquement sur une définition histologique du greffon mais sur des critères fonctionnels (*e.g.* la créatininémie et la protéinurie). La prévalence de la tolérance opérationnelle dépend du type d'organe transplanté : si dans la transplantation hépatique, environ 20-25% de patients inclus dans un protocole de sevrage des immunosuppresseurs se révèlent être spontanément tolérants (Martínez-Llordella et al. 2007), en transplantation rénale les cas sont beaucoup plus rares. En fait, il n'existe pas encore de protocole de sevrage thérapeutique programmé ; la majorité de cas d'arrêt total des immunosuppresseurs est due à la non-compliance des patients ou parfois à la suite d'une toxicité des traitements à long terme (Ashton-Chess et al. 2006).

Diverses études au laboratoire ont étudié ces patients opérationnellement tolérants dans la greffe rénale (petite cohorte) et les ont comparés à des patients « stables », en rejet chronique prouvés ou des individus sains. Ceci a notamment permis d'identifier une signature transcriptionnelle dans le sang de l'état de tolérance (Sophie Brouard et al. 2007). L'analyse du sang de ces patients ne montre aucune accumulation des transcrits de cytokines inflammatoires dans les clones cellulaires T (Sophie Brouard et al. 2005) et présente un taux normal de Treg (Stéphanie Louis et al. 2006) avec un effet suppresseur normal (Braudeau et al. 2007). A la suite d'une vaccination contre la grippe, les réponses cellulaires et humorales de ces patients ne semblent également pas différentes de celles développées chez des individus sains (C Ballet et al. 2006). Ils développeraient un phénomène de tolérance naturelle absent chez les patients en rejet chronique, qui ont moins de Treg en périphérie et plus de cellules mémoires que les patients stables, tolérants ou individus sains (Stéphanie Louis et al. 2006; Baeten et al. 2006).

II- La costimulation

Ainsi que nous l'avons évoqué dans la première partie de cette introduction, il existe différentes familles de molécules de costimulation composées chacune de molécules ayant une action activatrice ou régulatrice (**tableau 1**). Notre étude expérimentale porte sur la molécule CD28 de la superfamille des immunoglobulines (glycoprotéines transmembranaires avec un ou plusieurs domaines immunoglobulines extracellulaires et un court domaine intracytoplasmique permettant la transduction du signal) et nous décrivons donc plus particulièrement la voie de CD28/B7/CTLA-4, afin de mieux comprendre les divers mécanismes que régule ce trinôme.

II.1- La voie CD28/B7/CTLA-4/...

Cette voie fut longtemps considérée comme fonctionnant en trinôme : CD28 (costimulateur) et CTLA-4 (coinhibiteur) sont tous les deux les ligands des molécules de B7 (CD80 et CD86) sur les CPA. CTLA-4, étant surexprimé après activation et ayant plus d'affinité, déplace l'interaction CD28-B7 pour terminer la réponse immune. Ce modèle (très simple) de compétition pour B7 a prévalu pendant de nombreuses années, mais a été beaucoup revisité au cours de ces dix dernières années ; à tel point, qu'aujourd'hui, divers modèles mécanistiques sont décrits. Brièvement, la dernière grande modification en date est la découverte chez la souris (Butte et al. 2007), puis chez l'homme (Butte et al. 2008) de PDL-1 (exprimé sur les lymphocytes T activés et les CPA) comme autre ligand de B7 (exprimés sur les T activés et les CPA), en particulier CD80, et exerçant une action inhibitrice sur le lymphocyte T après interaction. La vision de ce quatuor CD28/B7/CTLA-4/PDL-1 complique énormément l'interprétation de tous les résultats de ces dernières années sur cette voie. D'autant plus que le groupe de Butte cherchait, en fait, un ligand inconnu de B7 aux propriétés costimulatrices, après avoir découvert plusieurs années auparavant que les lymphocytes T CD28-CTLA-4 double KO répondaient à une stimulation TCR uniquement en présence de CHO exprimant B7 et que le blocage de B7 retardait le rejet chez ces souris CD28-CTLA-4 double KO (Mandelbrot et al. 2001). Ce ligand toujours non-identifié de B7, costimulateur du lymphocyte T, impliquerait donc une voie de régulation encore plus complexe au sein d'un quintet CD28/B7/CTLA-4/PDL-1/ XXX. Il est devenu bien difficile de disséquer en détails et de manière fiable les divers mécanismes régissant toute cette voie ; j'essaierai ainsi de décrire au mieux les mécanismes ayant une implication importante dans les réponses immunes, en particulier en transplantation.

II.1.1. Expression des molécules du trinôme

Les molécules CD80 et CD86 sont exprimées par la plupart des cellules capables de présenter un antigène comme les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes B, les cellules de Langerhans, les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales suivant les espèces et les stimuli (Freedman et al. 1987; Vandenberghe et al. 1993; Denton et al. 1999). Il faut également souligner, que les lymphocytes T expriment aussi ces molécules de B7 après activation et que cette expression est à la base d'un des mécanismes de régulation de leurs fonctions, via un contact direct avec les Treg qui expriment constitutivement CTLA-4 (Paust et al. 2004). L'expression constitutive de ces deux molécules à la surface des CPA est contradictoire dans la littérature. Certains décrivent une expression constitutive faible de CD86 et pas de CD80 (G J Freeman et al. 1993; Hathcock et al. 1994), alors que d'autres décrivent une faible expression constitutive de CD80 et pas de CD86 (David M Sansom et al. 2003). En revanche, il y a un clair consensus pour dire que CD86 est très rapidement et fortement surexprimé après maturation, alors que CD80 l'est plus faiblement et plus tardivement (K. Inaba et al. 1994). Personnellement, au cours de mes quelques travaux de thèse avec des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes, j'ai toujours observé une expression constitutive très faible de CD86 par rapport à l'expression de CD80, et une forte surexpression de CD86 après maturation au LPS. Cette expression constitutive de CD80 est notamment importante dans l'explication de la théorie du modèle du « rhéostat » des Treg avec les CPA (voir en détails dans la partie « Lymphocytes T régulateurs »).

La molécule de CD28 est exprimée constitutivement à la surface de tous les lymphocytes T CD4⁺ murins et humains, et sur tous les CD8⁺ murins du sang périphérique, alors qu'elle n'est exprimée que par environ seulement 50% des T CD8⁺ humains (J. A. Gross et al. 1992). CD28 est également exprimé par d'autres types cellulaires comme les cellules NK, les neutrophiles (Venuprasad et al. 2001), les éosinophiles (Woerly et al. 1999), mais aussi par les cellules stromales de la moelle osseuse, où CD28 jouerait un rôle dans la lymphopoïèse B (Gray Parkin et al. 2002), et sur les cellules du myélome à des stades avancés et sévères, où il constitue un marqueur clinique de très mauvais pronostic (N Robillard et al. 1998).

CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), ou CD152, est une molécule inductible après activation sur les lymphocytes T et son expression est très faible (quasiment nulle) à la surface des lymphocytes T naïfs (Iida et al. 2000; C A Chambers et al. 2001), où il est en perpétuel recyclage. Il est localisé dans des granules cytoplasmiques et son expression en surface dépend de l'activation lymphocytaire T suite à l'engagement du TCR et non de la signalisation de CD28 (P S Linsley et al. 1996). En revanche, CTLA-4 est fortement exprimé

sur les Tregs CD4⁺ CD25⁺ (T Takahashi et al. 2000) et joue un rôle crucial dans les divers mécanismes de suppression. Il est également détecté sur les lymphocytes B, les cellules souches CD34⁺ et les granulocytes (Pistillo et al. 2003).

II.1.2. Les molécules de B7 (CD80 et CD86)

-1.2.1. CD80 vs CD86

Les molécules CD28 et CTLA-4 présentent un motif extracellulaire MYPPPY essentiel pour la liaison avec leurs ligands : CD80 et CD86. La molécule CD28 se lie à une paire de molécules B7 sous forme d'homodimère de façon monovalente (P S Linsley et al. 1990). CTLA-4, quant à lui, se lie aux molécules B7 de façon divalente permettant la formation d'une structure en fermeture éclair (J C Schwartz et al. 2001). Ceci permet alors une interaction de forte avidité et une faible constante de dissociation de l'interaction CTLA-4/B7 contrairement à la liaison CD28/B7 (van der Merwe et al. 1997; S Ikemizu et al. 2000; Stamper et al. 2001). C'est alors à partir de ces données qu'est né le modèle de compétition entre CTLA-4 et CD28 sur les molécules de B7, avec par la suite la découverte de l'action inhibitrice de CTLA-4 dans les lymphocytes T (M F Krummel et J P Allison 1996). En revanche, ce modèle ne tient pas compte des différences entre CD80 et CD86, nommés sous le terme générique de B7.

CD80 et CD86 sont exprimés par les mêmes cellules, se lient aux mêmes récepteurs (en l'occurrence CD28 et CTLA-4) et ont apparemment la même fonction pour les CPA. En revanche, comme précédemment citée, leur expression constitutive est différente et la cinétique de surexpression après maturation l'est aussi. C'est ainsi que Collins et coll. ont décrit les propriétés d'interaction entre ces molécules et révélé que, certes CTLA-4 a une affinité plus forte que CD28 pour ces ligands, il a surtout une affinité 13 fois plus forte pour CD80 ($K_d = 0,2\mu\text{M}$) que pour CD86 ($K_d = 2,6\mu\text{M}$) (Alison V Collins et al. 2002). De la même manière, CD28 a une affinité plus importante pour CD80 ($K_d = 4\mu\text{M}$) que CD86 ($K_d = 20\mu\text{M}$). L'affinité de CTLA-4 étant plus forte que celle de CD28 pour CD80, un biais pour CD80 s'établit, ce qui engendre finalement une affinité de CD28 2 à 3 fois plus forte pour CD86 quand CTLA-4 est présent (le ratio des K_d CD28/CTLA4 pour CD80 est de 20, alors qu'il est de 7,6 pour CD86). CD80 devient alors le ligand préférentiel de CTLA-4 et CD86 celui de CD28 (David M Sansom et al. 2003). Cette différence est certainement impliquée de manière importante dans la divergence de résultats dans les modèles de transplantation chez les souris CD80 ou CD86 KO, ainsi qu'avec les anticorps anti-CD80 ou anti-CD86. Elle l'est

tout autant pour la régulation de la fonction des Treg dans le modèle de la théorie du « rhéostat » (voir partir « Lymphocytes T régulateurs »).

-1.2.2. Signalisation

Les molécules CD80 et CD86 ne sont pas seulement considérées comme des ligands des molécules CD28 et CTLA-4 pour agir sur les lymphocytes T. Elles sont aussi capables de transduire des signaux aux CPA qui les expriment. Ainsi, le CTLA-4Ig, protéine de fusion entre la partie extracellulaire de CTLA-4 et la fraction Fc d'une Ig (P S Linsley et al. 1991), est capable de se fixer aux molécules B7 pour empêcher l'interaction avec CD28 (P S Linsley et al. 1992) et d'induire la synthèse d'IDO dans ces CPA chez la souris en présence d'IFN γ pour certains, de manière indépendante pour d'autres (Grohmann et al. 2002; Andrew L Mellor et Munn 2004). Dans cette étude de Grohmann et coll., l'inhibition de la voie de synthèse d'IDO conduit immédiatement au rejet dans un modèle de tolérance induit par CTLA-4Ig. Chez l'homme, le groupe de Bristol Myers Squibb a publié récemment que l'Abatacept (CTLA-4Ig) ne possède pas cette propriété immunomodulatrice (Patricia M Davis et al. 2008). Une autre étude a montré que l'incubation de PBMC avec CTLA-4Ig induit l'expression d'IDO dans les CPA, mais également dans les lymphocytes T CD4⁺ activés (Boasso et al. 2005). Enfin, la molécule CTLA-4 membranaire, tout comme sa forme soluble, est également capable d'induire IDO dans les CPA. Une étude a ainsi mis en évidence *in vitro* chez la souris que l'expression de CTLA-4 par les Treg naturels permet d'induire la synthèse d'IDO dans les CPA qu'elles rencontrent (Francesca Fallarino et al. 2003) complétant leur fonctionnalité suppressive. Par ailleurs, d'autres ont montré que des CPA IDO⁺ peuvent convertir des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en lymphocytes T régulateurs (Andrew L Mellor et Munn 2004). D'un point de vue moléculaire, la fixation de CTLA-4 sur les molécules de B7 des CPA induit la transcription d'un signal dépendant de la voie de STAT-1, qui va stimuler les CPA à produire de l'IFN γ . Cette sécrétion d'IFN γ agit de façon autocrine ou paracrine sur les CPA et génère l'augmentation de l'expression d'IDO. IDO permet ensuite la dégradation et la déplétion du tryptophane dans le microenvironnement et est à l'origine d'effets régulateurs importants sur les réponses cellulaires T (Andrew L Mellor et Munn 2004), comme le blocage du cycle cellulaire des lymphocytes T et l'induction d'apoptose de ces cellules. De plus, les métabolites issus du catabolisme du tryptophane (kynurénine et acide hydroxyanthranilique) suppriment également la réponse lymphocytaire T et sont capables de prolonger la survie d'une allogreffe de peau (Bauer et al. 2005) (**Figure 5**).

Enfin, contrairement à CTLA-4 qui peut générer des cellules dendritiques (DC) tolérogènes, la fixation de CD28 active ces DC. En effet, la fixation d'une molécule de CD28-Ig sur des DC induit la sécrétion d'IL-6 en plus de la production d'IFN γ , par un signal dépendant de la voie p38 MAPK. Cette sécrétion empêche la surexpression d'IDO par l'IFN γ et rend les DC plus immunogènes (**Figure 5**). *In vivo*, le traitement de souris par CD28-Ig a montré une augmentation des réponses T dans des modèles de tumeurs, d'autoimmunité ou d'infection bactérienne (Orabona et al. 2004).

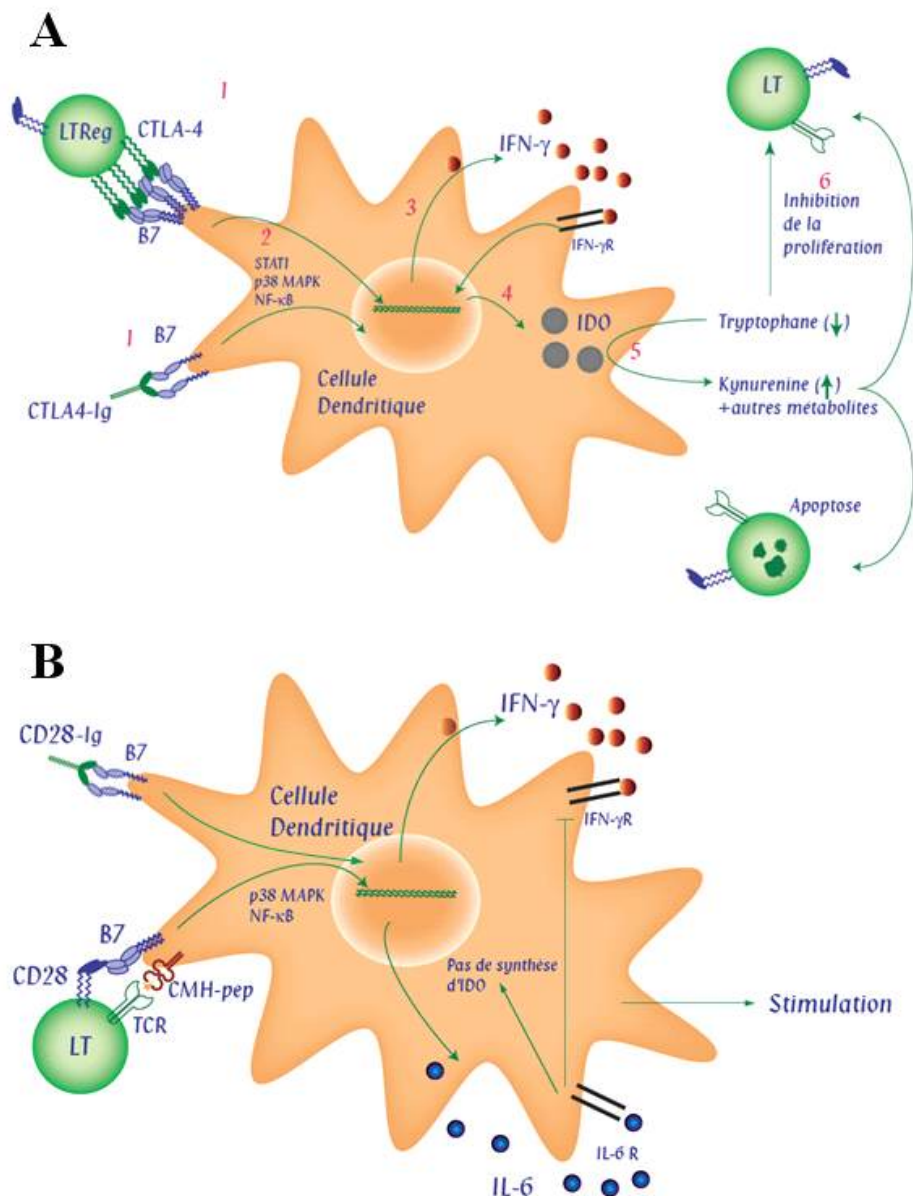


Figure 5 : Signalisation de B7 dans les APC après interaction avec CTLA-4 (A) ou CD28 (B).

II.1.3. CD28

-1.3.1. Signalisation de CD28

Par son domaine intracytoplasmique YMNM, CD28 peut recruter la PI3K (Phosphoinositide-3 kinase), et l'interaction avec B7 peut ainsi stimuler l'association de la PI3K avec CD28 (S G Ward et al. 1993; K. V. Prasad et al. 1994; Ueda et al. 1995). L'activation de la PI3K permet ensuite le recrutement et l'activation de Vav-1, qui une fois phosphorylé induit l'activation d'ITK/Tec. L'activation de la signalisation de CD28 entraîne, avec le signal 1, également une modification de la conformation de la phospholipase C (PLC γ) qui augmente la concentration d'inositol triphosphate (IP3) à l'origine du relargage du calcium des vésicules intracellulaires vers le cytoplasme. Cette augmentation du calcium intracellulaire permet l'ouverture des canaux calciques et l'entrée massive de calcium dans la cellule provoquant la translocation de facteurs de transcription tels que NF-AT (Nuclear Factor for Activated T cells), NF- κ B ou AP-1 (Activator Protein-1) (Diehn et al. 2002; Acuto et Michel 2003).

-1.3.2. Rôle de CD28 dans la réponse lymphocytaire

La molécule de costimulation CD28 est une des premières molécules de costimulation identifiées et une des mieux caractérisées aujourd'hui. Outre son rôle potentiel dans la sélection thymique (que nous avons vu en début d'introduction), CD28 joue un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes T en périphérie (Harding et al. 1992). En son absence, l'engagement du TCR d'un lymphocyte T conduit au phénomène d'anergie (R H Schwartz 1990; Harding et al. 1992). Cependant, en synergie avec le signal antigénique, CD28 permet de dépasser le seuil nécessaire à l'initiation de la réponse immune, notamment en diminuant le seuil et le nombre de TCR engagés nécessaires à l'activation (Viola et Lanzavecchia 1996; Y. Itoh et Germain 1997; Lanzavecchia et al. 1999). Ainsi l'activation optimale du lymphocyte T, sa prolifération, la production de cytokines et sa différenciation sont induites (**Figure 6**). A la suite du signal et de l'interaction de CD28 avec son ligand, la translocation calcium-dépendante des facteurs de transcriptions NF-AT, NF- κ B et AP-1 contrôle la transcription d'IFN γ , de l'IL-4 et surtout de l'IL-2 (Thompson et al. 1989) qui agit de façon autocrine et fournit un signal de prolifération aux lymphocytes T. Une étude a permis de démontrer que l'engagement de CD28 permet aussi l'expression de cyclines D3 responsables de l'entrée dans le cycle cellulaire des lymphocytes T alors que l'IL-2, produite après costimulation, est impliquée dans le maintien de la prolifération (Boonen et al. 1999).

Par ailleurs, l'engagement du TCR peut conduire à la survie ou la mort cellulaire en fonction de la présence ou non de signaux de costimulation. En synergie avec le TCR, les signaux CD28 sont à l'origine d'une protection active contre la mort cellulaire en augmentant l'expression de Bcl-xl (molécule anti-apoptotique) (Boise et al. 1995) et d'IL-2 nécessaire à la survie et l'activation des lymphocytes (Kane et al. 2001). Ainsi l'engagement de CD28 induit des signaux essentiels à la survie des lymphocytes T naïfs activés pour la première fois (Noel et al. 1996). Une nouvelle stimulation de ces lymphocytes récemment activés aboutit à une entrée en apoptose par un mécanisme d'AICD (Activation Induced Cell Death), permettant le contrôle des réponses immunes et évitant un emballement de ces dernières. L'AICD est dépendante des interactions Fas-FasL et TNF α -TNFR2. La liaison TNF α -TNFR2 entraîne notamment une diminution de l'expression d'ARNm codant pour Bcl-xl ; le signal CD28, qui restaure l'expression de Bcl-xl, protège ainsi les lymphocytes T de l'AICD. Concernant l'AICD induite par Fas-FasL, CD28 protège également les lymphocytes de cette apoptose, puisque des lymphocytes issus de souris CD28 KO montrent une plus grande sensibilité à l'apoptose dépendante de Fas-FasL (H. Kishimoto et Sprent 1999).

La voie de costimulation CD28/B7 est également impliquée dans la régulation de la balance Th1/Th2. En absence de CD28, il est décrit que les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 ne sont pas produites suggérant que la différenciation Th2 est dépendante de cette voie de costimulation (Rulifson et al. 1997; Schweitzer et A H Sharpe 1998). Par ailleurs, l'engagement de CD28 est impliqué dans la migration cellulaire et l'inflammation. Ainsi, la liaison CD28/B7 permet la production de chimiokines tels que MIP-1 α et MIP-1 β (K. C. Herold et al. 1997) ou de récepteurs de chimiokines comme CXCR4 (R. G. Carroll et al. 1997).

Enfin, le blocage de l'interaction CD28/B7, par des anticorps dirigés contre CD28 ou B7, empêche l'induction de la réponse cellulaire T dans des modèles de maladies auto-immunes et permet de prolonger la survie de greffon en allotransplantation (B Salomon et J A Bluestone 2001; Greenfield et al. 1998). Cette partie sera détaillée plus tard. Cette inhibition affecte aussi bien la prolifération, la différenciation Th2, la réponse cytotoxique des T CD8+ dépendante des T CD4+ et la commutation de classe des Ig (Acuto et al. 2003). Les effets dus à CD28 sont, en effet, nombreux et l'étude *in vivo* de souris déficientes pour CD28 (ou B7) a ainsi permis de montrer également un défaut dans la réponse cellulaire B dépendante de la réponse lymphocytaire T et un défaut d'expression de récepteurs de costimulation nécessaires à la progression et à la maturation de la réponse immune (Arlene H Sharpe et Gordon J Freeman 2002).

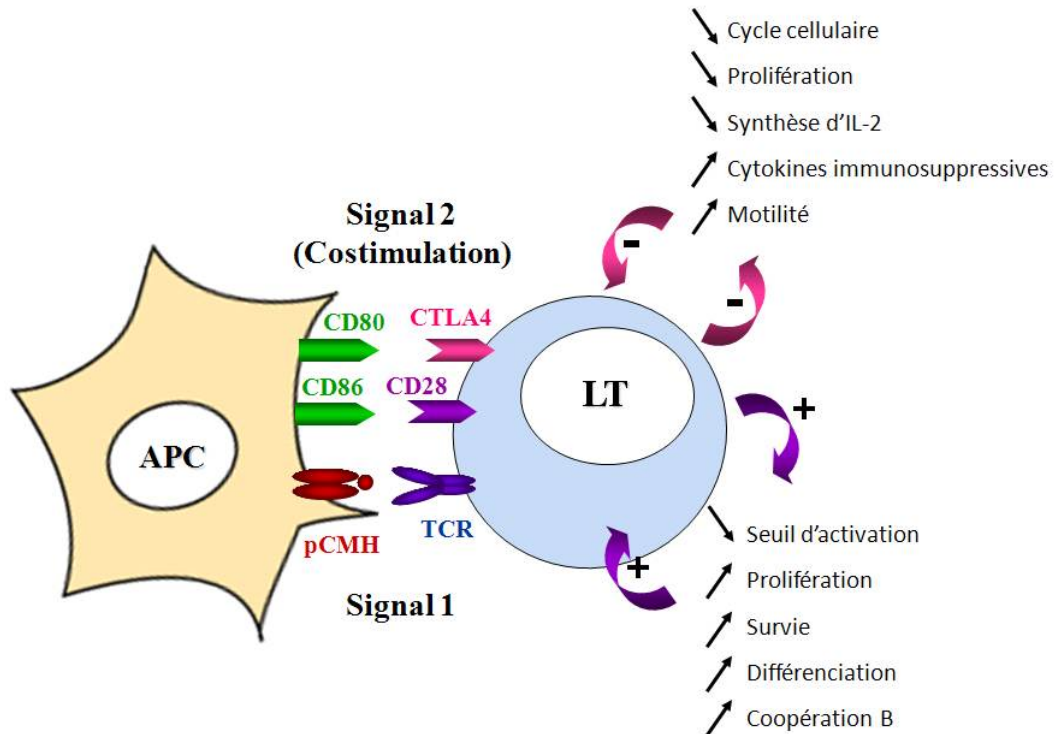


Figure 6 : Rôle respectif de CD28 et CTLA-4 sur l'activation du lymphocyte T.

-1.3.3. La synapse immunologique et CD28

Le contact entre un lymphocyte T et une CPA fait intervenir des liaisons moléculaires et provoque un rapprochement localisé entre ces deux cellules. Initialement, considéré comme molécule d'adhésion (P S Linsley et al. 1990), CD28 ne semblait pas jouer un rôle dans la formation de la synapse immunologique (SI) mais plutôt dans son maintien. Plus récemment, la synapse immunologique a été considérée comme étant à l'origine d'un environnement cellulaire qui favoriserait les interactions des molécules de costimulation comme CD28 (Bromley et al. 2001). Les avancées techniques de ces dernières années ont énormément modifié la vision des interactions cellulaires, notamment grâce à l'imagerie *in vitro* et *in vivo* qui permettent d'intégrer une vision dynamique essentielle à la compréhension du système immunitaire.

L'activation du lymphocyte T requiert un contact entre la cellule T et des CPA pour que les molécules de TCR et de pCMH (complexe peptide-CMH) forment ensemble un seul complexe. La formation de ces complexes induit la formation de la SI, structure concentrique circulaire. Il a récemment été montré que la SI est en fait un assemblage d'une quantité importante de petits « clusters » contenant les TCR, des kinases, des adaptateurs du TCR et des molécules de costimulation, notamment CD28. Ce n'est pas un phénomène statique, bien au contraire, ces clusters sont sujets à une fine régulation spatiotemporelle en trois dimensions

(Monks et al. 1998; Grakoui et al. 1999), permettant d'initier la signalisation du TCR et des molécules de costimulation (Yokosuka et al. 2005). CD28, ne s'agrège pas à la surface en amas désordonnés, mais fait partie de ces microclusters ordonnés, qui associent notamment la protéine kinase C θ (PKC θ). D'après le modèle de Yokosuka et coll. (**Figure 7**), après une première phase très rapide d'extension du contact (afin de maximiser et de recruter un maximum de microclusters), la synapse immature va se rétracter sur elle-même afin d'agrèger tous ces microclusters en un site unique très ordonné, le c-SMAC (central Supramolecular Activation Cluster). La formation de ce c-SMAC, qui prend une dizaine de minutes, signe la formation d'une synapse mature (Yokosuka et Takashi Saito 2009). Sans la formation de ce cluster principal TCR-CD28 au cœur de la synapse, il ne peut y avoir de transduction et de maintenance des signaux intracellulaires nécessaires pour obtenir une activation complète des lymphocytes T. Par ailleurs les flux calciques, induits par les signaux du TCR et de CD28, permettent le réarrangement et le transport vers la synapse d'autres molécules, comme CTLA-4, par des mécanismes dépendant de l'actine et de la myosine (Wülfing et M M Davis 1998; Grakoui et al. 1999). Enfin, l'imagerie *in vivo* a permis de démontrer que le contact entre des T CD4⁺ et des DC matures est au moins de 6 heures pour initier une expansion clonale, que 6 heures après contact le T reçoit encore des signaux de la CPA, et qu'il faut une interaction stable d'au moins 24 heures pour que les T puissent se diviser 5 à 6 fois (Celli et al. 2007; Bousso 2008).

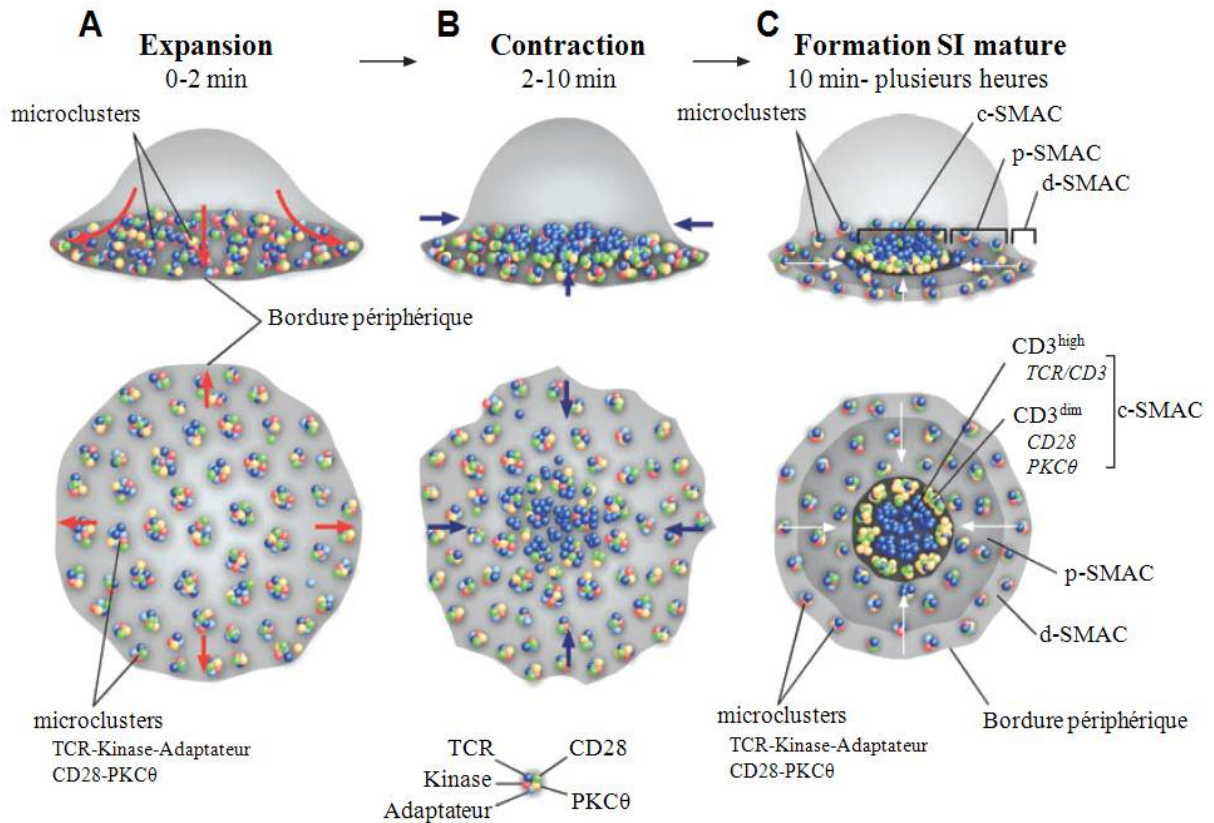


Figure 7 : Formation dynamique des microclusters TCR-CD28 et de la synapse immunologique.

(A) Lors du contact T-CPA, les molécules de TCR, CD28, B7, ICAM s'agrègent très rapidement en petits clusters. Ces microclusters TCR-CD28 rassemblent également des kinases et les adaptateurs qui participent à la signalisation du TCR ; ainsi la phosphorylation de tyrosines et des flux calciques intracellulaires sont induits dès la formation de quelques microclusters. CD28 se concentre dans ces microclusters de manière dépendante de son ligand et y recrute la PKC θ . Dès les premiers points de contact, le lymphocyte T expand (flèche rouge) afin de former de nouveau microclusters. (B) Après cette phase d'expansion, le lymphocyte commence à rétracter sa zone de contact (flèche bleue) et accumule les microclusters au centre de l'interface. Durant ce processus, les microclusters fusionnent les uns aux autres pour former un agrégat de récepteurs. (C) Dix minutes après le contact, les microclusters TCR-CD28 se concentrent tous au cœur de la synapse et forment le c-SMAC (central supramolecular activation cluster). Ce c-SMAC est divisé en deux régions : $CD3^{high}$, qui ne contient aucune molécule de transduction du signal (qui probablement sert à dégrader les TCR) et $CD3^{dim}$, région riche en CD28 et PKC θ , qui forme un anneau en périphérie du c-SMAC pour entretenir l'activation du lymphocyte T. De nouveaux microclusters TCR-CD28 fonctionnels se forment en continue autour du c-SMAC, migrent ensuite au c-SMAC et supportent le recrutement à la membrane plasmique et à la synapse de kinases et autres molécules de signalisation. (Figure issu de (Yokosuka et Takashi Saito 2009))

II.1.4. CTLA-4

-1.4.1. Signalisation de CTLA-4

CTLA-4 est un inhibiteur du signal transduit par le TCR et le CD28 qui est localisé au niveau de vésicules intracellulaires. A la suite de l'engagement du TCR, CTLA-4 est exporté à la membrane au niveau du site d'engagement du TCR (P S Linsley et al. 1996) par un mécanisme de réorganisation du cytosquelette. La proximité de CTLA-4 avec le TCR permet la phosphorylation d'une tyrosine de la partie intracytoplasmique de CTLA-4 par une protéine associée au complexe CD3, la molécule ZAP70 (ζ chain Associated Protein) permettant l'activation et le maintien de la molécule à la surface. La translocation membranaire de CTLA-4 dépend également de la force du signal généré par le TCR (Jackson G Egen et James P Allison 2002) : un signal généré par un peptide fortement agoniste induira ainsi une plus grande expression de CTLA-4 en surface qu'un signal généré par un peptide faiblement agoniste. La tyrosine phosphorylée de CTLA-4 peut interagir avec la sous-unité p85 de la PI3K (H Schneider et al. 1995; E. Chuang et al. 1999) et former un complexe avec la tyrosine phosphatase SHP-2 (Marengère et al. 1996; Cilio et al. 1998) permettant l'activation de la voie de signalisation de CTLA-4. L'interaction CTLA-4/SHP-2, suite à l'engagement de CTLA-4, pourrait inhiber la liaison de la tyrosine kinase Lck avec ZAP-70 empêchant la phosphorylation de la chaîne ζ du CD3, nécessaire pour la transduction du signal par le TCR (Marengère et al. 1996; K M Lee et al. 1998). Par ailleurs, CTLA-4 inhibe le recrutement des radeaux lipidiques permettant le rapprochement des protéines kinases essentielles également à la transduction du signal par le TCR (M. Martin et al. 2001). CTLA-4 agit ainsi tel un frein dès le début de la cascade de phosphorylation correspondant à la transduction du signal antigénique. CTLA-4 a également des effets sur l'activation massive de facteurs de transcription consécutive à l'engagement du TCR et de CD28. Il a ainsi été montré que la liaison CTLA-4/B7 réduit la phosphorylation de $I\kappa B-\alpha$ et diminue l'activation des facteurs de transcription NF- κB et AP-1 (Olsson et al. 1999). Enfin, à l'inverse de CD28 qui diminue le seuil d'activation du TCR, certaines études montrent qu'en présence de CTLA-4 ce seuil d'activation pourrait être plus grand (Jackson G Egen et al. 2002; Christopher E Rudd 2008).

-1.4.2. Rôle de CTLA-4 dans la réponse lymphocytaire

Le rôle de CTLA-4 est très important dans le contrôle des réponses immunes, telles l'autoimmunité ou l'homéostasie lymphocytaire (Perrin et al. 1996; Karandikar et al. 1998). La génération d'un important désordre lymphoprolifératif accompagné d'un infiltrat de lymphocytes T et de la destruction de nombreux tissus, conduisant à la mort en trois semaines, chez les souris CTLA-4 KO en furent la première démonstration (Tivol et al. 1995; Waterhouse et al. 1995). La double déficience CD28 et CTLA-4 permet de restaurer l'homéostasie (Mandelbrot et al. 2001). De la même façon, les souris déficientes pour les molécules CTLA-4, CD80 et CD86 ne présentent pas de désordres lymphoprolifératif et ont une espérance de vie normale (Mandelbrot, McAdam, et al. 1999).

Trois mécanismes majeurs expliquent l'inhibition de CTLA-4 : d'une part, un mécanisme passif de compétition qui, via le jeu des affinités entre les molécules CTLA-4 et CD28 pour leurs ligands, peut interrompre la signalisation transmise par CD28 (M L Alegre et al. 1996; B M Carreno et al. 2000) et ainsi conduire à la diminution de l'IL-2, et d'autre part, un rôle majeur de CTLA-4 dans la régulation par les Treg (voir partie sur les Treg). Les désordres lymphoprolifératifs chez les souris CTLA-4 KO se retrouvent chez des souris n'ayant qu'une invalidation conditionnelle de CTLA-4 uniquement dans les cellules Foxp3+, c'est-à-dire les Treg chez la souris (Wing et al. 2008). Enfin, une signalisation intrinsèque de CTLA-4 conduit à divers effets inhibiteurs. CTLA-4 agit en bloquant la synthèse d'éléments nécessaires à la progression de la cellule dans le cycle cellulaire, notamment la cycline D3 ou cdk4 et 6 (Cyclin Dependant Kinase), arrêtant la prolifération lymphocytaire T en phase G0 et G1 (M F Krummel et J P Allison 1996; Blair et al. 1998). L'arrêt du cycle cellulaire peut également conduire à l'apoptose des cellules activées par un mécanisme indépendant de la voie Fas/FasL (Scheipers et Reiser 1998). L'étude des cellules T déficientes pour CTLA-4 a permis de révéler également un rôle important dans la régulation de la différenciation des cellules T helper. En effet, en absence de CTLA-4, les lymphocytes T CD4+ naïfs se différencient en cellules de type Th2, sécrétant de grandes quantités d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10, mais pas en cellules de type Th1 (Ubaldi et al. 2003). Enfin, l'engagement de CTLA-4 pourrait induire la sécrétion de cytokines immunosuppressives, comme le TGF- β , bien que le rôle de CTLA-4 dans la production de celui-ci soit toujours controversé dans la littérature (W Chen et al. 1998; Gomes et al. 2000; Sullivan et al. 2001) (**Figure 6**).

-1.4.3. La synapse immunologique et CTLA-4

A l'inverse de CD28 une nouvelle fois, CTLA-4 joue a un rôle très important également dans la synapse immunologique (SI), notamment en empêchant la formation stable de celle-ci. Ce n'est que très récemment que le groupe de Schneider et coll. a montré le rôle de CTLA-4 dans la SI : il inverse le « signal STOP » induit par le TCR après contact (Helga Schneider et al. 2006). Ils ont en effet mis en évidence *in vitro* et *in vivo* (toujours grâce aux nouvelles technologies permettant une vision dynamique) que CTLA-4 augmente la motilité des lymphocytes T CD4+ chez la souris et chez l'homme. Lorsque le TCR s'engage après contact, parmi son signalosome, une signalisation très importante permet la stabilisation de la synapse : le « signal STOP » induit par le TCR réduit de manière très importante, voire arrête, la motilité des lymphocytes T afin qu'ils restent en contact pendant plusieurs heures avec la CPA et conduit à leur pleine activation (Negulescu et al. 1996; M L Dustin et al. 1997; Mempel et al. 2004). Dans cette étude de Schneider et coll., l'augmentation de la motilité cellulaire après contact par CTLA-4 empêche par la suite la formation de synapses stables. Les contacts cellulaires deviennent très court et donc insuffisants pour engendrer l'activation des lymphocytes T, la prolifération et la production d'IL-2 par les lymphocytes T. L'explication moléculaire n'est pas encore complètement déterminée, mais ce modèle où CTLA-4 annule ou casse ce « signal STOP » (**Figure 8**) pourrait expliquer l'augmentation du seuil d'activation du TCR par CTLA-4 (Christopher E Rudd 2008). En 2008, ce même groupe a de nouveau confirmé ce résultat et a montré que CTLA-4 perturbe et interrompt la formation de microclusters de ZAP70 au sein de la synapse avant que celle-ci ne soit abordée (Helga Schneider et al. 2008) et que ceci pourrait être à l'origine d'une diminution des flux calciques, du temps de contact et de l'augmentation de la motilité. Ce nouveau modèle est d'autant plus important que les nouvelles données de la littérature à partir d'analyse biphotonique *in vivo* montrent assez clairement que dans des modèles d'induction de réponses immunes spécifiques à un antigène ou dans des modèles de tolérance à un antigène, le comportement et notamment la motilité des lymphocytes T ne sont pas similaires (Bouso 2008). En effet, lors d'une réponse immune à un antigène, les lymphocytes T dans les ganglions périphériques établissent de longs contacts (> 6 heures) avec les cellules dendritiques et leur motilité est très faible pour la stabilité de ces synapses. En revanche, dans le même modèle mais en condition toléro-gène (sensibilisation au préalable à l'antigène), les lymphocytes T sont très mobiles et

initient de courts contacts avec les CPA. Ils établissent ainsi de nombreux contacts très brefs avec de multiples cellules dendritiques (Hugues et al. 2004).

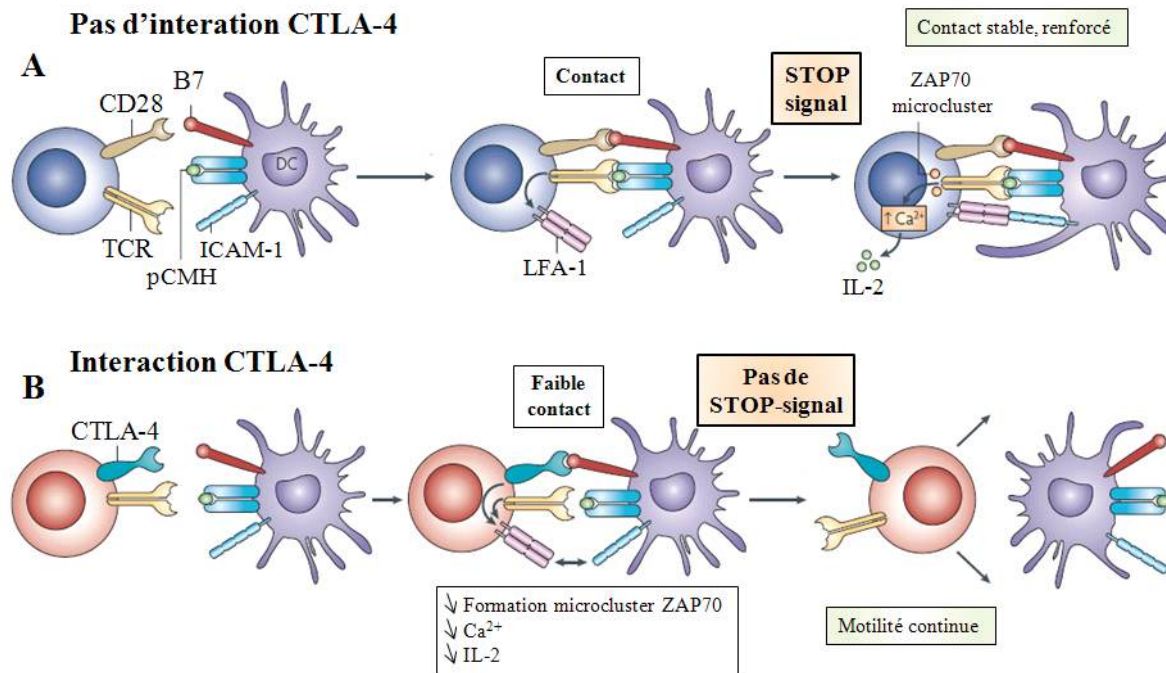


Figure 8 : Le modèle du « reverse STOP-signal » de CTLA-4 (D'après (Christopher E Rudd 2008))

II.1.5. Les modèles KO du trinôme CD28/B7/CTLA-4

-1.5.1. Les souris CD80, CD86, CD80/86 KO

Le rôle de la voie CD28/B7 dans la réponse immune en allotransplantation a été étudié par différents groupes en utilisant des souris déficientes pour CD28 ou les molécules de B7. Des souris sauvages rejettent aussi rapidement une allogreffe cardiaque ou de peau d'un donneur CD80/CD86 double KO (dKO) qu'un greffon provenant d'un donneur sauvage ; suggérant donc que la voie CD28/B7 par les CPA du donneur n'est pas primordiale dans la reconnaissance directe. En revanche, l'expression des molécules de B7 par le receveur est beaucoup plus importante, puisque les receveurs CD80/CD86 dKO ne développent pas de rejet contre un greffon cardiaque d'une souris sauvage. Ils sont néanmoins capables de rejeter un greffon de peau ou d'îlots (Mandelbrot, Y. Furukawa, et al. 1999; G L Szot et al. 2000). Par ailleurs, les rôles respectifs de CD80 et CD86 ont également été étudiés par ces modèles de déficiences génétiques. Ainsi, une étude a montré que CD80 ne joue pas un rôle aussi important que CD86 dans le rejet aigu, puisque des souris CD80 KO développent un rejet aigu de même cinétique que les souris sauvages (X X Zheng et al. 1997). De plus, cette étude

souligne que CTLA4-Ig n'induit pas de tolérance à une greffe cardiaque chez des souris sauvages si le donneur est CD80 KO, alors qu'il le permet avec un donneur sauvage. Ceci suggère donc un rôle plus important de CTLA-Ig dans la voie directe de présentation antigénique, le blocage de CD80/CD86 sur les CPA du donneur (notamment par la molécule CD80). Grâce à ces modèles KO, un rôle plus important de CD86 dans l'activation lymphocytaire a été démontré. Ainsi les souris CD86 KO montrent une nette amélioration dans des modèles d'EAE (pathologie inflammatoire du système nerveux central, médiée par les Th1 principalement), alors que l'évolution de la maladie demeure non-affectée par l'inactivation génétique de CD80 (Girvin et al. 2000). Par ailleurs, les souris CD80 KO ont des réponses dépendantes des voies Th1 ou Th2 normales, alors que celles des CD86 KO sont sévèrement compromises (Lenschow et al. 1996). Néanmoins, du à la dualité de ces ligands pour leurs récepteurs, il n'est pas évident que l'effet fonctionnel observé dans un modèle simplement KO (CD80 ou CD86) soit toujours le résultat de l'absence de ce ligand ; il se peut très bien que cela amplifie, révèle ou dévie la fonction du ligand non invalidé (David M Sansom et L. S. K. Walker 2006). De plus, une étude de Mandelbrot et coll. a montré que des lymphocytes T issus de souris CD28/CTLA-4 dKO répondent à une stimulation TCR uniquement en présence de CHO exprimant B7 et que le blocage de B7, ou de CD86 seul, retarde le rejet chez ces souris (Mandelbrot et al. 2001; Yamada et al. 2001). Il pourrait donc y avoir un autre récepteur costimulateur des lymphocytes T, toujours non-identifié, ayant également pour ligand les molécules de B7. Différents modèles expérimentaux d'autoimmunité ont montré une prévention ou une diminution de la sévérité de la pathologie en invalidant les molécules de B7 ou de CD28. En revanche, le diabète spontané, que présentent les souris NOD, est accentué chez les souris NOD CD80/86 dKO ou CD28 KO. En fait, ces souris CD80/86 dKO ou CD28 KO présentent une importante diminution des Treg naturels CD25⁺ Foxp3⁺. Ce déficit en Treg explique ce diabète auto-immun, puisque le transfert de Treg de souris NOD contrôles à ces souris KO retarde ou prévient l'apparition de cette pathologie (B Salomon et al. 2000). Le rôle de B7 et surtout CD28 dans la biologie des Treg sera discuté en détail dans la partie correspondante. Enfin, outre un défaut des réponses cellulaires, les souris CD80/CD86 dKO présentent également des anomalies dans la réponse humorale. En effet, elles sont incapables de former des centres germinatifs et de faire le « switch » de classe des Ig (Beatriz M Carreno et Mary Collins 2002; Arlene H Sharpe et Gordon J Freeman 2002). Ceci illustre d'autant plus le rôle fondamental de cette voie de costimulation dans la réponse immune en générale.

-1.5.2. Les souris CD28 KO

Comme les souris CD80/CD86 dKO, les souris CD28 KO ont également un déficit de Treg en périphérie, expliquant que l'invalidation génétique de CD28 conduise également à un diabète auto-immun chez les souris NOD (B Salomon et al. 2000). Comme les souris CD80/CD86 dKO, les souris CD28 KO ont une diminution significative de la sévérité de la pathologie dans les modèles d'EAE (Girvin et al. 2000). Cependant, la résistance dans ces modèles d'EAE n'est pas due à un défaut *in vivo* de l'activation des clones T spécifiques de la myéline. En effet, les lymphocytes T isolés de ces souris CD28 KO produisent la même quantité d'IFN γ et de TNF α en réponse à l'antigène. En revanche, la réponse d'hypersensibilité retardée (DTH= Delayed-Type Hypersensitivity) est significativement diminuée, suggérant plutôt un rôle de CD28 dans la régulation *in vivo* de la circulation des lymphocytes et dans l'immunité systémique. En allotransplantation, les souris CD28-déficientes ont un rejet aigu retardé dans des modèles de greffes de peau ou de cœur (K Kawai et al. 1996; Yamada et al. 2001), mais pas d'établissement de tolérance comme les souris CD80/CD86 dKO dans la greffe de cœur (G L Szot et al. 2000). Ceci met donc en évidence l'éventualité de mécanismes de rejet CD28-indépendants. Ces souris CD28 KO rejettent leur greffon cardiaque par des mécanismes impliquant à la fois des CD4 et des CD8 (Yamada et al. 2001). Par ailleurs, une étude a montré que l'inhibition des cellules NK chez ces souris CD28 KO conduit à une survie à long terme d'une allogreffe cardiaque (Maier et al. 2001) ; d'autres ont décrit un peu plus tôt que ces souris CD28 KO conservent une réponse cytotoxique normale envers un pathogène fortement virulent et que les CTL CD28 KO présentent les mêmes capacités cytotoxiques et prolifératives que les CTL sauvages (Shahinian et al. 1993). De plus, ces souris CD28 KO n'ont pas de défaut dans la génération ou le rappel de réponses CD8 mémoires (Suresh et al. 2001). Le blocage ou l'absence de CD28 réduit la réponse primaire des lymphocytes T CD8+, mais n'empêche pas la génération, la maintenance et l'immunité protectrice des CD8 mémoires. En ce qui concerne les lymphocytes T CD4+, l'absence de CD28 confère des défauts dans l'activation et la survie des lymphocytes T naïfs, et dans la différenciation Th (Arlene H Sharpe et Gordon J Freeman 2002). Les souris CD28 KO présentent également d'importants défauts dans la réponse humorale dépendante des lymphocytes T. Le taux basal d'Ig est de seulement 20% de celui de souris non-déficientes, avec une réduction importante notamment des sous-classes d'IgG1 et d'IgG2b (Lenschow et al. 1996). En revanche, la production d'IgM en réponse à une immunisation primaire est

conservée, alors que le « switch » de classe en réponse à une immunisation secondaire fait défaut. Ces souris CD28 KO ont ainsi une réduction de leur réponse anticorps Th-dépendante, comme l'absence de la formation de centre germinatif, du « switch » isotypique et des hypermutations somatiques (Lenschow et al. 1996; David M Sansom et L. S. K. Walker 2006). Enfin, ces souris CD28 KO ont également contribué à démontrer *in vivo* l'importance de la molécule inhibitrice CTLA-4. Ainsi, le rejet d'une allogreffe cardiaque chez ces souris CD28 KO est accéléré par le blocage de CTLA-4 ou de CD80 par des anticorps antagonistes (H. Lin et al. 1998; Yamada et al. 2001). En revanche, le blocage de CD86 prolonge un peu plus la survie du greffon chez ces souris, suggérant une nouvelle fois un autre récepteur costimulateur du lymphocyte T ayant pour ligand CD86 (Yamada et al. 2001). Ce blocage de CTLA-4 en absence de CD28 démontre donc l'effet inhibiteur (controversé à l'époque) de la molécule CTLA-4, mais également l'effet de CTLA-4 indépendant de CD28. En effet, CTLA-4 est une molécule inductible après l'activation du TCR et pas de CD28. Ainsi, la stimulation de lymphocytes T CD28 KO induit également l'expression de CTLA-4, en quantité similaire aux cellules CD28+ (Walunas et al. 1994; F Fallarino et al. 1998).

-1.5.3. Les souris CTLA-4 KO

La preuve la plus évidente de la fonction inhibitrice de CTLA-4 est venue des modèles KO. Les souris déficientes pour CTLA-4 développent un désordre lymphoprolifératif massif très rapidement et présentent une destruction fatale de plusieurs organes non-lymphoïdes, suite à une importante infiltration par les lymphocytes T (Tivol et al. 1995; Waterhouse et al. 1995). L'activation de lymphocytes T est détectable *in vivo* 5 à 6 jours après la naissance et les souris meurent toutes entre 18 et 28 jours. Ce phénotype est un des désordres lymphoprolifératifs les plus agressifs observés chez les souris génétiquement modifiées : les souris CTLA-4 KO meurent plus rapidement que celles ayant des défauts dans les voies apoptotiques (souris *lpr* ou *gld*), dans la signalisation de cytokines (souris ayant un défaut dans la transduction du signal du TGFβ) ou des délétions d'autres molécules inhibitrices (souris PD-1 KO) (C A Chambers et al. 2001). Les lymphocytes T de ces souris CTLA-4 KO présentent *in vivo* un phénotype d'hyperactivation : surexpression de CD69, CD25, Bcl-xl et la perte de l'expression de CD62L. *In vivo*, une proportion 4 fois supérieure de lymphocytes T en cours du cycle cellulaire est observée (incorporation de BrdU), et *in vitro*, ces cellules prolifèrent pendant plusieurs jours spontanément suite à une stimulation TCR seule et sécrètent une variété de cytokines, principalement de type Th2 (Tivol et al. 1995; Waterhouse et al. 1995; Khattri et al. 1999; Oosterwegel et al. 1999). L'invalidation de CTLA-4 semble affecter

différemment les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Les CD4 sont préférentiellement activés au début de la lymphoprolifération (C A Chambers et al. 1997). En revanche, l'injection de CTLA4-Ig dès la naissance, ou le croisement des souris CTLA4 KO avec une souche CD86 KO, permet de prévenir l'apparition des désordres lymphoprolifératifs, de manière réversible pour CTLA4-Ig puisque l'arrêt du traitement induit très rapidement les mêmes désordres lymphoprolifératifs (Khattari et al. 1999; C A Chambers et al. 2001; M L Alegre et al. 2001). Ainsi ces études supportent un modèle où la pathologie autoimmune en absence de CTLA-4 est due à une activation des lymphocytes T de manière CD28/B7 dépendante et conduisant à une expansion des clones T CD4⁺ autodestructeurs de type Th2 (Khattari et al. 1999). De même, le modèle de compétition de CTLA-4/CD28 pour les molécules B7 semble également impliqué dans la pathologie des souris CTLA4-KO. En effet, l'expression chez ces souris déficientes d'une molécule de CTLA-4, ayant un domaine cytoplasmique absent, ou muté au niveau des résidus de tyrosines, est également capable d'améliorer ces désordres lymphoprolifératifs (Nakaseko et al. 1999; Masteller et al. 2000; Baroja et al. 2000; Shigekazu Takahashi et al. 2005). Enfin, ces souris CTLA-4 KO ont de nombreuses similarités avec le phénotype *scurfy* des souris Foxp3 KO, qui sont déficientes en Treg (David M Sansom et L. S. K. Walker 2006). Du reste, l'inactivation génétique conditionnelle de CTLA-4 dans les cellules Foxp3⁺ uniquement (Treg chez la souris) permet à elle seule de reproduire les désordres lymphoprolifératifs observés dans les souris CTLA-4 KO, avec un léger retard (Wing et al. 2008). Le déficit de la fonction des Treg dans la pathologie des CTLA-4 KO semble donc un facteur important et la conservation du frein de CTLA-4 sur les T effecteurs ne permet pas de prévenir ces désordres lymphoprolifératifs (le rôle de CTLA-4 dans la fonction des Treg sera détaillé dans la partie correspondante).

II.2- Le blocage de la costimulation

II.2.1. Stratégies en développement

Depuis la découverte du signal 2 et de la voie CD28/B7, de nombreuses stratégies thérapeutiques s'intéressant à bloquer spécifiquement la costimulation ont été développées pour spécialiser l'immunosuppression. Certaines sont arrivées jusqu'à un développement clinique. C'est notamment le cas des molécules bloquant les deux voies de costimulation les plus étudiées : la voie CD28/B7/CTLA-4 et la voie CD40/CD40L. Nous détaillerons plus précisément le développement des inhibiteurs de la voie de CD28/B7 dans la partie suivante. La première stratégie fut de bloquer l'ensemble de la voie, que j'appelle par conséquent le blocage B7 et non CD28 ; nous évoquerons les anticorps monoclonaux anti-CD80 et anti-

CD86, ainsi que de la protéine de fusion entre la partie extracellulaire de CTLA-4 et la fraction Fc d'une Ig : CTLA4-Ig. La deuxième stratégie est le blocage sélectif de CD28, en ciblant directement cette molécule.

Le blocage de la voie CD40/CD40L, par des anticorps anti-CD40L, connu également un développement important jusqu'en clinique. Je ne reparlerai pas des multiples études chez le rongeur, mais chez le primate le groupe de Kirk A. et coll. a obtenu de très belles prolongations de survie (jusqu'à 10 mois), jamais atteintes en monothérapie avec un anticorps bloquant la costimulation en transplantation d'organes vascularisés. Ils ont également montré que les animaux perdent leur réactivité cellulaire spécifiquement contre le donneur en MLR, mais finissent par développer des alloanticorps et montrer des signes de rejet chronique (A D Kirk et al. 1999). L'anti-CD40L fut également très efficace dans la greffe d'îlots, avec des survies indéfinies (> 476 jours) et une indépendance à long terme de l'insuline chez 6/6 macaques, même après l'arrêt du traitement (N S Kenyon et al. 1999). Malheureusement, le développement de l'anti-CD40L fut brutalement arrêté en Phase II chez l'homme à cause d'importants désordres thrombotiques (S J Knechtle et al. 2001). Pour contourner ce problème, des anticorps dirigés contre CD40 directement ou des molécules de fusion, CD40-Ig, sont en développement expérimental. Chez le primate, l'anti-CD40 humanisé prévient très bien le rejet aigu sous traitement, mais les animaux rejettent tous dans le mois suivant l'arrêt du traitement et développent des alloanticorps après cet arrêt (Imai et al. 2007). La molécule de CD40-Ig, à l'étude en thérapie génique dans notre laboratoire, a donné lieu à de longue prolongation de survie chez le rongeur (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). En revanche, la même stratégie s'est avérée inefficace en monothérapie pour prévenir le rejet chez le macaque, bien que prévenant la réponse humorale *in vitro* et *in vivo* (Angin M, Poirier N, et al. *en préparation*).

D'autres stratégies sont encore en développement dans le but de se substituer à l'immunosuppression pharmacologique. Le **tableau 2** reprend les principales stratégies en développement clinique ou expérimental.

Cible	Nom	Mécanisme d'action	Utilisation / Développement	Références
CD11a (LFA-1)	Efalizumab	Bloque l'adhésion des leucocytes à l'endothélium	Greffe de rein : phase II	Vincenti F. AJT 2007
CD54 (ICAM-1)	BIRR1	Bloque l'adhésion des leucocytes à l'endothélium	Greffe de rein : phase I	Haug C. et al. <i>Transplantation</i> 1993
CD80/86	Belatacept (CTLA4-Ig)	Cible CD80/86 et bloque l'interaction avec CD28 et CTLA-4	Greffe de rein : phase III	Vincenti F. et al. NEJM 2005
CD154	BG9588	Blocage signal CD40L + cytotoxicité	Greffe de rein : arrêté en phase II	Knetchle et al Immunol Rev 2001
CD28	sc28AT	Antagonisme de l'interaction CD28/B7	Bloque le rejet aigu de greffe de coeur et de rein, induit des Treg après greffe chez le primate	Zhang T. et al. WTC (2006), Poirier et al. WTC (2008)
CD30	RM153	Antagoniste CD30/CD30L. Inhibe la migration des T CD4+ alloréactifs	Réduit la GVHD chez la souris	Blazar B. et al. JI 2004
CD40	4D11	Blocage CD40/CD40L	Prolonge la greffe de rein chez les primates	Imai A. et al. <i>Transplantation</i> 2007
CD54 (ICAM-1)	1A29	Bloque l'adhésion des leucocytes à l'endothélium	Induit la tolérance à la greffe de foie chez le rat avec anti-CD25 + CSA	Gassel H. et al. <i>Transplantation</i> 2000
CD134 (OX40)	ATM-2	Bloque les réponses T en synergie avec l'inhibition de CD28/B7, bloque l'inhibition de la fonction des Tregs	Greffe de coeur et de peau chez le rat	Yuan X. et al. JI 2003
CD137 (4-1BB)	anti-4-1BBL Mab	Le blocage 4-1BB/4-1BBL réduit l'expansion des T alloréactifs	Greffe de coeur chez la souris	Cho H. et al. <i>Transpl Int</i> 2004
PD-1 (CD279)	Anti-PD-1 mAb	Bloque l'interaction PD-1/PD-1L	Bloque la tolérance à la xéno greffe d'îlots induite par des anti-CD154	Mai G. et al. <i>Xenotransplantation</i> 2007
ICOS	Anti-ICOS Mab	Bloque la costimulation ICOS/ICOS-L	Synergise avec le blocage de CD40/CD40L ou CTLA4-Ig	Guillonnet C. et al. <i>Transplantation</i> 2005
TIM-1	RMT1-10	Bloque les réponses T activées et mémoires, bloque l'inhibition de la fonction des Tregs	Longue survie de greffe de coeur chez la souris, en association avec la rapamycine	Ueno T, et al JCI 2008

Tableau 2 : Blocage de la costimulation en usage ou en développement clinique (haut) ou étudié expérimentalement (bas) en transplantation (liste non-exhaustive). (D'après Vanhove B., *Medicine Science* 2009)

II.2.2. Stratégies bloquant B7

-2.2.1. Chez le rongeur

Une première stratégie pour bloquer cette voie de costimulation est les anticorps dirigés contre les ligands communs à CD28 et CTLA-4 : les anti-CD80 et CD86. La plupart des études ont ainsi montré que ces anticorps induisent une immunosuppression lorsqu'ils sont combinés, avec un effet également de l'anti-CD86 seul. Ils permettent ainsi de prévenir le rejet de fœtus dans des modèles murins (X. Zhu et al. 2005), de prévenir la GVHD T CD4+ ou CD8+ (B R Blazar et al. 1996) et d'induire une survie à long-terme dans la greffe de peau ou de coeur, avec une inhibition du rejet chronique lorsqu'ils sont associés à un blocage de CD40L (C P Larsen et al. 1996; Woodward et al. 1998). Cependant aucune induction directe de tolérance n'est obtenue *in vivo*, elle est observée uniquement dans des modèles *ex-vivo* où les Treg jouent un rôle au premier plan (P A Taylor et al. 2001). *In vitro*, les anti-CD80/86 induisent également en MLR la génération de macrophages suppresseurs (Tzachanis et al. 2002). C'est un peu plus compliqué dans les pathologies autoimmunes, où le blocage de

CD86 prévient l'apparition du diabète chez les souris NOD mais augmente la sévérité de l'EAE ; alors que le blocage de CD80 accélère l'apparition du diabète chez les NOD mais réduit les signes de l'EAE (Kuchroo et al. 1995; S D Miller et al. 1995; Lenschow et al. 1995).

La molécule de CTLA4-Ig (protéine de fusion entre la partie extracellulaire de CTLA-4 et une fraction constante d'Ig) a été beaucoup plus étudiée ces dernières 18 années. Les résultats démontrent que CTLA4-Ig bloque l'engagement de CD28 pour ses ligands CD80 et CD86 (meilleure affinité pour CD80) et qu'il inhibe les phases précoces de l'activation T (cycle cellulaire, prolifération, différenciation, survie). En revanche, à part les premières observations *in vitro* montrant que CTLA4-Ig induit une anergie des lymphocytes T (Tan et al. 1993), *in vivo* aucun modèle ne confirme ce résultat. En effet, CTLA4-Ig semble plutôt *in vivo* induire une profonde immunosuppression sans induire de régulation T spécifique (Fife et Jeffrey A Bluestone 2008). Seul le mécanisme non-spécifique d'induction d'IDO et de CPA tolérogènes est confirmé *in vivo* dans certains modèles rongeurs de greffes vascularisées (Grohmann et al. 2002; Guillot et al. 2003; Séveno et al. 2007), mais pas dans la greffe de moelle (Pree et al. 2007). CTLA4-Ig prévient de manière efficace et reproductible le rejet aigu et induit une survie à long-terme dans de nombreux modèles de transplantation (cœur, rein, îlots), mais l'induction de tolérance est cependant variable selon l'organe et les modèles utilisés, et non-reproductible (L A Turka et al. 1992; H. Lin et al. 1993; Yin et Fathman 1995; Akalin et al. 1996; X X Zheng et al. 1997, 1999; Fan et al. 2007). En revanche, que ce soit en transplantation cardiaque ou rénale, CTLA4-Ig réduit ou prévient l'apparition du rejet chronique (M. E. Russell et al. 1996; H Azuma et al. 1996; A Chandraker et al. 1998; K S Kim et al. 2001). Il est également efficace dans les modèles de GVHD (B R Blazar et al. 1994), d'EAE (A. H. Cross et al. 1995), de lupus en prévenant la réponse humorale (Finck et al. 1994) et dans l'ischémie-reperfusion (Takada et al. 1997). Par ailleurs, comme les anti-CD80/86, CTLA4-Ig accélère l'apparition du diabète chez les souris NOD (B Salomon et al. 2000) et conduit à une diminution des Treg en périphérie dans d'autres modèles murins (Q. Tang et al. 2003). Enfin, en transplantation, CTLA4-Ig est inefficace si la fréquence des lymphocytes alloréactifs est artificiellement augmentée au préalable (Ford et al. 2007) ou si les souris sont infectées de manière persistante ou chronique par des virus (Matthew A Williams et al. 2002). Son rôle sur les lymphocytes T mémoires demeure, quant à lui, controversé, il pourrait inhiber les cellules mémoires CD4⁺ effectrices mais pas centrales (Ndejemi et al. 2006) et en réduisant la réponse primaire CD8, il pourrait diminuer la

réponse mémoire CD8, mais n'aurait aucun effet sur la génération et maintenance de ces cellules CD8 mémoires (Suresh et al. 2001).

-2.2.2. Chez le primate non-humain (PNH).

Les deux stratégies anti-CD80/86 et CTLA4-Ig connurent un développement préclinique en transplantation rénale et d'îlots (pour CTLA4-Ig uniquement). Plusieurs études chez le PNH ont ainsi montré que l'anti-CD86 a une meilleure efficacité dans la prévention du rejet aigu et que la combinaison des deux anticorps induit une survie plus longue, mais les animaux finissent tous par rejeter et développer des alloanticorps (A D Kirk et al. 2001). En combinaison avec de la rapamycine (Bîrsan et al. 2003; Boulday et al. 2004) ou de la cyclosporine (Ossevoort et al. 1999; B Hausen et al. 2001), les prolongations de survies ne sont pas toujours meilleures et aucune induction de tolérance n'est observée. Associés aux traitements anti-CD40L ou anti-CD40, aucune amélioration nette de survie n'est obtenue, mais seule une inhibition de la production des alloanticorps avec l'addition des anti-B7 (Sean P Montgomery et al. 2002; Krista G Haanstra et al. 2003). Enfin, cette stratégie semble uniquement immunosuppressive sans induire de régulations spécifiques, les Tregs ne semblent pas plus abondantes dans les greffons et des transcripts inflammatoires dans ces derniers sont essentiellement retrouvés (A D Kirk et al. 2001; Hale et al. 2005; Boulday et al. 2004).

CTLA4-Ig est, quant à lui, inefficace en transplantation rénale chez le PNH en monothérapie (médiane de survie à 8 jours) (Christian P Larsen et al. 2005) et montre uniquement un effet en association avec un court traitement anti-CD40L (A D Kirk et al. 1997) sans induire de tolérance. Ce n'est qu'une version améliorée (LEA29Y), ayant une affinité plus forte pour CD80 et surtout CD86, qui donne une efficacité en transplantation rénale en monothérapie (médiane de survie à 45 jours) et en association avec du MMF + stéroïdes (médiane de survie à 155 jours) (Christian P Larsen et al. 2005). Cette nouvelle version a également été testée dans la greffe d'îlots en association avec de la rapamycine et un anti-IL2 récepteur (Adams et al. 2002) et montre, comme dans la greffe rénale, que LEA29Y induit une survie à long-terme sans les inhibiteurs de la calcineurine (CNI) et qu'il diminue le développement des alloanticorps. Une nouvelle fois, la tolérance n'est pas obtenue puisque les animaux montrent une réactivité cellulaire *in vitro* contre leur donneur et que l'arrêt du traitement se solde par des rejets.

-2.2.3. Chez l'homme

Le développement clinique des anti-CD80/86 ne semble pas en cours, en partie à cause du coût de développement et de l'administration de deux anticorps monoclonaux et d'une propriété intellectuelle complexe autour de CD80/CD86. CTLA4-Ig est, lui, développé en clinique dans la polyarthrite rhumatoïde, où il permet d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients (Kremer et al. 2003). LEA29Y, la forme améliorée de CTLA4-Ig, est en cours de développement en transplantation rénale chez l'homme. La phase II multicentrique internationale, incluant un peu plus de 200 patients, a montré que CTLA4-Ig en association avec du MMF + stéroïdes et un anti-IL-2 récepteur, donne la même efficacité à un an que le bras sous Cyclosporine + stéroïdes et l'anti-IL-2 récepteur (Flavio Vincenti et al. 2005). Il permet ainsi de réduire la toxicité due aux CNI et d'avoir une meilleure fonction rénale. Les résultats de la phase III, sur un plus grand nombre de patients, sont attendus pour cette année.

II.2.3. Les anti-CD28

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le blocage de B7 ou CTLA4-Ig ne semble pas être une stratégie optimisée, notamment à cause de l'interaction inhibitrice de CTLA-4 (nécessaire dans de nombreux modèles à l'induction de tolérance) qui est également bloquée. Dans ce cas, le blocage de cette voie en ciblant directement et sélectivement CD28 semble théoriquement une meilleure option (**Figure 9**). Les anticorps anti-CD28 sont divisés en deux classes basées sur leur activité stimulatrice pour les lymphocytes T : les anticorps conventionnels qui induisent un signal costimulateur en synergie avec un signal TCR et les anticorps anti-CD28 superagonistes capables d'induire une activation complète des lymphocytes T de manière indépendante du TCR.

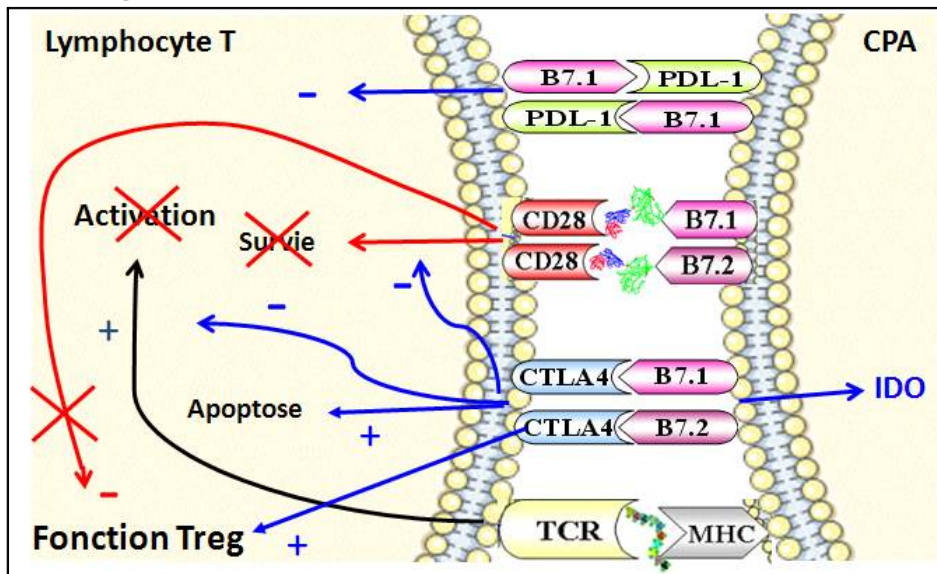
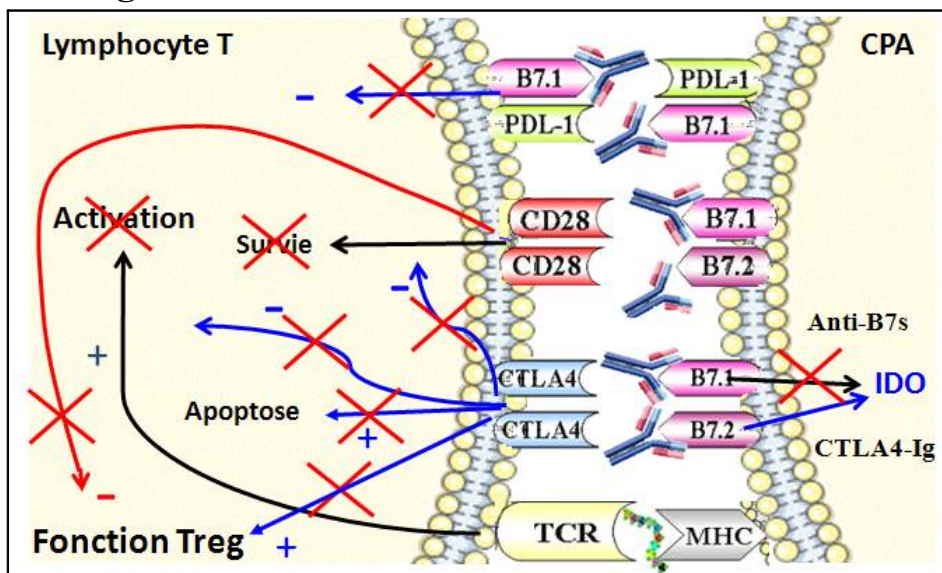
Blocage CD28**Blocage B7**

Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes du blocage de CD28 vs B7.

-2.3.1. Les anti-CD28 conventionnels

Les bivalents agonistes

Le problème en ciblant directement CD28 réside dans le fait que les anticorps conventionnels stimulent l'activation et la prolifération des lymphocytes T en présence d'un signal TCR (J. A. Gross et al. 1992) au lieu de bloquer cette activation en empêchant l'interaction CD28/B7. Cette activité costimulatrice est due à la bivalence de ces anticorps, induisant un « cross-linking » et un « capping » de CD28 à la surface des lymphocytes T, alors qu'un fragment Fab (monovalent) de ces anticorps prévient ce « capping » (Vanhove et al. 2003). Néanmoins,

ces anticorps conventionnels bivalents ont été utilisés dans divers modèles chez le rongeur et ont montré une efficacité, au moins égale au blocage de B7, dans des modèles de GVHD (Beyersdorf et al. 2008; Yu et al. 2004), d'EAE (Perrin et al. 1999), d'EAU (Experimental Autoimmune Uveoretinitis) (Silver et al. 2000) et dans des modèles de réponse à un super-antigène *in vivo* (Beyersdorf et al. 2008). Ces anticorps agonistes *in vitro*, semblent alors se comporter comme des antagonistes *in vivo*. En effet, une étude a pu montrer que ces anticorps peuvent induire une déplétion sélective *in vivo* des lymphocytes T alloréactifs par un mécanisme d'apoptose dépendant de l'IFN- γ (Yu et al. 2004). Cependant, deux autres arguments en faveur de l'activité agoniste de ces anticorps sont l'observation d'une transmigration endothéliale *in vitro* et une migration anarchique des lymphocytes T mémoires dans les organes non-lymphoïdes de manière indépendante du TCR (Mirenda et al. 2007). Dans ce modèle, les cellules T naïves demeurent in affectées par cette stimulation *in vivo*.

Le bivalent modulant

Parmi ces anticorps conventionnels divalents, un anticorps (JJ319) s'est démarqué des autres et a été beaucoup plus étudié dans divers modèles. En effet, bien que cet anticorps costimule les lymphocytes T *in vitro* en présence d'un signal TCR, il induit une internalisation de la molécule CD28 à la surface des lymphocytes T *in vivo* pour une période de 10 à 15 jours sans induire de déplétion de ces cellules (T J Dengler et al. 1999; Victor M Dong et al. 2002; Haspot et al. 2002). Cette internalisation et sa conséquence directe, l'absence d'expression de CD28 à la surface des lymphocytes T, permettent à cet anticorps de se comporter comme un antagoniste. Cet anticorps est ainsi efficace dans les modèles de GVHD (Haspot et al. 2002) où il induit en plus une apoptose des lymphocytes T alloréactifs après quelques cycles de division. En transplantation, chez le rongeur, il permet de prévenir le rejet d'allogreffe rénale (T J Dengler et al. 1999; Haspot et al. 2005; Dugast et al. 2008), cardiaque (Victor M Dong et al. 2002; Guillonnet, Séveno, et al. 2007) et de foie (Urakami et al. 2006). En transplantation rénale, il induit notamment en monothérapie une tolérance donneur spécifique et une inhibition du rejet chronique (Laskowski et al. 2002; Haspot et al. 2005), alors qu'une association avec de la CsA ou une transfusion avec du sang du donneur ou une molécule bloquant la voie CD40/CD40L est nécessaire en transplantation cardiaque et hépatique pour obtenir un état de tolérance et observer une inhibition du rejet chronique (Victor M Dong et al. 2002; Guillonnet, Séveno, et al. 2007; Urakami et al. 2006). Enfin, alors que très peu d'articles font état d'induction de cellules régulatrices lors du blocage de B7, la majorité des études sur le blocage de CD28 décrivent de telles populations : lymphocytes CD4⁺ CD45RC-

Foxp3- pour les uns (Urakami et al. 2006), CD4+ CD25+ Foxp3+ pour d'autres (Azimzadeh et al. article en préparation), mais aussi des cellules non-T IDO+ (Guillonnet, Séveno, et al. 2007) ou encore des cellules MDSC non-T B7+ INOS+ (Dugast et al. 2008).

Les bivalents Fc-silencieux

La liaison des anticorps conventionnels anti-CD28 bivalent aux récepteurs Fc γ R (récepteur γ aux Fc) renforce l'activité agoniste de ces anticorps, c'est pourquoi certains ont généré des modifications dans le fragment Fc de ces anticorps pour qu'ils ne puissent plus être reconnus par les Fc γ R et ainsi limiter l'activité agoniste. Ils permettent ainsi de prévenir le rejet dans des modèles d'allogreffes cardiaques ou de peau (Shiao et al. 2007; Jang et al. 2008) et des modèles de psoriasis (Raychaudhuri et al. 2008). Il est à noter tout de même que ces anticorps possèdent toujours une légère activité agoniste *in vitro*, puisqu'ils augmentent la sécrétion d'IL-2, d'IFN- γ , et la prolifération de lymphocytes T CD4+ ou CD8+ lorsqu'ils sont stimulés par des monocytes ou des cellules endothéliales humaines (Shiao et al. 2007). Ces CPA expriment toutes les deux peu ou pas les molécules B7. En revanche, lorsqu'elles sont transfectées avec CD86, ce même anticorps Fc-silencieux inhibe la sécrétion de cytokines et la prolifération des lymphocytes T. L'activité agoniste de ces anticorps conventionnels bivalents de CD28 ne semble donc pas être due uniquement à une fonction Fc-dépendante et le développement de ces anticorps a été interrompu récemment.

Les monovalents antagonistes

CD28 est un récepteur homodimérique dont la dimérisation est impliquée dans la transduction du signal par l'association de la PI3K à son domaine intracytoplasmique. Ainsi, les anticorps conventionnels bivalents ne peuvent pas être employés en clinique car ils exercent une activité agoniste en présence d'un signal TCR. Un fragment Fab de certains de ces anticorps, en revanche, inhibe l'activation, la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T (Haspot et al. 2002; Vanhove et al. 2003) et peut conduire à l'induction d'anergie *in vitro* (Tan et al. 1993), même en présence d'un signal antigénique. Cependant, de tels fragments d'anticorps monovalents ne peuvent pas être utilisés comme thérapeutiques *in vivo* à cause de leur rapide élimination par l'organisme.

Notre équipe s'est par conséquent intéressée à développer une molécule de fusion monovalente de CD28 (sc28AT ; brevet PCT/FR1 04203 INSERM, 26/12/2001) afin de bloquer sélectivement l'interaction CD28/B7 *in vivo*, sans dimériser et agréger les molécules de CD28 à la surface des lymphocytes T. Cette molécule de fusion est constituée de la partie variable des chaînes lourdes et légères de l'anticorps très affin CD28.3 (Nunès et al. 1993)

cloné dans un format d'anticorps monovalent simple chaîne Fv (scFv) et en fusion avec une molécule humaine d' α 1 anti-trypsine (**Figure 10**) pour augmenter sa demi-vie d'élimination. Sc28AT a un poids moléculaire plus important que le Fab anti-CD28 et est plus stable et plus soluble que le fragment scFv seul. Ainsi, la demi-vie d'élimination chez la souris de sc28AT est augmentée par rapport au Fab original (11,8 heures vs 7,4 heures respectivement), de même que le volume de distribution (sc28AT est retrouvé à 48 heures dans le foie, le rein, l'intestin et la rate, alors que le Fab d'origine ne l'est pas, probablement à cause de l'élimination rénale) (Vanhove et al. 2003). sc28AT, de part sa monovalence, empêche ainsi la transduction de signaux intracellulaires et se comporte donc comme un antagoniste « vrai ». Il possède les fonctions immunosuppressives du fragment Fab de l'anticorps CD28.3 *in vitro* telles que, l'affinité pour le CD28 ($KD= 7 \times 10^{-8} M$), la compétition avec les molécules B7 pour CD28 et l'inhibition de la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T humains (Vanhove et al. 2003).

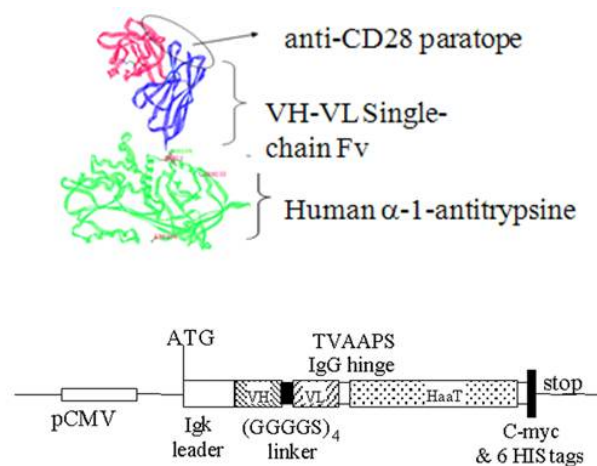


Figure 10 : La molécule sc28AT

sc28AT est une molécule de fusion entre les régions variables des chaînes lourde (VH) et légère (VL) (liés par un linker GGGGS) de l'anticorps anti-CD28.3 de haute affinité et de la protéine sérique alpha 1 antitrypsine. Aspect tridimensionnel (haut) et construction moléculaire de sc28AT (bas). (D'après (Vanhove et al. 2003))

-2.3.2. Les anti-CD28 superagonistes

Chez le rongeur

Les anticorps anti-CD28 superagonistes sont définis par leur capacité à induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T naïfs *in vitro* et *in vivo* en absence de signal antigénique (Tacke et al. 1997). Tous ces anticorps (anti-souris, rat ou humain) ont la particularité de s'accrocher à CD28 de manière latérale (loin de l'épitope reconnu par B7) sur une boucle

C'D (Figure 11) (Lühder et al. 2003). Après ligation, ces anticorps induisent une activation de la voie NFκB sans induire de phosphorylation de ZAP70 ou du TCRζ (Lühder et al. 2003). Il a également été montré plus récemment que les anti-CD28 superagonistes conduisent *in vitro* et *in vivo* (dans le sang et dans la rate, mais pas dans les ganglions lymphoïdes) à l'activation et l'expansion des Treg naturels, de manière plus importante encore que les lymphocytes T conventionnels (C. Lin et Thomas Hünig 2003; Thomas Hünig 2007; H Azuma et al. 2008; Yusuke Kitazawa et al. 2008). Ces superagonistes induisent en fait deux vagues d'activation : une première phase d'activation polyclonale des lymphocytes T suivie par une seconde phase d'expansion des Treg, dépendante en partie de la sécrétion paracrine d'IL-2 secondaire à l'activation T de la première phase (N. Müller et al. 2008; Gogishvili et al. 2009). Cette expansion de Treg semble être à la base des principaux effets observés *in vivo*. Ils permettent notamment une protection efficace et active dans des modèles d'autoimmunité comme l'EAE (Schmidt et al. 2003; Beyersdorf et al. 2005; Tischner et al. 2006). Le transfert de ces Treg activés par un superagonistes permet de transférer la protection à d'autres animaux (Beyersdorf et al. 2005; H Azuma et al. 2008). En allotransplantation, ils permettent d'induire une tolérance spécifique au donneur dans des modèles de greffes rénales (H Azuma et al. 2008), alors qu'en transplantation cardiaque, le rejet est retardé et aucune induction de tolérance en monothérapie n'est obtenue (Yusuke Kitazawa et al. 2008). L'action de ces superagonistes semble également dépendre de leur Fc et du « cross-linking » induit par ces Fc (Tacke et al. 1997). Enfin, une déplétion des lymphocytes conduisant à une lymphopénie transitoire est également observée dans ces modèles rongeurs aux fortes doses de superagonistes (Tacke et al. 1997; Beyersdorf et al. 2005; N. Müller et al. 2008). Néanmoins, contrairement à la situation humaine, cette lymphopénie est bien tolérée et n'est pas accompagnée d'un relargage massif de médiateurs pro-inflammatoires (Beyersdorf et al. 2005; N. Müller et al. 2008), principalement contrôlé et régulé par l'expansion des Treg. Ainsi la déplétion en Treg chez la souris avant l'injection d'un anti-CD28 superagoniste conduit à un relargage systémique massif de cytokines pro-inflammatoires, indiquant que chez le rongeur les Treg activés suppriment efficacement la réponse inflammatoire (Gogishvili et al. 2009).

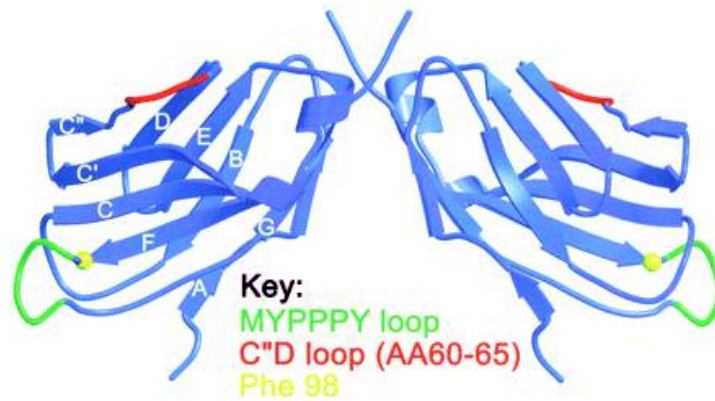


Figure 11 : Représentation des épitopes reconnus par les anti-CD28 superagoniste et conventionnels.

Le motif MYPPPY du site de reconnaissance de B7 est indiqué en vert, l'acide aminé adjacent (Phe 98) critique pour l'accrochage des anticorps conventionnels anti-CD28 de souris et de rats est indiqué en jaune, et la boucle C'D reconnus par les anticorps superagonistes anti-CD28 de souris ou humain est indiqué en rouge. (Figure issu de (Luhder et al. 2003))

Chez l'homme

L'anti-CD28 superagoniste TGN1412 s'est rendue célèbre par une introduction chez l'homme catastrophique. Le 13 mars 2006, à Northwick Park Hospital (Londres), a eu lieu la phase I de l'essai clinique du TGN1412, en développement pour le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques (prolifération monoclonale d'une population mature de [lymphocytes B](#)). L'idée étant que le superagoniste pouvait renverser la déficience en lymphocytes T dans cette pathologie incurable, en induisant une expansion polyclonale de ces lymphocytes T. TGN1412, est un anticorps monoclonal recombinant humanisé superagoniste de CD28 de la classe des IgG4κ. Débutant à 8 heures le matin, par intervalle de 10 minutes seulement, chaque volontaire a reçu une perfusion (de 3 à 6 minutes) intraveineuse de la molécule (0,1mg/Kg) ou du placebo (Suntharalingam et al. 2006). Dans les 90 minutes suivant l'unique injection, les six volontaires ayant reçu TGN1412 ont développé une rapide et violente réponse inflammatoire systémique due à un relargage massif de cytokines inflammatoires et se manifestant par des céphalées, nausées, diarrhées, érythème, vasodilatation et collapsus. 12 à 16 heures après l'injection, les patients ont été sévèrement altérés avec des infiltrations pulmonaires importantes et des CIVD (Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée). Après 24 heures, une déplétion sévère des lymphocytes et des monocytes a été observée en périphérie. Les volontaires ont été rapidement transférés en unité de soins intensifs, où ils ont reçu une importante réanimation cardio-pulmonaires (incluant la dialyse), associés à de fortes doses de méthylprednisolone (corticoïdes) et un antagoniste du récepteur de l'IL-2. Des détresses respiratoires aiguës et cardiovasculaires prolongées chez deux de ces 6 volontaires ont

nécessité une réanimation en continu pendant 8 à 16 jours. Tous ces volontaires sains ont fort heureusement survécu à cet accident.

Les conclusions de l'agence réglementaire du Royaume-Uni (MHRA) sont qu'il n'y a pas eu d'erreurs dans la manufacture, formulation, dilution ou administration (si ce n'est que les 10 min seulement, séparant les injections entre les volontaires) (Schraven et Kalinke 2008) de la molécule qui pourraient expliquer les effets dévastateurs de son injection chez ces volontaires sains. Dans ce cas, la question qui demeure dans tous les esprits est : Comment expliquer cet effet chez l'homme, alors que les tests précliniques étaient concluants ?

Chez le primate non-humain

En se référant aux études précliniques chez le NHP, nous trouvons dans la «brochure investisseur» (TeGenero AG Investigator's Brochure. TGN1412 humanized agonistic anti-CD28 monoclonal antibody. Edition 1.1. <http://www.circare.org/foia5/tgn1412investigatorbrochure.pdf>) que TGN1412 a une affinité pour CD28 chez le macaque cynomolgus (espèce utilisée pour les études précliniques de sécurité et de toxicité) et l'homme similaire. De plus, les FcR sont très conservés entre ces deux espèces (Schraven et Kalinke 2008) et la liaison d'IgG4 par les FcR humains ou de macaques est virtuellement la même. Il n'y a donc pas de différence d'affinité, ou de « cross-link », pouvant expliquer l'absence de toxicité chez le macaque (qui ont reçu jusqu'à 500 fois la dose administrée lors de la phase I). Les macaques traités avec TGN1412 ont uniquement montré une faible induction de cytokines proinflammatoires, telles que IL-2, IL-4 et IL-5, mais aucune augmentation en IFN- γ et TNF- α , et une expansion (4 fois) des lymphocytes T CD4+ et CD8+ en périphérie (accompagnés des marqueurs d'activation CD25 et CD69) pendant une vingtaine de jours. Une autre explication pourrait venir de l'absence de l'expression de molécules inhibitrices Siglecs (CD33) chez l'homme par rapport aux PNH (D. H. Nguyen et al. 2006). Cette étude montre également, que les lymphocytes T de chimpanzé (qui expriment les molécules Siglecs) sont aussi moins répondeurs *in vitro* à une stimulation polyclonale que les lymphocytes T humains (qui ont perdu ces molécules Siglecs). Une étude plus récente a également mis en évidence que TGN1412 induit une réponse calcique dans des lymphocytes T CD4+ humains naïfs ou mémoires, alors qu'il ne le fait pas chez les mêmes cellules issues de macaques (Waibler et al. 2008). Par ailleurs, alors que la séquence de l'épitope reconnu par TGN1412 est parfaitement conservée entre le macaque et l'homme, la séquence de CD28 entre l'homme et le macaque diverge pour 3 résidus transmembranaires (Ohresser et al. 2006). Ces substitutions peuvent altérer les associations de CD28 avec ces partenaires moléculaires,

conférant alors à TGN1412 une signalisation plus faible chez le macaque ou plus forte chez l'homme. Enfin, gardons à l'esprit qu'il s'agit du premier de la classe des SUPERagonistes et que l'effet attendu était bien une activation polyclonale, extra-physiologique, du compartiment T ! L'effet observé chez l'homme n'est autre qu'une SUPER activation de ce compartiment T !

III- Les lymphocytes T régulateurs

Le concept de la suppression des réponses immunes a été largement développé dans les années 1970 (Nishizuka et Sakakura 1969; Gershon et Kondo 1970; Gershon 1975), puis abandonné faute de caractérisation précise de ces cellules. Ce phénomène a ensuite été reprecisé par Sakaguchi qui a décrit le rôle d'une sous-population de lymphocytes T CD4+ exprimant fortement le CD25 (chaîne du récepteur de l'IL-2) dans le contrôle des réactions auto-immunes chez la souris (S Sakaguchi et al. 1995). Depuis, plusieurs populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) ont été caractérisées : des Treg induits dits « Tr1 », sécrétant principalement de l'IL-10 et du TGF- β (Groux et al. 1997), des Treg induits dits « Th3 », produisant de grandes quantités de TGF- β (Y Chen et al. 1994), mais aussi des cellules CD8+ régulatrices comme les CD8+ CD28- Foxp3+ (S Jiang et al. 1998), les CD8+ restreints au HLA-E (Hong Jiang et Chess 2008; Linrong Lu et Cantor 2008) ou les CD8+ CD45RClow (Xystrakis et al. 2004; Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Enfin, d'autres populations T sont également décrites : des CD4+ CD25- (L A Stephens et D. Mason 2000), des CD3+ CD4- CD8- (Z X Zhang et al. 2000), des cellules T $\gamma\delta$ (Mombaerts et al. 1993) et des cellules NKT (Zeng et al. 1999). Les lymphocytes T régulateurs CD4+ CD25+ Foxp3+, naturels ou induits, initialement décrits par Sakaguchi demeurent cependant les plus étudiés et seront plus détaillés dans cette partie.

III.1- Les Treg CD4+ CD25+ Foxp3+

III.1.1. Les Treg naturels (nTreg)

Un des défis majeurs du système immunitaire est de préserver une tolérance aux molécules du soi tout en conservant la capacité d'éliminer des pathogènes étrangers. Pour cela, la tolérance centrale thymique joue un rôle majeur en éliminant les clones autoréactifs. Néanmoins, certaines cellules autoimmunes échappent à ces divers mécanismes et sont retrouvées en périphérie même chez des individus sains (Gallegos et Michael J Bevan 2006). Dans la plupart des cas, la pathologie autoimmune ne se développe pas grâce aux divers mécanismes de tolérance périphérique. Les Treg naturels, CD4+ CD25+ Foxp3+, jouent un rôle primordial dans cette tolérance au soi, ils sont les véritables gardiens de l'autoimmunité (Shimon Sakaguchi et al. 2006). En effet les souris ou humains génétiquement déficients pour le facteur de transcription Foxp3, souffrent tous deux de pathologies autoimmunes diverses (Brusko et al. 2008). Depuis leur redécouverte par le groupe de Sakaguchi, de nombreuses études ont cherché à caractériser phénotypiquement ces Treg naturels, afin de trouver un marqueur plus fiable que le CD25 dont l'expression augmente chez tous les lymphocytes T

activés. Plusieurs marqueurs ont ainsi été retrouvés sur les T CD4+CD25+, notamment CD62L (Szanya et al. 2002), CTLA-4 (S Sakaguchi et al. 1995), PD-1, GITR (Glucocorticoid-Induced TNF-Related protein), CD103 (Curotto de Lafaille et Lafaille 2002), LAG-3 (Ching-Tai Huang et al. 2004) ou la neuropiline (Bruder et al. 2004). Cependant, aucun de ces marqueurs n'est spécifique des cellules régulatrices. Seul le facteur de transcription Foxp3 apparaît spécifique du développement et de la fonction des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ chez la souris (Shimon Sakaguchi 2004), mais est transitoirement exprimé au début de l'activation T chez l'homme et le PNH (Ziegler 2006). Chez l'homme, le récepteur à l'IL-7, CD127, permet de discriminer au sein des cellules CD4+ CD25+ les cellules activées (CD127^{high}) des cellules régulatrices (CD127^{low}) (Weihong Liu et al. 2006).

Ces cellules régulatrices naturelles (nTreg) sont générées dans le thymus avant d'être exportées en périphérie où elles composent 5-10% du répertoire des lymphocytes T CD4+ (M. Itoh et al. 1999). Dans le thymus, une partie des lymphocytes T CD4+ est sélectionnée par la reconnaissance de haute affinité d'antigènes du soi (C. Hsieh et al. 2004). Les cellules médullaires épithéliales, qui expriment les antigènes spécifiques des autres tissus et des molécules de costimulation semblent jouer un rôle primordial dans ce processus (Kyewski et Klein 2006). Elles permettent notamment l'expression de Foxp3 dans les thymocytes de façon dépendante de l'interaction CD28/B7 (Shimon Sakaguchi 2005; Aschenbrenner et al. 2007; Shimon Sakaguchi et al. 2008). D'une part, CD28 est nécessaire à leur génération thymique. En effet, les souris CD28 ou B7 KO ont un important déficit de Treg en périphérie (Rebecca J Greenwald et al. 2005). D'autre part, CD28 agit également en périphérie, comme l'IL-2, pour l'homéostasie et la survie de ces cellules.

III.1.2. Les Treg induits (iTreg)

En plus de cette génération thymique de lymphocytes T régulateurs, des phénomènes similaires, mais aux mécanismes très différents, se produisent en périphérie et sont à la base des vieux concepts de tolérance infectieuse (Gershon et Kondo 1971). Ainsi, des lymphocytes T CD4+ CD25- naïfs peuvent être convertis en lymphocytes T régulateurs CD25+ Foxp3+ lors de la présentation de l'antigène en périphérie. C'est à ce niveau que réside la plus grande différence entre les nTreg et les iTreg : les iTreg sont induits après stimulation en périphérie par un antigène du non-soi, ce qui confère à ces cellules un répertoire différent des nTreg qui ont un TCR autoréactif. Les mécanismes à la base de cette conversion d'iTreg sont très nombreux (Curotto de Lafaille et Lafaille 2009). Le plus décrit et étudié est la conversion chez la souris, *in vitro* et *in vivo*, de CD4 naïfs en iTreg lors d'une stimulation antigénique en

présence d'IL-2 et surtout de TGF- β (WanJun Chen et al. 2003). L'intestin semble par ailleurs un organe privilégié pour cette induction puisque les acides rétinoïques qu'il contient favorisent et amplifient de manière importante cette conversion, y compris en présence d'inflammation et de la surexpression de molécule de costimulation (Benson et al. 2007). En effet, dans tous les modèles de génération d'iTreg, la costimulation, en particulier CD86 et CD28, s'avère néfaste et empêche l'induction de Foxp3 dans ces cellules (Kretschmer et al. 2005). Ainsi des CPA B7 KO induisent plus d'iTreg et une stimulation de CD28 par un anticorps « fixé » inhibe de manière dose-dépendante la génération de ces cellules (Benson et al. 2007). Il s'avère donc, qu'un microenvironnement ou des conditions de stimulation « subimmunogéniques », sont à l'origine du défaut d'activation des CD4 naïfs et la génération d'un phénotype suppresseur (Kretschmer et al. 2005; Johnthomas Kang et al. 2008; Belkaid et Oldenhove 2008). Ce phénomène est notamment observé dans l'environnement « subimmunogénique » tumoral ou bien par la présentation de l'antigène par des CPA IDO+, qui outre l'inhibition de l'activation T par la privation en tryptophane, conduisent également à la différenciation en iTreg (Francesca Fallarino et al. 2006; Wei Chen et al. 2008). De même, un environnement riche en Treg favorise la génération d'iTreg venant s'ajouter à celles déjà présentes (Herman Waldmann et Stephen Cobbold 2009). Notons tout de même, que E. Shevach vient récemment de décrire que les divers mécanismes d'induction décrits chez la souris (en partie par son groupe) ne sont pas transposables à l'homme (Ethan M Shevach et al. 2008). En reproduisant les mêmes conditions que chez la souris, ils ne retrouvent pas l'induction de Foxp3 et de phénotypes suppresseurs ou anergiques chez les lymphocytes T humains.

III.1.3. Treg et la costimulation CD28/CTLA-4

La costimulation joue un rôle essentiel dans la biologie des lymphocytes T régulateurs, en particulier la voie CD28/B7/CTLA-4. Il demeure encore quelques confusions et fausses idées, issues en partie des travaux sur les modèles KO, qu'il convient de spécifier.

-1.3.1. Rôle de CD28

Comme pour les lymphocytes T conventionnels, la molécule de costimulation CD28 joue un rôle majeur dans la biologie des Treg. CD28 fut longtemps considéré comme essentiel à tout niveau pour les Treg. En effet, les souris CD28 KO présentent un déficit de Treg en périphérie et dans le thymus, ce qui a permis d'établir le rôle de cette molécule dans la génération de ces cellules (B Salomon et al. 2000; Hélène Bour-Jordan et Blueston 2002; Lohr et al. 2003). De plus, CD28 est nécessaire à la survie et la prolifération homéostatique de cette population

régulatrice (Jeffrey A Bluestone et Abul K Abbas 2003; Yongzhong Liu et al. 2006; Lyddane et al. 2006; Andreas A Hombach et al. 2007), accentuant en périphérie le déficit de génération thymique. Par ailleurs, puisque l'IL-2 est également nécessaire aux Treg, il a longtemps été considéré que l'absence de CD28, qui résulte en une production d'IL-2 altérée, pourrait être à l'origine de ce déficit en Treg. Les nouvelles études ont permis de mieux préciser le rôle de chacun : CD28 sur les Treg est nécessaire à la génération thymique, notamment dans l'acquisition de Foxp3, alors que la prolifération et la survie en périphérie s'avèrent dépendante de CD28 à la fois sur les Treg et sur les T effecteurs, suggérant un rôle de la sécrétion paracrine d'IL-2 (Tai et al. 2005; Shimon Sakaguchi et al. 2008).

En revanche, en ce qui concerne la fonction de ces cellules, les récentes études ont permis d'exclure un rôle de CD28 dans la suppression. La première observation provient des Treg issus de souris CD28 KO qui sont aussi suppressifs *in vitro* que leurs comparses issus de souris sauvages et qui ne requièrent pas CD28 pour s'activer (T Takahashi et al. 2000; S Sakaguchi et al. 2001; Rebecca J Greenwald et al. 2005). De plus, des expériences sur la prolifération et l'homéostasie de ces cellules ont montré que certes CD28 est nécessaire à la prolifération des Treg pour casser leur anergie physiologique, mais durant cette prolifération ou après une stimulation de CD28, les Treg perdent leur fonction suppressive (T Takahashi et al. 1998; Scottà et al. 2008). De même, les Treg sont moins suppressifs s'ils sont activés par des cellules dendritiques matures qui surexpriment B7 (en particulier CD86, le ligand préférentiel de CD28), par rapport à des cellules dendritiques immatures (Yong Zheng et al. 2004). Le blocage de CD86, mais pas de CD80, permet dans ces expériences de restaurer une fonction suppressive normale aux cellules régulatrices. C'est en partie à partir de ces travaux qu'est née la théorie ou le modèle du « rhéostat » de la fonction des Treg décrit en **Figure 12**, où la stimulation de CD28 par CD86 (surexprimé par l'inflammation) permet d'éteindre la fonction de ces cellules (David M Sansom et al. 2003). En revanche, en absence d'inflammation, CTLA-4, exprimé constitutivement sur les Treg et s'engageant préférentiellement avec CD80, permet aux Treg d'exercer leur fonction. Par ailleurs, deux sous-types de Treg Foxp3⁺ chez l'homme ont récemment été décrits en fonction de l'expression ou non de la molécule de costimulation ICOS ; les deux types expriment CD28, mais les Treg ICOS⁺ sont complètement indépendants de la signalisation CD28 pour leur survie et homéostasie (Ito et al. 2008).

Enfin, outre son rôle potentiellement délétère pour la fonction des Treg, CD28 s'avère également néfaste à l'induction de Treg. Cette induction requière des conditions « subimmunogéniques ». En particulier, la surexpression des molécules de B7 sur les CPA

après maturation ou une stimulation directe de CD28 durant la présentation de l'antigène sont autant de facteurs néfastes à l'induction de Treg (Shuang Fu et al. 2004; Benson et al. 2007). En revanche le blocage de CD86, mais pas de CD80, permet de favoriser cette induction (Xuemei Zhong et al. 2007). L'induction de Treg comparant les souris WT et CD28 KO montre que les rendements et pourcentages sont les mêmes malgré la déficience de CD28 et que ces iTreg CD28 KO sont aussi suppressifs que les WT (Lyddane et al. 2006; Fei Guo et al. 2008). Enfin, *in vivo* chez la souris et *in vitro* chez l'homme, les inhibiteurs de mTor (donc en partie de la signalisation de CD28), en association ou non avec de l'IL-2, sont bénéfiques à l'induction de Treg les premiers jours, mais préviennent leur accumulation en bloquant les signaux de prolifération et de survie (Long et Buckner 2008; Johnthomas Kang et al. 2008).

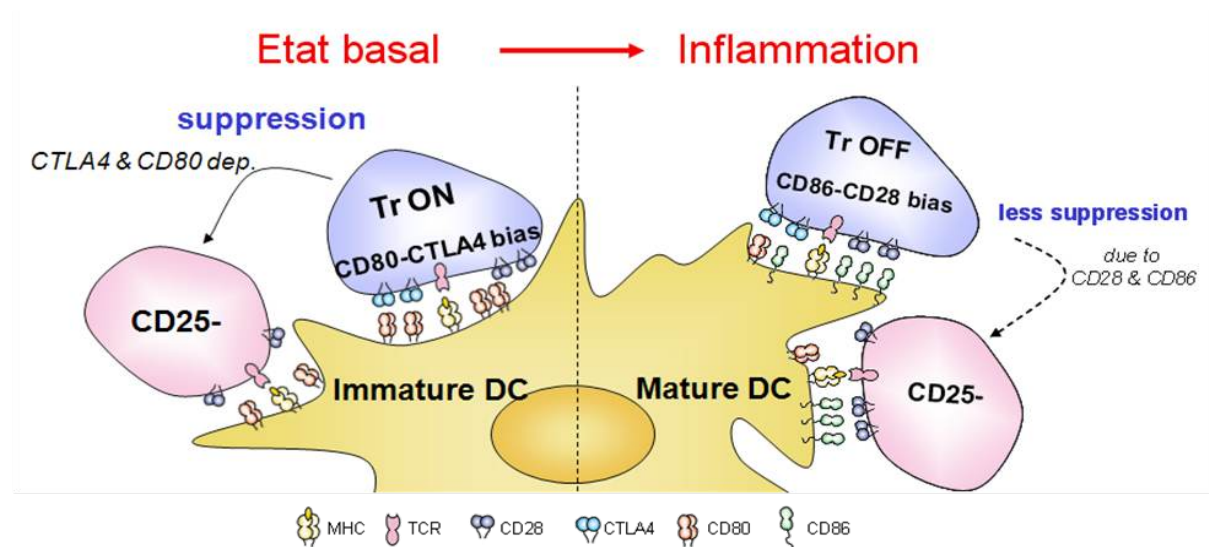


Figure 12 : Théorie du modèle du « rhéostat » pour la fonction suppressives des Treg.

En absence d'inflammation, les Treg (exprimant constitutivement CTLA-4) s'engagent avec les cellules dendritiques immatures (exprimant principalement CD80 dans ces conditions) et exercent leur fonction suppressives sur les lymphocytes T effecteurs. En présence d'inflammation (comme du LPS), les cellules dendritiques matures surexpriment rapidement et fortement CD86, qui s'engage préférentiellement avec CD28 via le biais CD80-CTLA-4, conduisant à une inhibition de la fonction de ces Treg.

(D'après (David M Sansom et al. 2003))

-1.3.2. Rôle de CTLA-4

Les Treg sont les seuls lymphocytes T exprimant constitutivement CTLA-4 (T Takahashi et al. 2000). Le rôle de celui-ci dans la fonction suppressive de ces cellules a longtemps été débattu : est-ce que cette expression constitutive reflète une confrontation continue avec les antigènes du soi ou bien CTLA-4 joue un rôle précis dans leur régulation ? Diverses études ont ainsi montré que le blocage de CTLA-4 inhibe la suppression des Treg *in vitro* et *in vivo*, alors que le blocage du TGF- β l'inhibe de manière non-reproductible dans les modèles *in vitro* et *in vivo* (T Takahashi et al. 2000; Read et al. 2000; Q. Tang et al. 2004; Friedline et al.

2009). La confusion demeure, puisque l'engagement de CTLA-4 sur les Treg induit la sécrétion de TGF- β et une plus forte suppression, alors que la stimulation de CTLA-4 sur des Treg de souris TGF- β KO ne rend ces cellules que peu suppressives (W Chen et al. 1998). De plus, les Treg CTLA-4 KO, certes moins suppressifs, développent des mécanismes compensatoires rendant leur suppression dépendante de l'IL-10 et du TGF- β (Rebecca J Greenwald et al. 2005). La réelle démonstration du rôle de CTLA-4 dans la fonction suppressive des Treg est, elle, très récente. Wing et coll. ont généré des souris déficientes pour CTLA-4 uniquement dans les cellules exprimant Foxp3 (Ko conditionnel), les Treg chez la souris (Wing et al. 2008). Ces souris développent rapidement un sévère désordre autoimmun en périphérie, similaire à celui des souris CTLA-4 KO, démontrant que la déficience de CTLA-4 dans les Treg uniquement est suffisante pour causer la pathologie autoimmune et que le maintien de l'expression sur les lymphocytes T effecteurs activés est insuffisant pour la prévenir.

Les mécanismes de suppressions dépendant de CTLA-4 sont divers. Ainsi Fallarino et coll. ont démontré que, à la manière de CTLA4-Ig, les Treg peuvent induire une expression d'IDO dans les CPA de façon CTLA-4 dépendante et ainsi générer des CPA tolérogéniques (Francesca Fallarino et al. 2003), favorisant la génération d'iTreg et inhibant l'activation des autres lymphocytes T par la privation du tryptophane. Les Treg peuvent également induire une sous-expression des molécules de B7 sur les CPA par un mécanisme CTLA-4-dépendant (Wing et al. 2008; Onishi et al. 2008), conduisant également à la génération de CPA moins stimulatrices pour les lymphocytes T et favorisant l'induction de Treg en périphérie (condition sous-optimales de costimulation). Enfin, le CTLA-4 des Treg est également nécessaire à la suppression dans le contact direct des Treg avec les T effecteurs qui expriment B7 après activation (Rebecca J Greenwald et al. 2005). Ainsi, des cellules CD4 CD25- de souris B7 KO sont résistantes à la suppression par les nTreg (Paust et al. 2004).

Enfin, une différence importante entre les nTreg et les iTreg est notamment le rôle de CTLA-4 dans la génération de ces cellules. L'expression de Foxp3 et l'acquisition d'un phénotype suppresseur par les CD4 CD25- activés en présence de TGF- β *in vitro* requièrent la surexpression de CTLA-4 (Song Guo Zheng et al. 2006). En revanche, CTLA-4 n'est pas nécessaire au développement thymique des nTreg. De manière cohérente, l'induction d'iTreg a besoin d'une faible expression de B7 sur les CPA (S. Liang et al. 2005). Comme la signalisation CD28 est néfaste dans ce mécanisme, il semble donc que CTLA-4 joue un rôle important dans l'acquisition des fonctions suppressives en périphérie par les lymphocytes T naïfs (Akiyama et al. 2002). Le mécanisme précis demeure inconnu. Un rôle de CTLA-4 dans

l'induction de CPA IDO⁺ est très probable. Or, les CPA IDO⁺ sont clairement identifiées comme cellules favorisant la génération d'iTreg (Andrew L Mellor et Munn 2004; M. D. Sharma et al. 2007; Wei Chen et al. 2008). Enfin, différentes études font part d'une signalisation propre à CTLA-4 pouvant conduire à l'induction de Treg en périphérie. Ainsi, favoriser l'engagement de CTLA-4 (avec des anticorps agonistes de CTLA-4) induit des iTregs *in vivo* et permet de prévenir une pathologie autoimmune (Vasu et al. 2004; Ruobing Li et al. 2007).

III.1.4. Les Mécanismes de suppression

Bien que la molécule CTLA-4 semble primordiale *in vitro* et *in vivo* dans la fonction des Treg, bien d'autres mécanismes ont également été identifiés *in vitro* ces dix dernières années. Il s'avère maintenant que ces cellules disposent d'un arsenal de suppression très varié *in vitro*, dont la vérification *in vivo* doit encore être réalisée (D. A. A. Vignali et al. 2008; Sojka et al. 2008; Q. Tang et Jeffrey A Bluestone 2008; Ethan M Shevach 2009). Par cette diversité de mécanismes et de redondances, les Treg sont ainsi capables d'inhiber une quantité de réponses cellulaires : lymphocytes T (CD4⁺ ou CD8⁺), lymphocytes B, les macrophages, les NK et NKT, les cellules dendritiques, les ostéoblastes et les mastocytes (Ethan M Shevach 2009). Sans entrer dans les détails, deux principaux groupes de mécanismes sont distingués : ceux ciblant les lymphocytes T effecteurs directement et ceux ciblant les CPA.

Concernant l'inhibition directe de l'activation ou de la prolifération des lymphocytes T, nous avons déjà vu le rôle majeur de CTLA-4 dans l'interaction avec B7 des T activés (Paust et al. 2004). Un des premiers mécanismes également décrit est la sécrétion de cytokines suppressives, comme l'IL-10, le TGF- β ou l'IL-35 (McGeachy et al. 2005; Collison et al. 2007; Ruobing Li et al. 2007). De plus, les Treg expriment fortement le récepteur de l'IL-2 (CD25). Ils ont donc la capacité à consommer et à entrer en compétition pour l'IL-2 avec les T effecteurs, les privant de cette cytokine essentielle à leur survie après activation et conduisant à l'induction d'apoptose (Pandiyani et al. 2007). Les Treg après activation peuvent également acquérir des fonctions cytotoxiques (Granzyme A ou B, Perforine) et tuer leurs cibles à la manière des CD8 ou des NK (Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2008). Enfin, un autre mécanisme moins connu implique le rôle de molécules de la famille des galectines. La molécule galectine-1 est notamment fortement exprimée par les Treg humains ou murins et est capable d'induire un arrêt du cycle et une apoptose des lymphocytes T effecteurs (Garín et al. 2007). Ces divers mécanismes ciblant directement et principalement les lymphocytes T

effecteurs, résumés en **Figure 13**, peuvent également être employés par les Treg pour inhiber la fonction des CPA ou d'autres cellules du système immunitaire inné.

Comme pour les lymphocytes T effecteurs, d'autres mécanismes sont plutôt décrits dans l'interaction avec les CPA. Ainsi, CTLA-4 peut induire l'expression d'IDO dans les CPA ou conduire à la sous-expression des molécules B7, voire à la prévention de la surexpression après maturation (Francesca Fallarino et al. 2003; Onishi et al. 2008; Wing et al. 2008). LAG-3 (CD223), un homologue de CD4 qui se lie avec une forte affinité au CMH de classe II, est notamment exprimé par les T après activation ou par les Treg. En se liant au CMH de classe II des CPA immatures, il induit un signal inhibiteur dans la CPA qui inhibe sa maturation et ses capacités de stimulation (B. Liang et al. 2008). Un autre mécanisme, met en jeu l'ATP extracellulaire. En effet, l'ATP extracellulaire est un indicateur pour le système immunitaire de la destruction d'un organe et exerce des effets inflammatoires sur les cellules dendritiques. Les Treg qui expriment CD39 (comme les lymphocytes B ou les cellules dendritiques) sont ainsi capables de réduire cet ATP extracellulaire en AMP, représentant alors un autre mécanisme anti-inflammatoire utilisé par ces cellules régulatrices (Borsellino et al. 2007). D'autres molécules peu connues sont également à la base de mécanisme de suppression. C'est, par exemple, le cas de la neuropiline-1 (Nrp-1) qui est principalement exprimée par les cellules Foxp3⁺ (Sarris et al. 2008) et qui favorise des interactions prolongées avec les CPA immatures. Ainsi les Treg, en restant en contact prolongé avec les CPA, empêchent l'accès aux lymphocytes T effecteurs qui ne peuvent donc pas s'activer (Ethan M Shevach 2009).

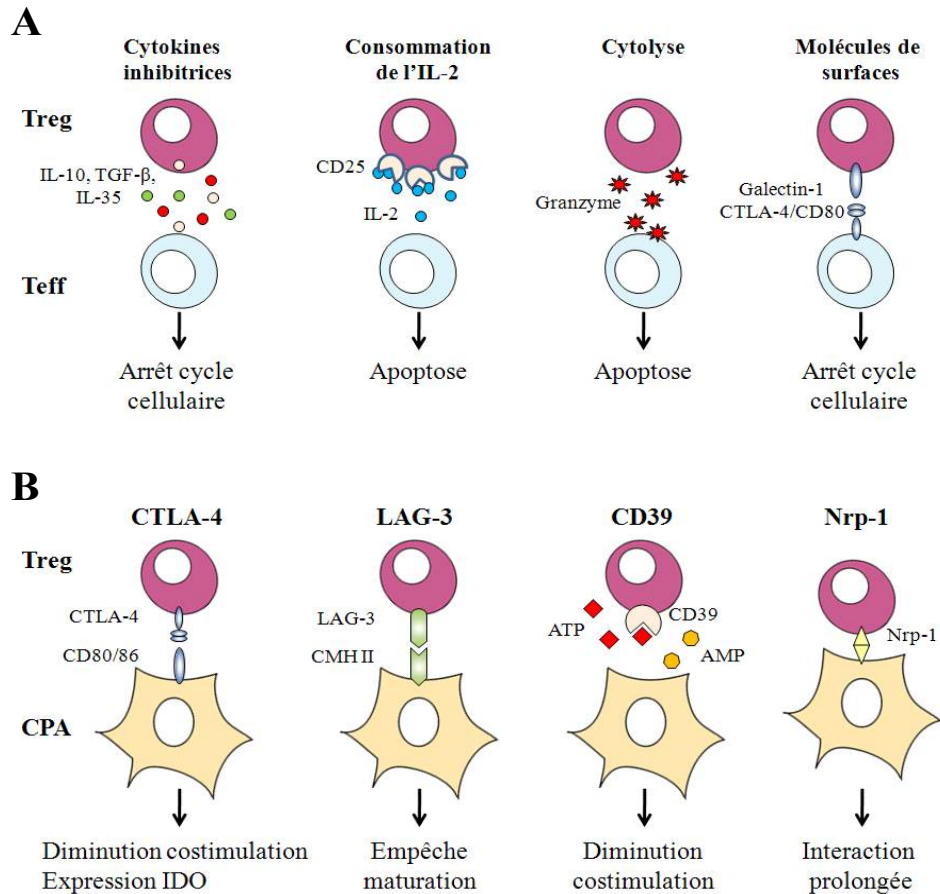


Figure 13 : Principaux mécanismes par lesquels les Treg inhibent directement les lymphocytes T effecteurs (A) ou indirectement (B), en modulant la fonction des CPA. (D'après (Ethan M Shevach 2009))

III.1.5. Treg et transplantation

-1.5.1. Rôle des Treg en transplantation

Le rôle des Treg en transplantation dans les modèles rongeurs a largement été étudié et démontré depuis les premiers travaux sur la tolérance infectieuse (Gershon et Kondo 1971). Nombreux sont les modèles de tolérance où la déplétion de cette population induit rapidement un rejet ou prévient l'induction de tolérance (S Sakaguchi et al. 2001). De plus, récemment Joffre et coll. ont montré que les Treg et la voie de présentation directe de l'antigène préviennent en effet le rejet aigu. Elles sont également capables par les voies de présentation directe et indirecte de prévenir le développement du rejet chronique (Joffre et al. 2008). En revanche, dans les modèles précliniques chez le PNH, le rôle de ces cellules n'est pas encore complètement établi. Alors que certains observent une infiltration interstitielle de cellules CD4⁺ TGF- β ⁺ plus importante dans les animaux « tolérants » en comparaison à ceux qui rejettent après l'arrêt du traitement (Torrealba et al. 2004), d'autres n'observent aucune

augmentation des transcripts de Foxp3 ou de l'infiltration par des cellules CD4⁺ CTLA-4⁺ ou Foxp3⁺ dans les animaux stables sans traitement en comparaison à ceux qui développent un rejet après l'arrêt de l'immunosuppression (K G Haanstra et al. 2007). En pratique clinique, le débat est toujours ouvert, même si de plus en plus d'études montrent un rôle de ces cellules soit dans la tolérance, soit dans la dysfonction chronique du greffon. Ainsi, chez les nombreux patients développant spontanément une tolérance à une allogreffe hépatique, plus de Treg sont retrouvés dans la circulation, les transcripts Foxp3 dans les greffons sont également supérieurs, ainsi que les marquages immunohistologiques (Ying Li et al. 2008). En transplantation rénale, quelques petites études ont montré que les patients ayant une réponse faible *in vitro* contre leur donneur présentent plus de Treg en périphérie et dans le greffon en comparaison à des patients ayant maintenu leur alloréactivité en périphérie (Bestard et al. 2007). Les travaux d'autres équipes de notre laboratoire sur la signature transcriptionnelle de la tolérance dans le sang ont également mis en évidence que les patients en rejet chronique ont une concentration plasmatique en TGF- β inférieure à celle des patients stables ou tolérants, que 27% des gènes qui permettent de différencier les patients en rejet chronique des tolérants sont régulés par le TGF- β et que les transcripts Foxp3 sont plus importants chez les tolérants en comparaison aux patients en rejet chronique (Sophie Brouard et al. 2007).

De plus, une analyse phénotypique a pu montrer que les patients en rejet chronique ont un déficit du nombre de Treg en périphérie, mais pas de la fonction, par rapport aux patients stables ou tolérants. En revanche, il n'y a pas de différence entre les tolérants et les patients stables (Braudeau et al. 2007). Le rôle exact de ces cellules reste donc encore à définir en pratique clinique, notamment en étudiant des cohortes de patients plus importantes et en s'intéressant peut-être plus à l'infiltration du greffon que la quantification en périphérie. En effet, l'environnement local généré par les Treg dans les tissus est bien plus important que leur nombre en périphérie et est probablement à la base des mécanismes de tolérance infectieuse et de suppression liée (Herman Waldmann et Stephen Cobbold 2009). Ainsi, bien que les Treg naturels aient un répertoire autoréactif, leur activation est spécifique de l'antigène mais leur fonction ne l'est pas (comme les iTreg, qui ont un répertoire spécifique de l'antigène étranger). Ainsi, dans un environnement inflammatoire, ils peuvent s'activer via les autoantigènes et réguler l'alloréactivité présente, générant en même temps un environnement anti-inflammatoire propice à la génération d'iTreg (S. Qin et al. 1993).

-1.5.2. Treg et immunosuppression

La principale difficulté en pratique clinique pour étudier l'impact des Treg en transplantation provient de la diversité des protocoles et des cocktails d'immunosuppression. Nombreux sont ceux ayant potentiellement un effet néfaste (parfois bénéfique) sur la régulation immunitaire par ces cellules.

L'immunosuppression chimique

L'immunosuppression chimique, administrée de manière chronique aux patients transplantés, est certainement un des facteurs influençant au plus la biologie des Treg. Ainsi, les inhibiteurs de la calcineurine (CNI), Cyclosporine ou Tacrolimus, sont bien connus pour leurs effets délétères sur cette population. *In vitro*, en réaction mixte lymphocytaire, plusieurs études montrent qu'avec ces molécules les quantités de transcripts et de protéines de Foxp3 sont fortement diminuées et que la suppression de ces cellules l'est également (Carla C Baan et al. 2005; Zeiser et al. 2006; Jeroen J A Coenen et al. 2006; W Gao et al. 2007). *In vivo*, l'injection de CsA affecte la génération thymique de ces cellules et conduit à un déficit du nombre et de la fonction en périphérie (Zeiser et al. 2006; J J A Coenen et al. 2007). Concernant le mycophenolate mofetil (MMF), peu d'études se sont intéressées à son effet sur les Treg. Une étude montre notamment que, *in vitro*, il n'affecte pas l'expression de Foxp3 ou les capacités suppressives de ces cellules en comparaison aux CNI (Zeiser et al. 2006). Aucun travail n'a été fait sur la survie ou la prolifération de ces cellules en présence de MMF *in vivo*, notamment du fait qu'il est exceptionnellement utilisé seul. En revanche, de nombreuses études se sont intéressées à la rapamycine dans la biologie des Treg. Bien qu'inhibiteur de la voie de signalisation de l'IL-2, *in vitro*, elle n'interfère pas avec l'expression de Foxp3 et les capacités suppressives des Treg (Carla C Baan et al. 2005; Game et al. 2005; Zeiser et al. 2006; Jeroen J A Coenen et al. 2006). Plusieurs études montrent même que les Treg semblent plus résistants à l'induction d'apoptose par la rapamycine que les lymphocytes T effecteurs et qu'en coculture ces Treg s'expandent proportionnellement aux autres populations cellulaires (Battaglia, Stabilini, Migliavacca, et al. 2006; Strauss et al. 2007; Keever-Taylor et al. 2007). *In vivo*, plusieurs études confirment cet effet bénéfique sur la prolifération et la survie des Treg et montrent également, qu'en induisant des DC faiblement stimulatrices et une sécrétion de TGF- β , la rapamycine permet également la génération d'iTreg à la base de profondes régulations immunitaires dans divers modèles (Battaglia, Stabilini, Draghici, et al. 2006; Dodge et al. 2000; Valmori et al. 2006; Turnquist et al. 2007). La rapamycine semble ainsi favoriser la survie et la fonction des Treg, tout en inhibant celles des Teff, générant une balance Treg/Teff

favorable à la régulation (Demirkiran et al. 2008). Enfin, concernant les corticostéroïdes, plusieurs études, *in vitro* et *in vivo*, plaident pour un effet bénéfique sur la survie et fonction des Treg, favorisant même l'expression de Foxp3 chez ces cellules résistantes à l'apoptose induite par cette classe de molécule (Polanczyk et al. 2004; Karagiannidis et al. 2004; Dao Nguyen et Robinson 2004; Xin Chen et al. 2006).

Les anticorps thérapeutiques

Parmi les anticorps thérapeutiques en transplantation, les anticorps déplétants sont couramment utilisés en traitement d'induction. Quelques travaux, principalement *in vitro*, ont suggéré que l'effet bénéfique de l'ATG ou de Campath-1 ne serait pas uniquement lié à la déplétion des populations lymphocytaires mais aussi à l'induction ou l'expansion de lymphocytes T régulateurs. Ainsi, l'ATG induit une rapide expansion de Treg dans des cultures de lymphocytes T humains et induit également l'expression de Foxp3 dans d'autres lymphocytes T, leur conférant ainsi un phénotype régulateur (Lopez et al. 2006). *In vivo*, l'injection de sérum anti-lymphocytaire chez la souris ne déplete pas les Treg naturelle (Minamimura et al. 2006) et l'expansion rapide des Treg dans l'environnement lymphopénique semble également être à la base du contrôle d'une prolifération exubérante des autres lymphocytes T (Vanasek et al. 2006). En clinique, Bloom et coll. ont récemment montré que les Treg Foxp3⁺ augmentent significativement de manière importante par rapport aux lymphocytes T effecteurs chez les patients en allotransplantation rénale recevant une induction par du Campath-1 (Bloom et al. 2008).

Les anticorps anti-récepteur de l'IL-2 (anti-RIL-2 : basiliximab, daclizumab), ne semblent pas induire de déplétion lymphocytaire, mais exercent plutôt leur action en bloquant la fixation de l'IL-2 sur son récepteur. Une étude a montré une diminution des transcrits Foxp3 dans des cultures de lymphocytes humains en présence de cet anticorps (Carla C Baan et al. 2005), alors qu'une autre étude montre une sous expression protéique de Foxp3 (Kreijveld et al. 2007). De plus, aucune expansion de cette population n'est observée durant les cultures, suggérant que le mécanisme d'expansion de l'ATG est indépendant d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'IL-2 (Lopez et al. 2006). En revanche, dans des cultures de T effecteurs avec des Treg, les anticorps anti-RIL-2 ne semblent pas interférer dans la fonction suppressives des Treg (Game et al. 2005). D'autres études *in vivo* montrent chez la souris que les anti-RIL-2 peuvent réduire le pourcentage de Treg en périphérie pour certains (Couper et al. 2007), alors que d'autres n'observent pas de diminution du nombre mais de la fonction (Kohm et al. 2006). En dehors du fait que l'IL-2 est une molécule critique pour la survie des Treg, aucune

conclusion fiable ne peut être tirée concernant le rôle des anti-IL-2 pour la régulation des Treg. En clinique, le groupe de Bluestone a récemment montré que le basiliximab induit transitoirement une diminution en Treg en périphérie chez des patients en transplantation rénale, mais qu'il diminue également d'autres lymphocytes T CD25- (J A Bluestone et al. 2008). Dans cette étude, ils montrent également que les patients recevant du CTLA4-Ig (belatacept) + basiliximab n'ont pas moins ou plus de Treg que les patients recevant du basiliximab et de la CsA. Ils en concluent alors que le belatacept n'affecte pas les Treg ; il semble plus précis d'en conclure que le belatacept n'affecte pas plus les Treg qu'un traitement CNI, qui lui est néfaste ! A noter tout de même que dans cette étude, ils observent une infiltration Foxp3+ plus importante dans le greffon des patients ayant reçu du belatacept en comparaison à ceux sous CsA. Une autre étude de Chavez et coll. avait précédemment montré que dans la phase II de belatacept, les patients sous MMF, stéroïdes et belatacept ont une fréquence de Treg en périphérie similaire aux patients recevant de la CsA, du MMF et des stéroïdes (Chavez et al. 2007). Il semble donc que l'inhibition de la voie de costimulation B7/CD28/CTLA-4, en association avec de l'immunosuppression chronique, ne résulte pas en l'induction ou l'expansion de Treg chez l'homme.

IV- Le complément en transplantation

IV.1- L'activation du complément

Le complément représente un des éléments essentiels, avec les anticorps, du système humoral de défense contre les agents infectieux ou dans d'autres réponses immunes humorales comme l'alloimmunité. Il se compose d'une vingtaine de protéines circulantes capables d'interagir avec certaines membranes biologiques. Il n'est pas spécifique d'un antigène et est activé immédiatement par la présence d'un pathogène, il est donc considéré comme une partie de l'immunité innée. D'un autre côté, les anticorps activent certaines protéines du complément, ainsi l'activité du complément fait aussi partie de l'immunité acquise. Le complément stimule l'[inflammation](#) et l'[opsonisation](#), facilite la [phagocytose](#) des [antigènes](#), et [lyse](#) directement certaines cellules. Comme il est un puissant agent inflammatoire, son activité est étroitement régulée. Il y a trois [voies biochimiques](#) qui activent le système du complément : la [voie classique](#) du complément, la [voie alterne](#) du complément et la [voie des lectines](#) liant les mannanes (**Figure 14**).

IV.1.1. La voie classique

La voie classique est activée par le complexe antigène-anticorps et est la principale voie mise en cause dans les rejets à composante humorale en transplantation. Seules les IgG1, IgG3, les IgM, et faiblement les IgG2 sont capables d'entraîner la cascade d'activation. La fixation d'un ou plusieurs anticorps sur sa cible permet à leur région Fc de fixer le C1, premier composant de cette voie, qui est lui-même composé de trois sous-composants : C1q, C1r et C1s. Quand le C1q lie le complexe antigène-anticorps, il active C1r, qui devient protéolytique, et clive C1s initiant la cascade de protéolyse. Le C1 activé clive alors le C4, qui à son tour va cliver le C2 pour former un complexe C4b2a, encore appelé C3-convertase. Cette convertase forme le C4b2a3b, ou C5-convertase, après avoir clivé le C3 en C3b (qui se lie de façon covalente à la surface de la cellule) et en C3a. Le fragment C3b fixé à la membrane (produit à la fois par les voies classique, alterne et des lectines), amorce la cascade de réactions qui conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire (C5b-9), à partir des composants tardifs du complément. Dès lors, la perméabilité de la cellule est perturbée, les petites molécules pénètrent et sortent de la cellule, l'eau entre par osmose faisant augmenter son volume jusqu'à la lyse (**Figure 14**).

IV.1.2. La voie alterne

La voie alterne est la première défense apparue au cours de l'évolution et est la première en jeu lors d'une infection par un germe inconnu de l'organisme infecté, avant une réponse immune spécifique. En effet, son activation n'est pas dépendante de la fixation des anticorps sur l'antigène. Elle est activée par les surfaces cellulaires des bactéries, des cellules infectées par un virus, de certaines levures et de parasites. La voie alterne d'activation résulte de la fixation du C3b sur un site accepteur. Le C3b fixé à une surface peut alors lier le facteur B qui est clivé par le facteur D en Bb et Ba, formant la C3-convertase alterne, ou C3bBb. Cette C3-convertase clive des molécules de C3 pour former un complexe C3bBbC3b, ou C5-convertase alterne. Cette dernière va à son tour cliver le C5 rejoignant ainsi la voie classique (**Figure 14**).

IV.1.3. La voie des lectines

Une protéine globulaire, la Mannose Binding Protein (MBP) de la famille des collectines, peut interagir avec les résidus mannose ou N-acétylglucosamine (GlcNac) des microorganismes. Sa structure est homologue au C1q. Sa fixation sur des mannoses de bactéries active deux sérine-protéases MASP1 et MASP2 ou MASP3 qui clivent et activent C4 et C2, rejoignant ainsi la voie classique (**Figure 14**).

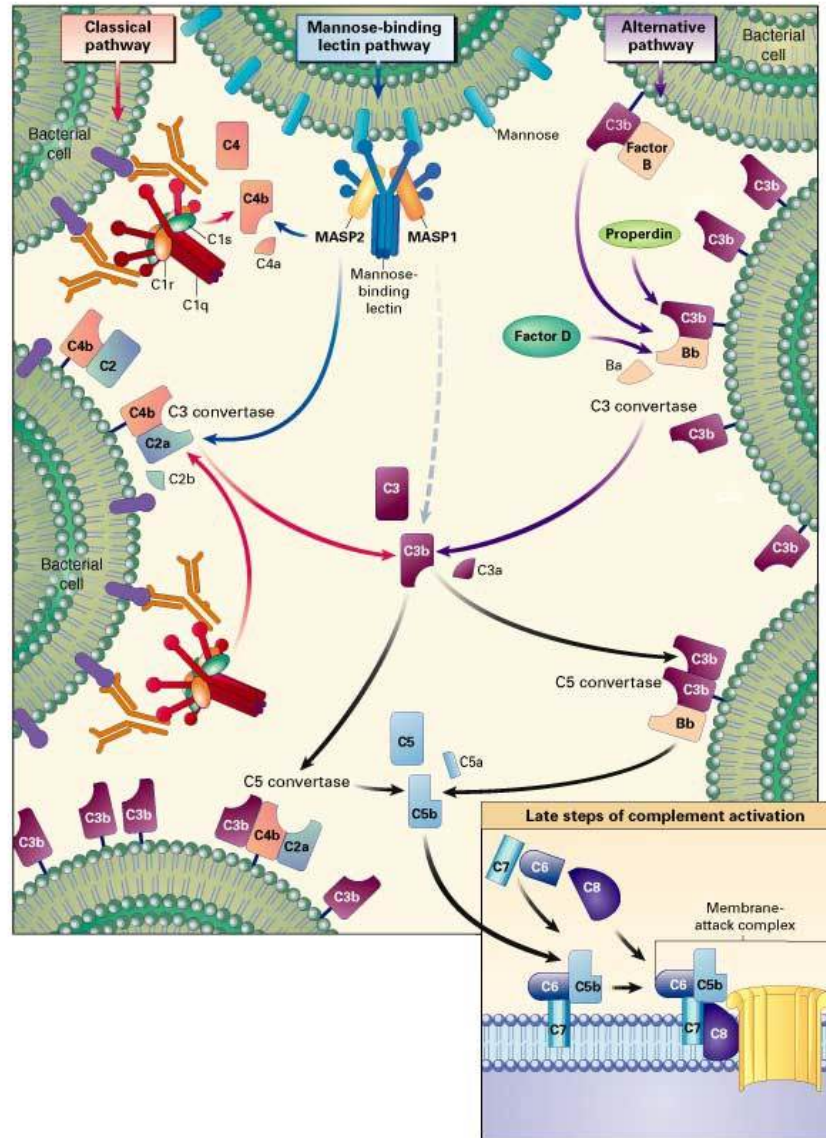


Figure 14 : L'activation du complément par la voie classique, alterne ou des lectines. (Figure issu de (Walport 2001)).

IV.2- Les régulateurs naturels

IV.2.1. Le C1-inhibiteur

Le C1-inhibiteur (C1-INH), ou inhibiteur de la C1 estérase, est un [inhibiteur de protéases à sérine](#) (serpin) et est le premier inhibiteur dans les cascades d'activation du complément. Il inhibe surtout la voie classique du complément en prévenant l'activation du C1r et en inactivant le C1 activé (dès la première étape de l'activation). Cependant de récentes études ont également montré qu'il peut inhiber, *in vitro* principalement, la voie des lectines par l'inhibition des MASP et la voie alterne par liaison avec le C3b (H Jiang et al. 2001; I. G. A. Bos et al. 2002; Erik Waage Nielsen et al. 2007). Ce puissant inhibiteur naturel est utilisé en

thérapeutique pour compenser sa déficience congénitale responsable des crises d'œdème angioneurotique ((Cugno et al. 2009). Il n'a que très peu intéressé la communauté de la transplantation jusqu'à présent, avec seulement des travaux en xénotransplantation à partir de C1-INH plasmatique issu de patient (B Vangerow et al. 2001; Jens M Hecker et al. 2002; Pöling et al. 2006).

Outre son activité d'inhibition de la C1 estérase et donc son efficacité pour bloquer de manière très précoce l'activation du complément, la molécule de C1-INH présente de nombreuses propriétés intéressantes en vue d'une utilisation dans le contexte de la transplantation. En effet, plusieurs études montrent que cette molécule inhibe également l'activation des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) en MLR et la génération de lymphocytes cytotoxiques. Il semblerait qu'il soit capable pour cela de cliver le CMH de classe I par une activité protéolytique (Eriksson et Sjögren 1995; Nissen et al. 1998). De plus, le C1-INH est capable d'inhiber l'activation endothéliale humaine au LPS, par une inhibition de la voie NFκB, conduisant à une déstabilisation des ARNm et une diminution de l'expression de VCAM-1 (Haimou Zhang et al. 2007). Le C1-INH, mais également un dérivé inactif du C1-INH sans site actif protéase (iC1-INH), peut se fixer aux E et P-sélectines des cellules endothéliales et inhibe ainsi l'adhésion leucocytaire *in vitro* et la transmigration *in vivo* (S. Cai et Alvin E Davis 2003; S. Cai et al. 2005). Le C1-INH montre également des effets protecteurs sur les organes contre les lésions d'ischémie-reperfusion (De Simoni et al. 2003; Arumugam et al. 2006), avec notamment plusieurs études cliniques dans l'infarctus du myocarde (Thielmann et al. 2006; Schreiber et al. 2006; Fattouch et al. 2007). Enfin, diverses études montrent également un rôle du C1-INH dans la protection contre le choc septique et endotoxinique (Jansen et al. 1998; Zeerleder et al. 2003; Dongxu Liu et al. 2005). Cette action semble logiquement dépendre de l'inhibition de l'activation du complément et de l'inflammation liée aux nombreuses anaphylatoxines libérées, néanmoins une étude de Liu et coll. a mis en évidence que le C1-INH, mais également le dérivé inactif, prolonge la survie de souris dans un modèle de choc septique (Dongxu Liu et al. 2007). Ils observent notamment une augmentation importante du nombre de bactéries tuées par les neutrophiles et macrophages *in vivo*. Ils observent également que le C1-INH, et le iC1-INH, se fixe *in vitro* à la paroi des bactéries, que cette fixation ne modifie pas la prolifération bactérienne, mais augmente l'activité bactéricide des neutrophiles du sang et des leucocytes du péritoine.

IV.2.2. Autres régulateurs

Le complément est un puissant agent inflammatoire de l'immunité innée, il est par conséquent étroitement régulé par d'autres inhibiteurs que le C1-INH. Un deuxième point de contrôle de l'activité du complément, en amont dans la cascade d'activation, est la C3-convertase, de la voie classique (C4b2a) ou de la voie alterne (C3bBb). Les complexes enzymatiques de ces C3-convertases sont très instables à 37°C conduisant à une dissociation spontanée et une perte d'activité enzymatique irréversible. Cette dissociation spontanée est accélérée par le C4-bp qui par ailleurs sert de cofacteur au facteur I. Ce dernier est un enzyme capable de cliver le C3b et le C4b qui ne peuvent plus participer à la formation de la C3-convertase classique. Le facteur H, cofacteur également de I, se lie spécifiquement au C3b en chassant le Bb de la C3-convertase alterne et en empêchant toute réassociation. De même, le CR1 et le CD46 (MCP), qui servent aussi de cofacteurs à I, et le CD55 (DAF : Decay Accelerating Factor), distribués à la surface de nombreuses cellules comme CD46 (leucocytes, cellules épithéliales et endothéliales) accélèrent la dissociation spontanée des deux C3-convertases.

Le troisième et dernier point de contrôle de l'activation du complément se situe au niveau de la formation et du dépôt du C5b-9 (le complexe d'attaque membranaire) à la surface des cellules. La vitronectine (ou protéine S) s'incorpore dans le C5b-7, le rend hydrophile, et lui confère ainsi une incapacité à s'enchaîner dans la membrane plasmique. La clusterine est capable d'interagir avec les parties hydrophobes du C7, C8 et C9. Elle entre ainsi en compétition avec les composants de la bicouche lipidique des membranes. Ces deux régulateurs inhibent la déposition du complément terminale à la surface des cellules. Enfin, le CD59 (ou HRF20) est un inhibiteur tardif. Après liaison au C8 α , il se lie à la première molécule de C9 se fixant sur le complexe C5b-8 empêchant son déploiement correct indispensable à son insertion dans la membrane plasmique et ainsi à la polymérisation du C9.

IV.3- Réponse cellulaire et complément

Le complément est un système biologique complexe aux effets divers précédemment cités. Outre son activation qui conduit à la lyse directe du pathogène ou son opsonisation et à la production d'anaphylatoxines pro-inflammatoires et chimiotactiques, de nombreux travaux ont mis en évidence que ce système biologique est également impliqué directement dans la réponse cellulaire, notamment les lymphocytes T et les CPA (Kemper et Atkinson 2007). Certes, d'après certains travaux cités précédemment, le C1-INH par exemple peut inhiber la prolifération et la génération de lymphocytes cytotoxiques *in vitro*, les mécanismes impliqués

demeurent cependant inconnus. Les lymphocytes T expriment quelques récepteurs pour le complément (faible répertoire), mais ces récepteurs sont fortement surexprimés après activation. En revanche, les CPA expriment, elles, un large répertoire de récepteurs pour le complément à leur surface, et leur engagement modifie la maturation et l'expression de cytokines par ces CPA (Kemper et Atkinson 2007). Korty et coll. ont montré dès 1991 qu'un anticorps anti-CD59 augmente l'activation T (Korty et al. 1991). Cette année, Sivasankar et coll. ont rapporté que CD59 est surexprimé sur les lymphocytes T CD4⁺ après activation et que le blocage de CD59 *in vitro* augmente significativement les réponses polyclonale ou spécifique d'un antigène des lymphocytes T, confirmant ainsi que CD59 régule la réponse cellulaire (Sivasankar et al. 2009). Les travaux de Peter Heeger sur CD55 (DAF) ont montré un rôle similaire de cet autre régulateur du complément. Ainsi, l'absence de DAF sur les CPA et les lymphocytes T conduit à une augmentation de la prolifération de ces lymphocytes et de la fréquence en lymphocytes T effecteurs induits. Ils mettent notamment en évidence que l'activation locale de la voie alterne est responsable de cette activité, puisqu'elle est dépendante du facteur D et, en partie, du C5 (Peter S Heeger et al. 2005). D'ailleurs, cette étude montre également que les facteurs de la voie alterne sont rapidement produits après contact des lymphocytes T avec les CPA et que DAF est sous-exprimé après ce contact. Un peu plus tard, Lalli et coll. ont démontré que la production locale de complément augmente l'expansion des lymphocytes T en inhibant l'induction d'apoptose, via un mécanisme de surexpression de Bcl-2 dépendant de la PI3K et une sous-expression de la molécule Fas (Lalli et al. 2007). Comme CD59, CD55 semble donc réguler la réponse T en inhibant certaines molécules de l'activation du complément qui, elles, sont responsables d'une costimulation des lymphocytes T (Kemper et Atkinson 2007). Par ailleurs, le complément produit localement durant le contact T-CPA, ne donne pas seulement l'augmentation de la prolifération et de la production de cytokines. Il permet également de maintenir la viabilité et la survie des lymphocytes T naïfs de manière constitutive (Strainic et al. 2008). D'après d'autres études, la stimulation du TCR et de CD46 (MCP) sur des lymphocytes T humains induit la génération de lymphocytes T régulateurs sécrétant de l'IL-10 et produisant du granzyme en grande quantité (Kemper et al. 2003). Enfin, le complément semble également agir directement sur les lymphocytes B, et confère un second signal d'activation lorsque ces lymphocytes B reconnaissent un antigène opsonisé par le complément (R Barrington et al. 2001).

IV.4- Inhibition du complément en transplantation

Le complément jouant un rôle majeur en transplantation (ischémie-reperfusion, rejet à composante humorale, ...) et différentes stratégies, inhibant le complément à différentes étapes, ont été développées afin de traiter le receveur ou bien en agissant directement sur le greffon via le donneur.

IV.4.1. Chez le donneur

Difficilement applicable directement chez l'homme, depuis plus d'une dizaine d'années différentes lignées de porcs transgéniques pour des molécules humaines régulatrices du complément ont été générées pour la recherche en xénotransplantation. Ainsi, des porcs exprimant les molécules CR1 (CD35), MCP (CD46), DAF (CD55) ou CD59 directement dans le greffon ont permis de prévenir en partie les violents rejets hyperaigus à composante humorale en xénotransplantation discordante, preuve que la régulation locale du complément est importante et nécessaire lors des violentes réponses humorales en transplantation (Le Bas-Bernardet et al. 2008). Chez l'homme la thérapie génique du donneur n'est pas possible, mais l'anticipation par un prétraitement du greffon via les machines à perfusion pulsatiles, durant les 10-20 heures séparant le prélèvement de la transplantation, pourrait permettre la mise en place d'une régulation importante du complément au niveau du greffon, dès le déclampage, ce qui atténuerait les lésions d'I/R et permettrait de transplanter les patients hyperimmunisés. C'est ainsi que Fiane et coll. ont montré que la perfusion d'un xéno greffon porcin par du C1-INH plasmatique humain concentré permet de retarder significativement le rejet hyperaigu dans un modèle *ex vivo* de perfusion par du sang humain (Fiane et al. 1999).

Enfin, le complément du donneur semble également une source importante dans la réponse immune et dans le rejet d'allogreffe. En effet, les cellules épithéliales et les tissus vasculaires sont sources de production de complément localement en présence d'inflammation (Andrews et al. 1995). Pratt et coll. ont montré en utilisant des donneurs de rein C3 KO, que l'absence de production de C3 dans le greffon est capable de prévenir le rejet d'allogreffe dans leur modèle murin et que la réponse des lymphocytes T est significativement atténuée *in vivo* et *in vitro*, probablement du à un déficit de « priming » (Julian R Pratt et al. 2002). Une étude clinique a par ailleurs permis de démontrer que le polymorphisme de C3 du donneur dans la greffe de rein influe de manière significative sur la fonction et le devenir du greffon, confirmant chez l'homme que la production de complément par le greffon est une source non négligeable et génératrice d'immunité (K. M. Brown et al. 2006). Ce résultat vient néanmoins d'être contesté par une autre étude démontrant, sur une plus grande cohorte, qu'il n'y a

aucune différence de survie ou d'incidence de rejet en fonction du polymorphisme de C3 du donneur (Varagunam et al. 2009).

IV.4.2. Chez le receveur

Le contrôle de l'activation du complément chez le receveur, à la manière du contrôle de l'activation T, est une stratégie thérapeutique grandissante en transplantation. En effet, le rejet humoral demeure toujours peu réversible avec l'immunosuppression actuelle, qui cible principalement les lymphocytes B et/ou la production d'immunoglobulines. De plus, la composante humorale dans le rejet chronique est maintenant bien établie et est diagnostiquée par la déposition au sein du greffon de fragments issus de l'activation du complément, le C4d (K Solez et al. 2008). De nombreuses stratégies inhibant, à différentes étapes, spécifiquement l'activation du complément ont été développées en transplantation, mais peu sont aujourd'hui disponible en pratique clinique. Ainsi, à partir de C1-INH concentré et extrait de plasmas humains, plusieurs études ont montré que bloquer l'activation du complément dès la première étape, avec une forte immunosuppression, permet de prévenir le rejet humoral hyperaigu en xénotransplantation chez le primate (Fiane et al. 1999; B Vangerow et al. 2001; Jens M Hecker et al. 2002; J M Hecker et al. 2002). D'autres se sont intéressées à inhiber le complément plus en amont, notamment au niveau de la C3-convertase. Le venin de cobra contient, entre autre dans ses toxines, du C3b (CVF= Cobra Venom Factor) qui est résistant à l'action des facteurs I et H humains. La C3-convertase ainsi formée C3b (cobra)- Bb (humain) est très stable et va consommer littéralement tous le C3 disponible, générant ainsi une déficience en facteurs nécessaires à l'activation du complément. Le CVF a été utilisé dans de nombreux protocoles de xénotransplantation ou de greffes ABO-incompatibles en Asie, et est probablement l'une des molécules les plus efficaces dans la prévention de l'activation du complément et dans l'induction d'accommodation (Leventhal, Dalmaso, et al. 1993; Candinas et al. 1996; Jens M Hecker et al. 2002; Lambrigts et al. 1998; G Chen et al. 2001; Gang Chen et al. 2004). Cependant, ce traitement génère des anaphylatoxines C3a et C5a, ainsi que du C3b et C4b qui activent les macrophages et les neutrophiles, ce qui résulte en une inflammation systémique qui limite son utilisation (Candinas et al. 1996). Cette molécule n'est pas approuvée pour une utilisation clinique en Europe et aux Etat-Unis et n'est donc pas utilisable en pratique clinique. Le CR1 soluble (sCR1), qui se fixe au C3b et au C4b, et qui accélère la dégradation de la C3- et C5-convertase, a des effets protecteurs dans les modèles d'I/R, mais a beaucoup moins été étudié dans les modèles de transplantation. Des études chez le rat et le primate ont montré qu'une perfusion de sCR1 permet d'obtenir un léger retard du

rejet en allo et xenotransplantation (Candinas et al. 1996; J R Pratt et al. 1996a, 1996b; Pruitt et al. 1997). Enfin, une autre stratégie pour inhiber l'activation du complément est d'agir encore plus en amont, de bloquer la conversion du C5, empêchant ainsi la formation de C5a et surtout du complexe d'attaque membranaire (C5b-9). Quelques études ont permis de montrer qu'un anticorps anti-C5, associé avec de la CsA, permet de prévenir le rejet humoral aigu dans des modèles de présensibilisation en allo ou xénogreffes chez le rongeur (H Wang et al. 1999; Hao Wang et al. 2005; R P Rother et al. 2008). Plus récemment, le groupe de Montgomery a introduit un anti-C5 (Eculizumab) en transplantation clinique : un seul cas, un individu développant un sévère AMR réfractaire aux stéroïdes, qu'ils ont réussi à traiter avec l'anti-C5 associé aux IVIG, à l'anti-CD20 et une plasmaphérèse (Locke et al. 2009). Enfin, comme le récepteur du C5a (C5aR) est surexprimé en transplantation rénale chez l'homme durant les épisodes de rejet, Gueler et coll. ont proposé d'injecter un antagoniste du C5aR, ce qui a pour conséquence de retarder le rejet dans 75% des cas dans leur modèle d'allogreffe murine, de réduire l'infiltration en macrophages et en neutrophiles et d'atténuer la réponse des lymphocytes T (Gueler et al. 2008). Une autre étude a démontré que la perfusion de greffon avec cet antagoniste du C5aR et une solution de conservation permet de prévenir les lésions de l'I/R (A. G. Lewis et al. 2008).

V- Objectifs :

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, l'induction de tolérance, la chronicité des immunosuppresseurs chimiques et leurs nombreux effets secondaires, ainsi que l'absence ou le manque de thérapeutiques efficaces contre le rejet humoral aigu ou chronique sont les principaux enjeux de la recherche en transplantation. Au cours de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés principalement à deux projets s'articulant autour de ces enjeux.

Le premier projet porte sur l'évaluation préclinique d'un antagoniste monovalent sélectif de CD28 en allotransplantation rénale chez le babouin. Cette stratégie s'étant révélée particulièrement efficace dans les modèles rongeurs (Haspot et al. 2005), notre équipe a par conséquent développé il y a quelques années une molécule de fusion monovalente de CD28 (sc28AT ; brevet PCT/FR1 04203 INSERM, 26/12/2001) afin de bloquer sélectivement l'interaction CD28/B7, sans inhiber la signalisation inhibitrice de CTLA-4. Cette molécule de fusion est constituée de la partie variable des chaînes lourdes et légères de l'anticorps très affin CD28.3 (Nunès et al. 1993) cloné dans un format d'anticorps monovalent single-chain Fv (scFv) et en fusion avec une molécule humaine d' α 1 anti-trypsine pour augmenter sa demi-vie d'élimination (Vanhove et al. 2003). Le travail de thèse a donc été, tout d'abord, d'évaluer la toxicité immunologique de ce réactif chez le primate, en particulier l'absence d'activation polyclonale de type « superagoniste » et d'étudier la pharmacocinétique et pharmacodynamique de cette molécule. Dans un second temps, nous avons étudié l'efficacité de sc28AT et les mécanismes induits par cette molécule *in vitro* et dans notre modèle préclinique d'allotransplantation en collaboration avec Tcl Pharma (Nantes) et le laboratoire de R. Pierson (Université du Maryland, Baltimore, U.S.A). Nous avons également voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle le blocage sélectif de CD28 est plus intéressant car il laisse l'interaction CTLA-4/B7 disponible. Pour cela, nous avons étudié *in vitro* le comportement de lymphocytes T humains en présence d'un blocage de B7 vs CD28. CTLA-4 étant une voie nécessaire à l'induction de tolérance dans de nombreux modèles et à la mise en place de mécanismes de régulation, nous nous sommes également intéressés à étudier le rôle du blocage sélectif de CD28 dans la mise en place de tels mécanismes régulateurs *in vitro* et *in vivo* (**Article I**).

Le deuxième projet porte sur la problématique des rejets aigus à médiation humorale (AMR) en transplantation. En effet, les stratégies thérapeutiques actuelles s'avèrent peu efficace pour prévenir ou traiter ce rejet, avec une réversibilité qui n'est toujours que partiellement obtenue. L'essentiel des connaissances portant sur cette thématique est basé sur les études cliniques et les travaux en xénotransplantation. En effet, il existe peu de modèles animaux en allotransplantation pour étudier les mécanismes et la physiopathologie de ce rejet, et aucun modèle animal préclinique en allotransplantation n'est décrit. La première partie de ce projet a alors été de développer et de décrire un tel modèle préclinique en allotransplantation rénale, en premier lieu chez le porc (**Article II**) pour des raisons éthiques et de coût, puis dans un second temps chez le primate afin de pouvoir bénéficier d'outils d'exploration immunologique et de thérapeutiques directement utilisables chez l'homme. Une fois cette étape validée, nous nous sommes intéressés à l'inhibition précoce de l'activation du complément comme stratégie thérapeutique pour prévenir et/ou traiter l'AMR. Pour cela, nous avons collaboré avec l'entreprise Pharming Group NV (Leiden, Pays-Bas) qui a développé une molécule humaine recombinante du C1-inhibiteur (rhC1INH) produite dans le lait de lapin transgénique. Cette molécule est actuellement en phase III clinique dans l'œdème angioneurotique pour pallier la déficience congénitale. Nous avons donc étudié l'efficacité de cette molécule rhC1INH *in vitro* pour inhiber la cytotoxicité complément dépendante des allo- et xénoanticorps (**Article III**) et *in vivo* dans la prévention de l'AMR dans notre modèle préclinique chez le babouin (**Article IV**).

Résultats

Résultats

I- Projet I

I.1- Article I :

Le blocage sélectif de CD28 induit une régulation immune dépendante de CTLA-4 et favorise les cellules T régulatrices en transplantation d'organe.

Nicolas Poirier*, Agnes M Azimzadeh*, Tianshu Zhang*, Nahzli Dilek, Caroline Mary, Bao Nguyen, Xavier Tillou, Guosheng Wu, Karine Renaudin, Jeremy Hervouet, Bernard Martinet, Flora Coulon, Emma Allain-Launay, Georges Karam, Jean-Paul Soulillou, Richard N. Pierson III*, Gilles Blancho*, et Bernard Vanhove*.

** Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article en revision dans *Science Translational Medicine*.

Titre original : *Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation.*

Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation

One sentence summary: Costimulation blockade targeted at CD28 is an immunosuppressive strategy compatible with the function of Treg cells and promotes immune regulation after heart of kidney transplantation in non-human-primates.

Nicolas Poirier^{1*}, Agnes M Azimzadeh^{2*}, Tianshu Zhang^{2*}, Nahzli Dilek¹, Caroline Mary³, Bao Nguyen², Xavier Tillou¹, Guosheng Wu², Karine Reneaudin⁴, Jeremy Hervouet¹, Bernard Martinet¹, Flora Coulon¹, Emma Allain-Launay¹, Georges Karam¹, Jean-Paul Soullillou¹, Richard N. Pierson III^{2#}, Gilles Blancho^{1#} & Bernard Vanhove^{1#}

¹ INSERM U643, IUN, Centaure network, Nantes, France; ² Department of Surgery, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD; ³TcL Pharma SAS, Nantes, France. ⁴Univ Nantes, UFR of Medicine, Nantes, France.

* NP, AA and TZ contributed equally to the first authorship of this study; # RP, GB and BV contributed equally to the senior authorship of this study.

Correspondence should be addressed to:

Gilles Blancho

ITERT, INSERM U643

CHU Hotel Dieu, 30 Bl J. Monnet

44093 Nantes, France

Tel: +33(0)240 08 74 39

Email: gilles.blancho@chu-nantes.fr

Abstract

Blocking T cell costimulation is a non toxic immunosuppression strategy alternative to calcineurin inhibition in the treatment of immunological disorders. As opposed to current approaches targeting CD80/86, CD28 blockade might preserve regulatory signals mediated by CTLA-4 and favor immune modulation. By using monovalent antibodies, we identified true CD28 antagonists inducing a CTLA-4-dependent decreased T cell function compatible with regulatory T cell (Treg) suppression. In pre-clinical transplantation in primates, blocking CD28 augmented intragraft and peripheral blood Tregs, induced molecular signatures of immune regulation and prevented graft rejection and vasculopathy in synergy with calcineurin inhibition. These findings suggest that targeting costimulation blockade at CD28 favors CTLA-4-dependent immune regulation and promotes allograft survival.

Main Text

Costimulation by molecules of the CD28 family contributes to determining the balance between regulatory and pathogenic effector mechanisms after initial antigen exposure. Targeting the CD28-CD80/86 pathway in patients with CTLA-4-Ig reagents (Belatacept, Abatacept) is a promising alternative to current immunosuppressive treatments in autoimmunity (1, 2) and renal transplantation (3). The current paradigm holds that constitutively expressed CD28 binds CD80/86 to provide a co-stimulatory signal important for sustaining T cell proliferation and proinflammatory responses (4). Furthermore, although CD28 signals are critical for regulatory T cells (Tregs) homeostasis (5), CD28 engagement by CD80/86 molecules can inhibit Treg activity (6). CTLA-4, the other CD80/86 ligand, delivers antiproliferative signals to T-cells (7), triggers indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (8) production in antigen-presenting cells (APCs) and is essential for the suppressive function of Tregs (9) and the induction of tolerance to allografts (10, 11). Recent observations show that CD80/86-specific blocking strategies inhibit CTLA-4 signals crucial to the function of Tregs and do not reproducibly induce transplant tolerance (12, 13). We thus hypothesized that blocking CD28 without affecting CTLA-4 could represent an effective strategy for modulating immune responses by preventing the maturation of pathogenic effectors while preserving the function of Tregs. In this study, we used non-cross-linking selective CD28 antagonists and showed that this treatment decreased the allogeneic immune response against kidney or heart transplant and prolonged allograft survival in two primate models.

CTLA-4 dependent and independent components of CD28 blockade

Sc28AT, a monovalent fusion antibody, competes with CD80/86 for binding to CD28 (14). Since the binding epitope is different from the epitope of superagonistic CD28 antibodies (15) (**Fig. S1A**), it did not induce TCR-independent activation of human (**Fig. S1B**), macaque or baboon (data not shown) T cells *in vitro*. We investigated the consequences of selective CD28 blockade with sc28AT on cognate T cell interactions with APCs by live-cell dynamic microscopy. Sc28AT prevented the formation of stable T cell-APC conjugates, increased T cell motility and reduced T cell activation as measured by calcium flux (**Fig. 1A-C** and **Movies S 1-3**). The effect of sc28AT on conjugate formation and T cell motility was abolished by the simultaneous blockade of CTLA-4 (**Fig. 1A,B**), suggesting that interaction of CTLA-4 with CD80/86 was essential for sc28AT-mediated activity. Even though a minority of T cells still established prolonged contacts with APCs in the presence of sc28AT, these contacts resulted in greatly reduced calcium influx as compared with T cells interacting

with APCs in the absence of CD28 blockade, and this reduction was not reversed by CTLA-4 blockade (**Fig. 1C** and **Fig. S2**) Importantly, sc28AT reduced the proliferation of human and primate T cells in mixed lymphocyte reactions (MLR; **Fig. 2A**) and decreased cytokine release after stimulation of Jurkat T cells with superantigens (**Fig. 2B**).

Compatibility of CD28 blockade with Treg function

The suppression by Tregs of the proliferation of naïve CD4⁺ T cells in response to allogeneic irradiated PBMC was not blocked and even reinforced when sc28AT was added whereas addition of CTLA-4 antagonists blocked the suppression (**Fig. 2C**). To examine the effect of sc28AT specifically on Tregs, Tregs were first activated with allogeneic mature dendritic cells (mDC) in the presence of sc28AT and secondarily tested for their ability to suppress the proliferation of naïve T cells stimulated with allogeneic mDC. Treg suppression was significantly increased when Tregs were primed in the presence of sc28AT whereas it was not modified by CTLA-4 blockade (**Fig. 2D**). Taken together, these data suggest that signals through CTLA-4 and CD28 regulate positively and negatively, respectively, the regulatory activity of Treg. In particular, the enhanced Treg immunosuppression observed following CD28 blockade with sc28AT *in vitro* prompted us to examine the potential effect of this CD28 antagonist in pre-clinical settings *in vivo*.

Selective CD28 blockade in transplantation

To investigate the action of CD28 blockade *in vivo*, we used a life-sustaining kidney transplant model in baboons. The animals were divided into four groups (**Fig. 3A**): 1) without immunosuppressive treatment, kidney transplant were rejected within a week (median graft survival of 6 days) with acute biopsy-proven cellular rejection. 2) With monotherapy with the calcineurin inhibitor Tacrolimus for 90 days, 50% of recipients developed a renal graft failure with a biopsy-proven cellular acute rejection during the first week post transplantation. The other 50% had stable kidney function over the 3-month experiment but developed cellular acute rejection within a week following withdrawal of the drug. The median survival time in this group was 47 days (6, 7, 94, 97 days). 3) Sc28AT induction monotherapy during 25 days (see pharmacokinetic profiles in **Fig. S3A**) modestly, but significantly, prolonged graft survival (median survival time of 11 days). 4) Combined administration of Tacrolimus (0 to 90 days) + sc28AT (0 to 25 days) resulted in a significant increase in graft survival (median survival time of 103 days: 23, 36, 113, 130, 269). Importantly, no rejection episode (clinical or biopsy-proven) developed in any of these bitherapy recipients, even after complete

withdrawal of immunosuppression at day 90. However, three animals in this group were euthanized at day 23, 36 and 130 from pyelonephritis or acute tubular necrosis and one animal was lost at day 113 from an anesthetic accident. Anatomopathological analyses excluded rejection in these animals.

No differences were observed between groups with regards to CD3⁺, CD4⁺ or CD8⁺ T cell infiltration into the graft (**Fig. S4** and data not shown). In contrast, CD20⁺ infiltrating B cells were barely detectable after sc28AT treatment alone or in combination with Tacrolimus whereas they were abundant in kidney graft biopsies from untreated animals or animals treated with Tacrolimus alone (**Fig. S4**). Furthermore, mRNA levels of inflammatory cytokines *IL-6* and *IFN γ* were reduced in kidney graft biopsies one week after transplantation in animals treated with sc28AT in comparison with control untreated animals (**Fig. S5**). In contrast, mRNA levels of *TGF β* as well as *CD25*, *CTLA-4*, *Foxp3* and *HO-1* were increased in sc28AT-treated animals (**Fig. S5**).

Absolute numbers of total lymphocytes and CD3⁺ T cells varied slightly within the normal range after sc28AT treatment (**Fig. 3B** and (16)), revealing that sc28AT did not induce T cell depletion. In addition, the expression of activation markers on T cells was not markedly modified by CD28 blockade (**Fig. 3C, and Fig. S1C**), although we observed an increase in the percentage of CD25⁺ T cells at one week post-transplant in the sc28AT group (**Fig. 3C, right panel**). Serum levels of IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5 or IL-6 cytokines were low and similar in animals receiving sc28AT and controls (**Fig. S1D**). Thus, interaction of sc28AT with CD28 on T cells did not result in polyclonal T cell activation.

To investigate the alloreactivity of peripheral T cells in kidney recipients that received sc28AT and Tacrolimus bitherapy and failed to reject the allograft, we performed ex-vivo MLR. The proliferative response against donor cells was reduced following combination therapy whereas the alloreactive response against cells from a third party animal was preserved, suggesting the acquisition of donor-specific hyporesponsiveness in animals treated with sc28AT and Tacrolimus (**Fig. 3D**).

Increase in Tregs following specific CD28 blockade transplantation

We determined levels of Tregs using multi-parameter flow cytometry. CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Tregs also expressed Foxp3, CTLA-4 and CD28 (**Fig. 4A**). After administration of sc28AT, alone or in combination with Tacrolimus, the percentage of Tregs increased more than twofold within a week to reach 5 to 6% of CD4⁺ T cells as compared with 3% in untreated

recipients and 2% in recipients treated with Tacrolimus alone (**Fig. 4B**). Absolute Treg counts similarly increased two- to three-fold in recipients treated with sc28AT alone or together with Tacrolimus as compared with their pre-treatment levels, and with untreated or Tacrolimus-treated animals (**Fig. 4C**). Animal receiving Tacrolimus alone did not display any change in levels of Treg during the 3-month treatment (**Fig. 4B-C**). We investigated whether these phenotypically defined Tregs were functional. CD25⁺ PBMC harvested from control Tacrolimus-treated ungrafted baboons were unable to suppress Teff cell proliferation (**Fig. 4D**), in agreement with a previous report showing that CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory activity are barely detectable in peripheral blood of naïve baboons (17). In sharp contrast, CD25⁺ PBMC obtained 90 days after transplant from kidney allograft recipients treated with sc28AT in combination with Tacrolimus were very effective at suppressing Teff proliferation, even at low Treg:Teff ratios (**Fig. 4D**).

T cells expressing Foxp3 and CTLA-4 accumulate in the kidney allograft after CD28 inhibition

We examined kidney biopsies for the presence of Tregs characterized by expression of Foxp3 and CTLA-4. We observed increased infiltration with T cells expressing Foxp3, CTLA-4 or both molecules one week post transplantation in animals treated with sc28AT monotherapy as compared with untreated controls (**Fig. 5A, B**). In recipients that received sc28AT + Tacrolimus, the number of infiltrating Tregs expressing Foxp3 and CTLA-4 was initially low and similar to levels observed in recipients treated with Tacrolimus alone (**Fig. 5C**). However, numbers of infiltrating Tregs increased two- to three-fold within 1 to 3 months after transplantation in recipients treated with sc28AT and Tacrolimus, and Treg infiltration in kidney grafts was dramatically higher in bitherapy recipients in comparison with recipients treated with Tacrolimus alone (**Fig. 5C**).

Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in kidney transplant after CD28 inhibition

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme that is upregulated after engagement of CD80/86 on APCs by CTLA-4 on Teff or Treg cells (18). IDO limits T cell responses by tryptophan deprivation and by the pro-apoptotic action of tryptophan catabolites (19). Comparison of IDO mRNA levels in groups treated with or without sc28AT (alone or in combination with Tacrolimus) showed that selective CD28 blockade was accompanied by a notable increase in intragraft IDO mRNA expression (**Fig. 6A**). IDO expression was detectable by fluorescence microscopy in graft biopsies from sc28AT-treated recipients (**Fig.**

6B) in association with CD31⁺ endothelial cells (**Fig. 6C**), DC-sign⁺ infiltrating cells (representing a subset of immature myeloid cells; **Fig. 6D**) and actin⁺ smooth muscle cells (**Fig. 6E**). IDO expression could not be detected in graft biopsies from untreated recipients or from recipients treated with Tacrolimus alone (**Fig. 6B** and data not shown).

CD28 blockade inhibits acute and chronic rejection of heart allografts in macaques in synergy with calcineurin inhibition

We tested sc28AT in a more stringent model of heterotopic heart transplantation in the cynomolgus macaque (20), using sc28AT alone or in combination with a calcineurin inhibitor (Cyclosporine A). The pharmacokinetic profiles are presented in **Fig. S3B**. In macaques treated for 20 days with sc28AT monotherapy at 2mg/kg or 10 mg/kg, cardiac allografts had a median survival of 13 and 34 days, respectively (**Fig. 7A**). Thus, treatment with sc28AT alone resulted in a significant prolongation of graft survival as compared with untreated monkeys (median graft survival time of 6 days). Another group received Cyclosporine A monotherapy that was dosed at 10-25 mg/kg i.m. daily to achieve therapeutic trough levels >400 ng/ml (21). Four out of eight treated animals exhibited symptomatic acute allograft rejection on days 7, 23, 44 and 71. One recipient died of an infection on day 26. The other three recipients exhibited graft survival over 80 days without any evidence of clinical rejection and transplanted hearts were electively explanted around day 90.

When Cyclosporine A was combined with sc28AT at 0.4 mg/kg daily, one out of two animals developed symptomatic rejection at day 49. Importantly, when sc28AT was dosed at 2 mg/kg daily and combined with Cyclosporine A, all three recipients displayed prolonged graft survival over 80 days. One animal was euthanized with a beating graft at day 80 due to a lymphoma and the two remaining functional heart grafts were electively explanted around day 90 in the absence of any detectable clinical rejection. ISHLT rejection scores were consistently lower in protocol biopsies and explanted grafts from monkeys treated with sc28AT + Cyclosporine A as compared with animals treated with Cyclosporine A alone (**Fig. 7**). Remarkably, whereas all grafts treated with Cyclosporine A monotherapy exhibited severe cardiac allograft vasculopathy (CAV) at the time of explant, CAV incidence and severity were significantly reduced when sc28AT was combined with Cyclosporine A (**Fig. 7B, C**).

We analyzed levels of CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Tregs in the blood of two sc28AT monotherapy-treated recipients by flow cytometry. As expected, more than 80% of

CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} Tregs expressed Foxp3 and more than 50% expressed CTLA-4 (data not shown). Tregs represented 3.5±0.1% of CD4⁺ T cells prior to transplantation and their level increased to reach 6.3±0.4% of CD4⁺ T cells at 3 weeks post transplantation in sc28AT-treated recipients (data not shown).

Discussion

Our study addressed the immunoregulatory effect of selective CD28 blockade on kidney and hearts allografts in primates. It had been shown previously in rodents that antibody-mediated CD28 downmodulation delayed acute rejection (22) or inhibited chronic rejection (23, 24) after organ transplantation. However, since human/primate CD28-specific modulating or antagonist antibodies were not available, the hypothesis that CD80/86 interactions with CTLA-4 on T cells in the absence of CD28 signaling lead to regulation of T-cell responses (4) could not be verified in primates or in man where the implication of Treg in transplant outcome is still a matter of debate (25, 26). We previously developed sc28AT, a chimeric human/primate CD28 antagonist (27) and showed here that its effect relied only on blockade of CD28 interactions with its ligands since it displayed neither superagonistic activity on human cells *in vitro* nor T cell activation or depletion properties in primates *in vivo*. Importantly, CD28 blockade by sc28AT synergized with calcineurin inhibitors and resulted in prolongation of kidney or heart allograft survival in non-human primates. Furthermore, our data suggest that selective blockade of CD28 directly impaired effector T cells while promoting regulation provided by Tregs, CTLA-4 and other immunomodulatory mediators such as IDO, HO-1 and TGF- β .

We showed that sc28AT antagonized T cell activation *in vitro* by preventing the formation of stable T-APC conjugates and by increasing T cell motility, which was otherwise reduced after cognate interactions with APCs through a T cell receptor (TCR)-induced stop signal (28). Antagonistic anti-CTLA-4 antibodies reversed the effect of sc28AT treatment, in accordance with findings that CTLA-4 overrides the TCR-induced stop signal (28). In contrast, the reduction of calcium peaks in T cells that established a stable contact with APCs despite CD28 blockade could not be reversed by the simultaneous blockade of CTLA-4. Thus, the mechanism of action of selective CD28 blockade on T cells involves both CTLA-4-dependent and CTLA-4-independent components. Notably, sc28AT resulted in impaired alloreactive T cell proliferation in MLR *in vitro*, which could play a role in prolonging allograft survival *in vivo* by skewing the T_{eff}/Treg balance towards regulation.

An emerging hypothesis presents CD28 and CTLA-4 molecules as a ‘rheostat’ for targeting T cell responses towards immunity or regulation, respectively (29). If CD28 is blocked, then CTLA-4-CD80/86 interactions would be favored and T cell responses would be shifted towards regulation. *In vitro*, we could block the suppressive activity of human Tregs

with anti-CTLA-4 Fab antibodies, similar to what has been shown in mice (30). In contrast, sc28AT did not block but instead increased the suppressive activity of Tregs in accordance with data showing that CD28 stimulation abolishes the suppressive function of Tregs (4).

In kidney or heart allograft transplantation in primates, acute rejection was prevented, chronic rejection was attenuated and functional Tregs were increased following treatment with sc28AT combined with calcineurin inhibitors. Donor specific hyporesponsiveness was demonstrated in the kidney transplant model. Early graft biopsies showed less infiltration by CD20⁺ B cells, which have been associated with severe acute rejection (31). The reduction in B cells infiltration might be attributed classically to a reduced help by T cells or to a direct effect of Tregs on B cells (32). Indeed, sc28AT treatment favored graft infiltration by T cells expressing Foxp3 and, importantly, CTLA-4, which is associated with the suppressive function of Tregs (9). Finally, examination of graft tissue revealed that selective CD28 blockade resulted in reduced levels of inflammatory cytokines but increased expression of immunoregulatory TGF- β , HO-1 and IDO. The effects on B cells and on Tregs might not be relevant for inhibiting early acute rejection that could be controlled only in bitherapy with calcineurin inhibition. However the induced immune regulation might become relevant for subsequent acute and chronic rejection events since allograft survival persisted after withdrawal of the immunosuppressive treatment in bitherapy recipients. Furthermore, the exclusive availability of CD80/86 ligands for CTLA-4 binding and the role of CTLA-4 in immune regulation suggest that CTLA-4 could be important in this process.

It is important to address the potential mechanisms underlying the induction of Treg cells in sc28AT-treated animals. Allogeneic T cells might have been driven to differentiate into Tregs *in vivo* in the absence of CD28 signaling while CTLA-4-CD80/86 interactions could take place. Indeed, although the survival of natural Tregs is strictly CD28-dependent (5), the generation of adaptive Tregs can occur in situations of suboptimal costimulation (33) or in the absence of CD28 signals (34). Additionally, selective CTLA-4 engagement can induce adaptive Tregs with alloantigen specificity (35). The observation that PBMC from kidney graft recipients treated with sc28AT and Tacrolimus were hyporesponsive against donor APCs but not third party cells is compatible with this possibility. In contrast to clinical immunosuppression achieved by a CD80/86 antagonist which was not associated with induction of Tregs and does not rely on immune regulation (36, 37), our findings are consistent with previously reported downstream mechanisms of suppression attributed to

Tregs in transplantation including release of TGF- β , expression of CTLA-4, and induction of IDO and HO-1 enzymes (38).

In summary, our study showed that selective blockade of CD28 costimulation reduced alloreactivity and increased the pool of peripheral Tregs. In addition, Tregs accumulated into the graft where they likely modulated pathogenic T cells and promoted prolonged allograft survival. Whether selective CD28 blockade has significant practical advantages relative to CD80/86 blockade (3), as our model predicts, remains to be formally tested. However, the efficacy of CD28 antagonists in combination with conventional immunosuppression to inhibit acute and chronic allograft rejection in primates is promising for potential clinical applications.

References

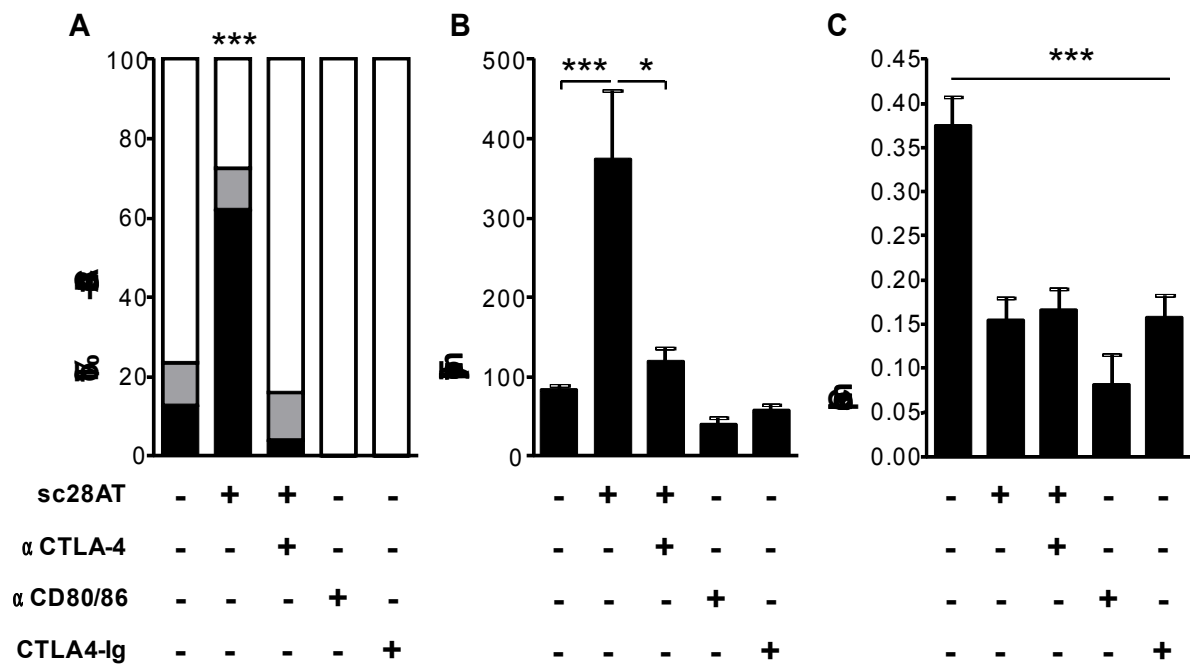
1. M. L. Alegre, K. A. Frauwirth, C. B. Thompson, *Nat Rev Immunol* **1**, 220 (Dec, 2001).
2. J. M. Kremer *et al.*, *N Engl J Med* **349**, 1907 (Nov 13, 2003).
3. F. Vincenti *et al.*, *N Engl J Med* **353**, 770 (Aug 25, 2005).
4. T. Takahashi *et al.*, *Int Immunol* **10**, 1969 (Dec, 1998).
5. B. Salomon *et al.*, *Immunity* **12**, 431 (Apr, 2000).
6. Y. Zheng *et al.*, *J Immunol* **172**, 2778 (Mar 1, 2004).
7. P. Waterhouse *et al.*, *Science* **270**, 985 (Nov 10, 1995).
8. A. L. Mellor, D. H. Munn, *Nat Rev Immunol* **4**, 762 (Oct, 2004).
9. K. Wing *et al.*, *Science* **322**, 271 (Oct 10, 2008).
10. X. X. Zheng *et al.*, *J Immunol* **162**, 4983 (Apr 15, 1999).
11. M. K. Tsai *et al.*, *Transplantation* **77**, 48 (Jan 15, 2004).
12. A. D. Kirk *et al.*, *Transplantation* **72**, 377 (Aug 15, 2001).
13. K. G. Haanstra *et al.*, *Transplantation* **75**, 637 (Mar 15, 2003).
14. J. Nunes *et al.*, *Int Immunol* **5**, 311 (Mar, 1993).
15. F. Luhder *et al.*, *J Exp Med* **197**, 955 (Apr 21, 2003).
16. H. J. Schuurman, H. T. Smith, E. Cozzi, *Xenotransplantation* **11**, 511 (Nov, 2004).
17. C. M. Porter *et al.*, *Xenotransplantation* **14**, 298 (Jul, 2007).
18. D. H. Munn, M. D. Sharma, A. L. Mellor, *J Immunol* **172**, 4100 (Apr 1, 2004).
19. U. Grohmann *et al.*, *Nat Immunol* **3**, 1097 (2002).
20. A. M. Azimzadeh *et al.*, *Transplantation* **81**, 255 (Jan 27, 2006).
21. H. J. Schuurman *et al.*, *Transpl Int* **14**, 320 (Sep, 2001).

22. T. J. Dengler *et al.*, *Transplantation* **67**, 392 (1999).
23. V. M. Dong *et al.*, *Transplantation* **73**, 1310 (2002).
24. C. Guillonneau *et al.*, *J Immunol* **179**, 8164 (Dec 15, 2007).
25. S. Louis *et al.*, *Transplantation* **81**, 398 (Feb 15, 2006).
26. C. M. Alvarez, G. Opelz, L. F. Garcia, C. Susal, *Transplantation* **87**, 857 (Mar 27, 2009).
27. B. Vanhove *et al.*, *Blood* **102**, 564 (Jul 15, 2003).
28. H. Schneider *et al.*, *Science* **313**, 1972 (Sep 29, 2006).
29. D. M. Sansom, C. N. Manzotti, Y. Zheng, *Trends Immunol* **24**, 314 (Jun, 2003).
30. Q. Tang *et al.*, *Eur J Immunol* **34**, 2996 (Nov, 2004).
31. M. Sarwal *et al.*, *N Engl J Med* **349**, 125 (Jul 10, 2003).
32. I. Ludwig-Portugall, E. E. Hamilton-Williams, C. Gottschalk, C. Kurts, *J Immunol* **181**, 4447 (Oct 1, 2008).
33. K. Kretschmer *et al.*, *Nat Immunol* **6**, 1219 (Dec, 2005).
34. M. Belghith *et al.*, *Nat Med* **9**, 1202 (Sep, 2003).
35. R. Li *et al.*, *J Immunol* **179**, 5191 (Oct 15, 2007).
36. H. Chavez *et al.*, *Transpl Immunol* **17**, 243 (Jun, 2007).
37. J. A. Bluestone *et al.*, *Am J Transplant* **8**, 2086 (Oct, 2008).
38. Q. Tang, J. A. Bluestone, *Nat Immunol* **9**, 239 (Mar, 2008).

Acknowledgements

We thank Amal Laaris, Chris Avon, Xiangfei Cheng, Nitin Sangrampurkar, Emily Welty, David Minault, Claire Lefeuvre, Stéphanie Lebas-Bernardet, Philippe Hulin (IFR26, Nantes) and Thomas Haudebourg for their invaluable technical assistance. BV and JPS are shareholders of TcL Pharma, a spinoff company developing CD28 antagonists. This work was supported by the ROTRF grant # 466230972 to BV, by the Progreffe Foundation (Nantes, France) and by TcL Pharma (Nantes, France). This work was also supported by the NIH (UO1 AI 066719), an ASTS Mid-Career Award, a contract from the DOD ORD (N00014-04-1-0821), and an AHA Grant-in-Aid, all to RNP; and by the Other Tobacco Related Diseases research grant from the Maryland Restitution Fund Program, to AA and RNP.

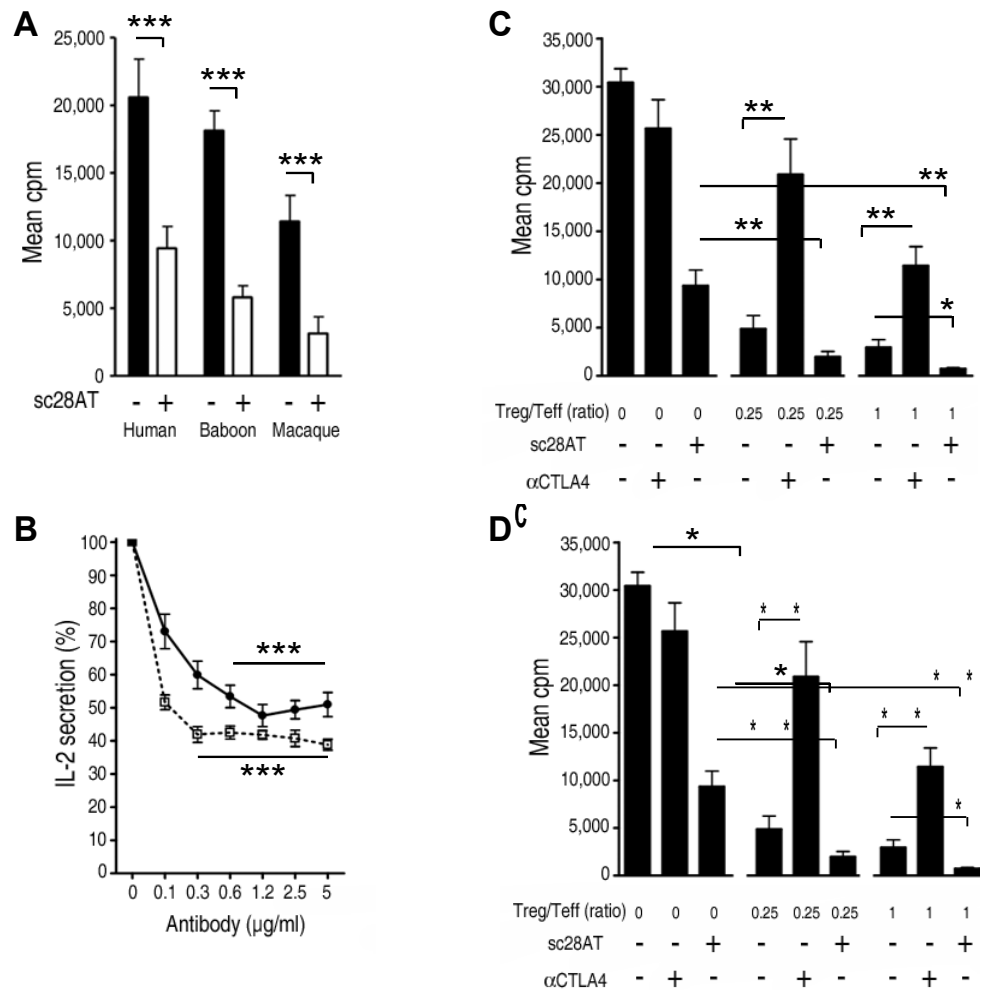
Figure 1



CTLA-4-dependent impairment of T-APC contact after selective CD28 blockade

(A) Time-lapse microscopy evaluation of cognate contacts between EBV-specific T cells and B-EBV APCs in the presence of indicated Ab. Results are shown as % of cells establishing short (≤ 5 min.; black), medium (between 5 and 15 min., grey) and long (≥ 15 min., white) contacts over 20 min. (B) T cells were cultured as in a) and the cumulative distance of individual cells was recorded to assess T cell motility. (C) T cells were cultured as in a) and calcium peaks were recorded and expressed as number of calcium peaks per T cell and per minute of contact time. * and *** indicate a significant difference at $p < 0.05$ and 0.001, respectively.

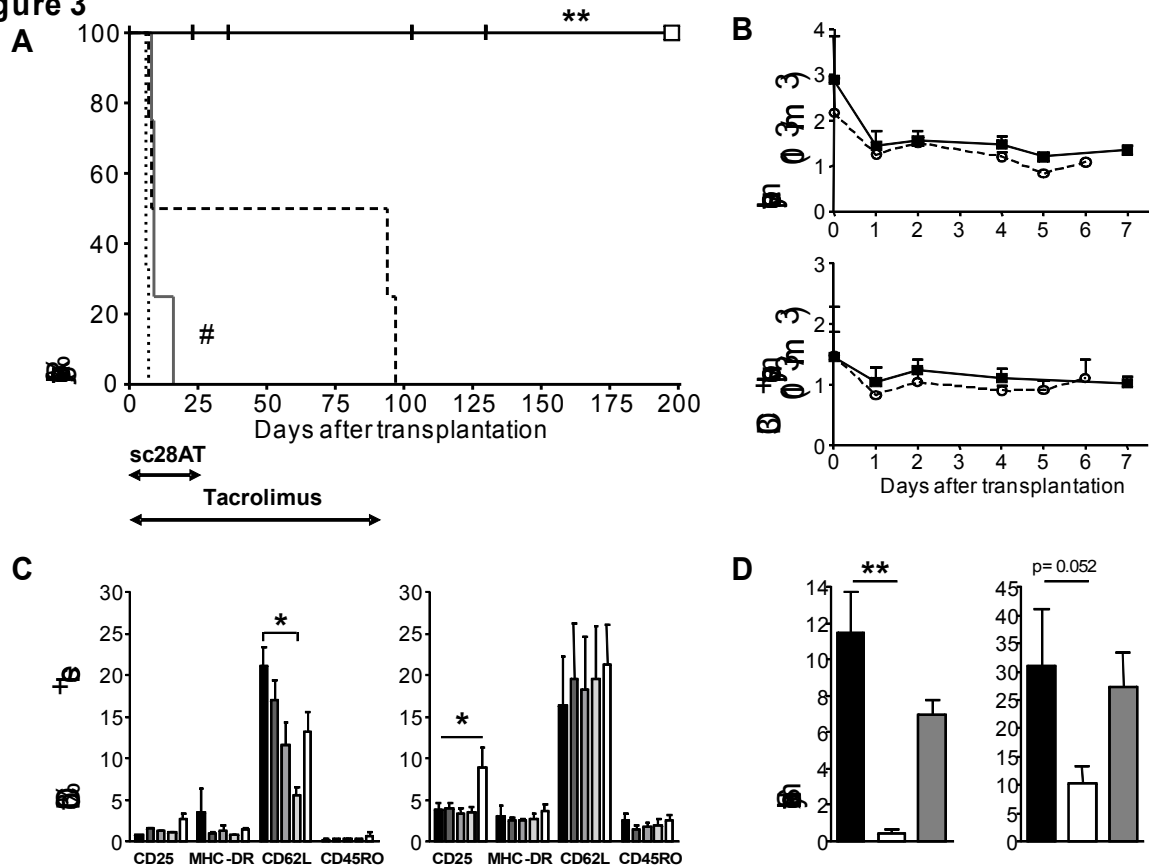
Figure 2



Monovalent CD28 antagonists block allorecognition but do not impede the function of Treg cells *in vitro*.

(A) Mixed-lymphocyte reaction using human (n=10), baboon (n=15) or macaque (n=9) PBMC. Black histogram: mean ±SD in control conditions (mouse irrelevant IgG1). White histogram: mean ± SD with 10 µg/ml sc28AT. (B) IL-2 secretion by Jurkat T cells stimulated with SEE and Raji B cells in the presence of sc28AT (n=8, ●) or CTLA4-Ig (n=3, □). Results are expressed as percentage of IL-2 secretion observed in the absence of Ab (100%). (C) Suppressive activity of human Treg is not impeded by CD28 blockade. Tregs were added to CD4⁺CD25⁻ T cells stimulated with allogeneic irradiated PBMC at the indicated ratio in the presence of 10µg/ml of CD28 or CTLA-4 blocking antibodies. Results are mean cpm ± SD of one representative assay out of 3. (D) Suppressive activity of human Treg pre-treated with CD28 or CTLA-4 blocking Ab. Treg were first cultured with allogeneic mature DC in the presence of sc28AT or anti-CTLA-4 Fab fragments (10µg/ml) for 18h, washed and assessed in a suppression assay. Results are mean cpm ± SD of a representative assay out of 3. *, ** and *** indicate a significant difference at p<0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

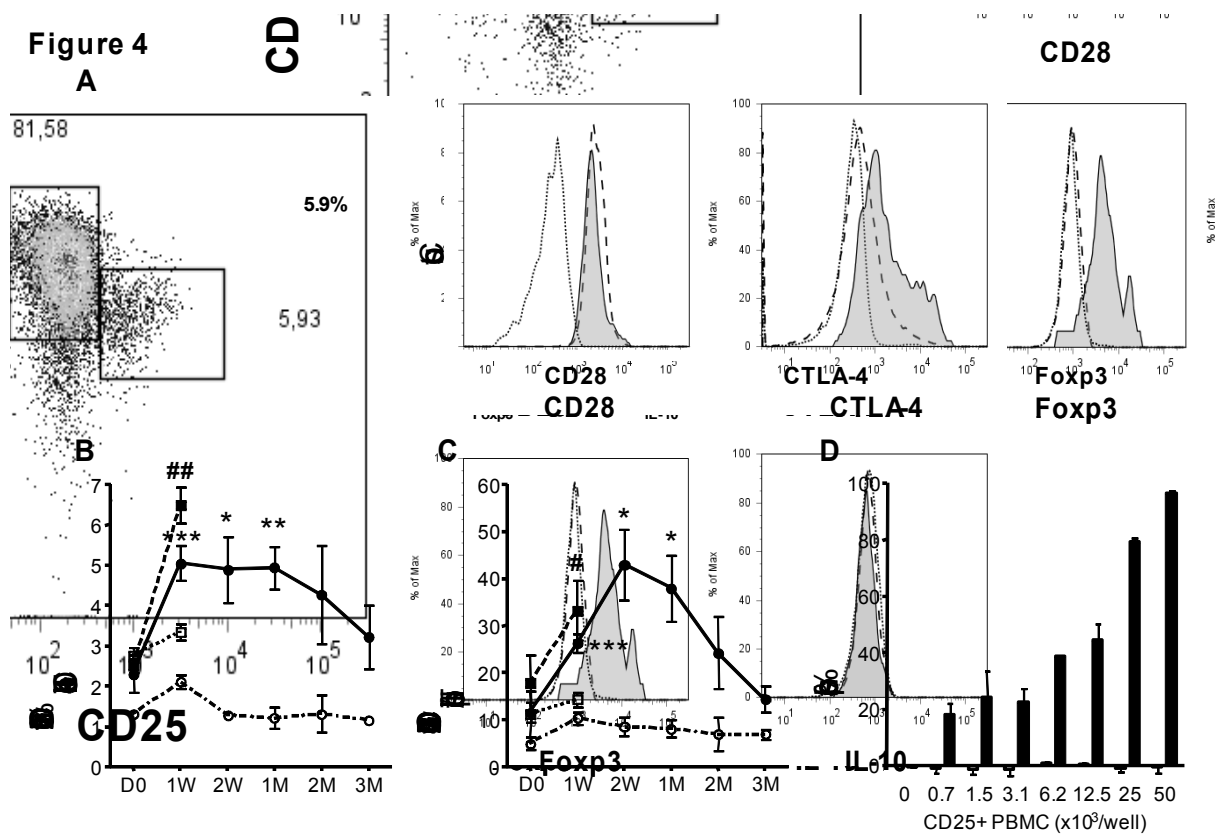
Figure 3



Administration of sc28AT and Tacrolimus prevents kidney allograft rejection in baboons.

(A) Rejection-free survival after renal allotransplantation for baboons without therapy (n=3; dotted gray line) or treated with a 25 day induction therapy with sc28AT alone (n=4; solid gray line), Tacrolimus for 90 days (n=4; dashed black line) and sc28AT + Tacrolimus (25 and 90 days, respectively; n=5; solid black line). Vertical hash marks, death of recipients without graft rejection as assessed by histology. White square, remaining alive baboon. **, p=0.008 versus Tacrolimus monotherapy. ##, p=0.01 versus untreated controls. (B) Total lymphocyte counts (means ± SD, upper panel) and CD3+ T cell counts (lower panel) in untreated recipients (dotted lines, n=3) and recipients treated with sc28AT monotherapy (solid lines, n=4). (C) Phenotype of blood T cells during the first week post transplantation in controls (n=3; left panel) and sc28AT monotherapy recipients (n=4; right panel). Percentages of T cells expressing the specified marker on day 0, 1, 2, 4 and 6 from left (black) to right (white). *, p<0.05. (D) Donor-specific hyporesponsiveness. PBMC harvested from baboons in the bitheraPy group at day 0 and day 90 and tested in MLR against donor and 3rd party cells. Results are mean cpm ± SD of triplicate wells. **, p=0.0014.

(A)

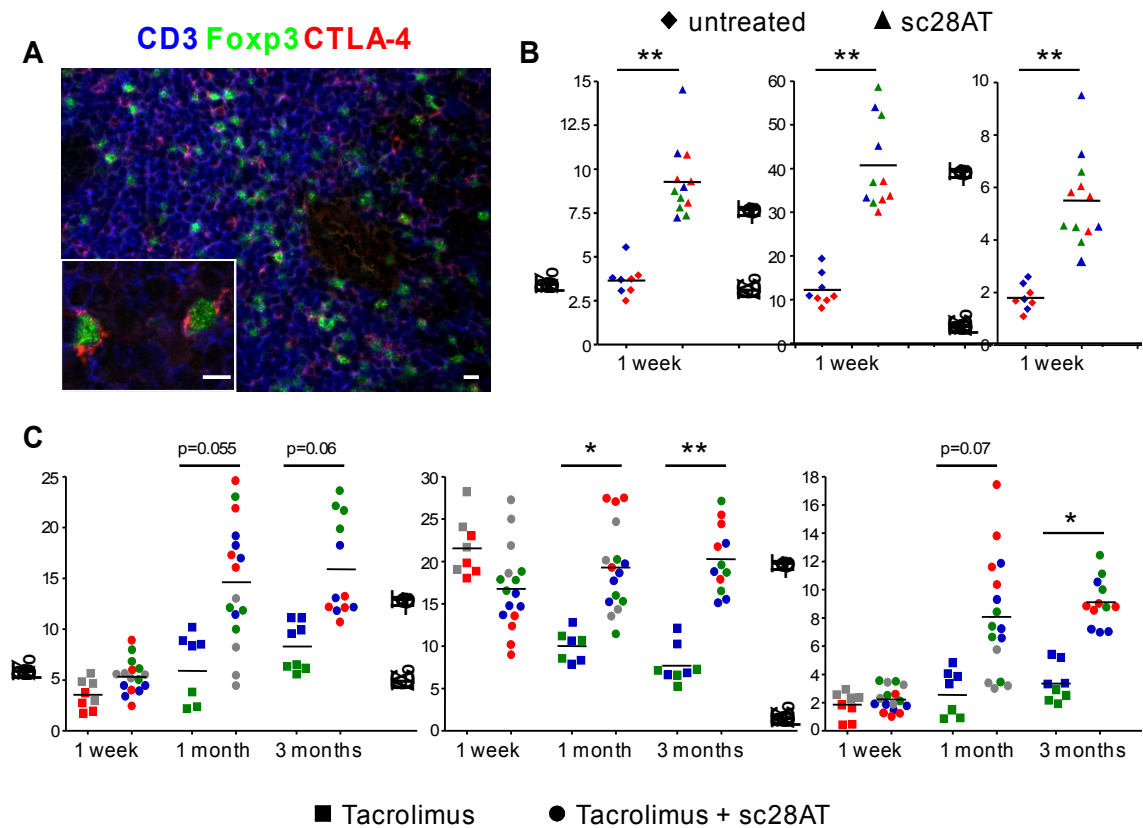


Treg cell enrichment in the peripheral blood of kidney allograft baboon recipients treated with sc28AT.

(A) CD25⁺ CD127^{lo} Treg cells analyzed in blood by flow cytometry after gating on CD3⁺ CD4⁺ cells. These cells also expressed CD28, and intra-cellular CTLA-4 and Foxp3 (dotted histograms, isotype controls; dashed histograms, expression of the indicated markers on CD4⁺CD25⁻ cells; solid gray profiles, expression on target CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} cells. (B-C) Kinetics of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^{lo} Treg levels in blood, percentage of CD4⁺ T cells (B) or absolute number (C), in control untreated animals (\square , n=3), sc28AT monotherapy (\blacksquare , n=4),

Tacrolimus monotherapy (○, n=4 until week 1 and then n=2), sc28AT + Tacrolimus (●, n=5 up to 2 weeks, 4 at 1 month and then n=3). D: days, W: weeks, M: month. # and ##, significant difference with the untreated group (p=0.02 and p=0.0011, respectively). ***, ** and * significant difference with the Tacrolimus monotherapy group (p<0.05, 0.01 and 0.001, respectively). **(D)** Suppressive activity of CD25⁺ PBMC from sc28AT + Tacrolimus recipients at day 90 after transplantation (black bars, n=3) or from control ungrafted baboons treated with Tacrolimus (white bars, n=4).

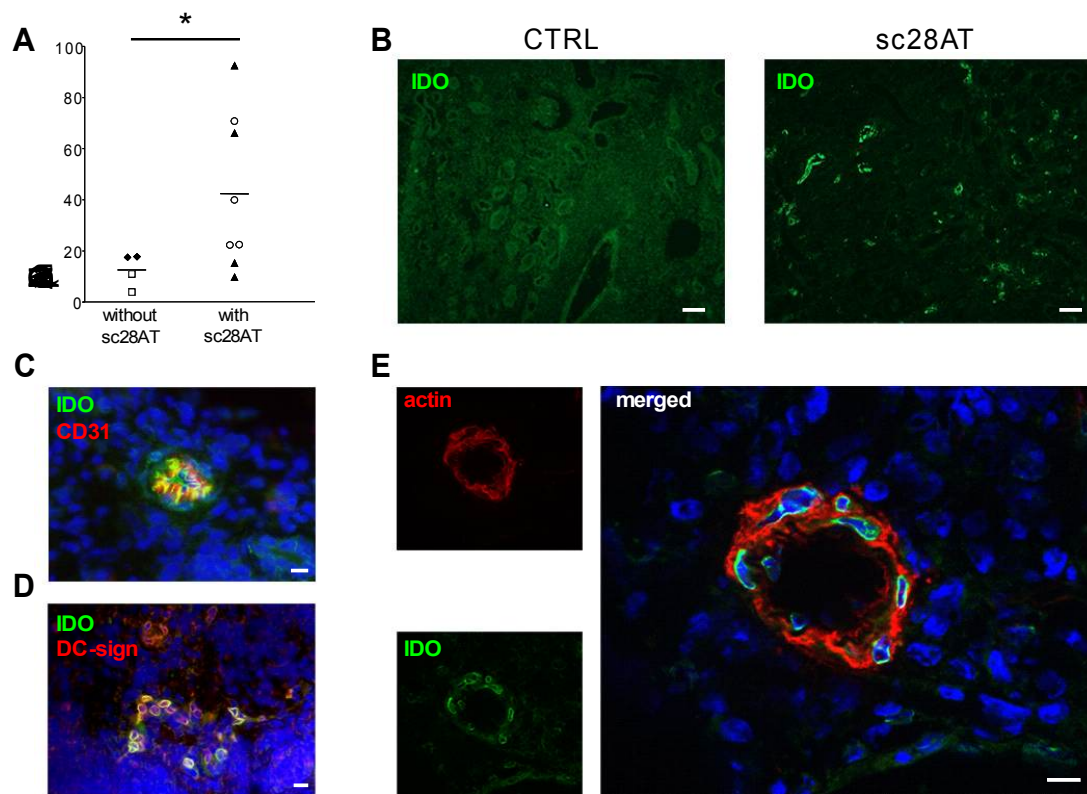
Figure 5



Increased Treg cell infiltration in kidney allografts following selective CD28 blockade with sc28AT.

(A) Confocal-like microscopy analysis of a kidney graft biopsy from a sc28AT + Tacrolimus treated recipient one month post transplantation. Blue, CD3 staining; green, Foxp3 staining; red, CTLA-4 staining. Scale bars: 10µm. (B) Quantitative evaluation of graft infiltration by T cells expressing Foxp3, CTLA-4 or both in control (♦) and sc28AT monotherapy recipients (▲) 1 week post transplant (expressed as % of CD3⁺ T cells). Individual animals are represented with a specific color and 4 individual data points represent quadruplicate evaluations performed on two different tissue sections of the same animal. (C) Same as B) in recipients treated with Tacrolimus alone (■) or sc28AT + Tacrolimus (●) at 1 week, 1 month and 3 months post-transplant. * and ** indicate a significant difference at p<0.05 and 0.01, respectively.

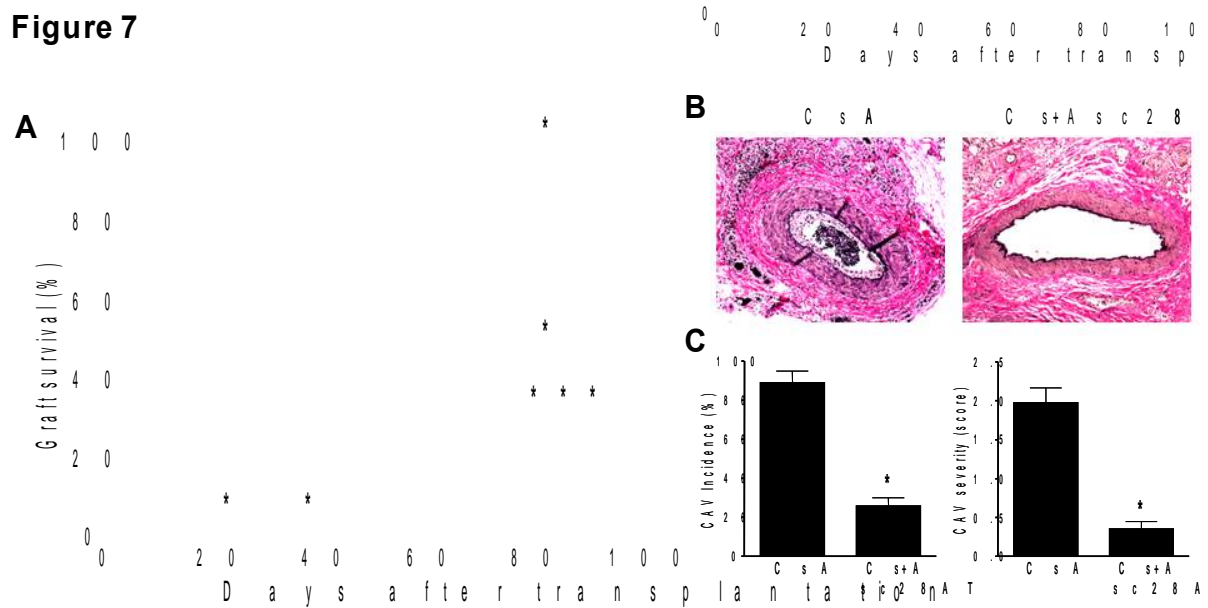
Figure 6



Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in allograft of sc28AT-treated recipients.

(A) qPCR measurement of IDO mRNA transcripts one week post-transplantation in kidney graft biopsies from control untreated (\blacklozenge , n=2) or Tacrolimus alone-treated recipients (\square , n=2), and from sc28AT alone (\blacktriangle , n=4) or sc28AT + Tacrolimus recipients (\circ , n=4). Each point represents the mean of duplicate measurements. *, p=0.04 (B) Immunohistology of biopsies from a control and a sc28AT-treated recipient labeled with an anti-IDO antibody (green color) one week post transplantation. Scale bar: 100 μ m. (C) Co-staining of IDO (green) and CD31, an endothelial cell marker (red color), showing a small blood vessel. (D) Co-staining of IDO (green) and DC-sign, a C-type lectin expressed by immature myeloid cells (red color), in the renal parenchyma. (E) Co-staining of IDO (green) and smooth muscle actin (red), showing co-localization in an arterioli. Nuclei are colored in blue. Scale bars in C, D and E: 10 μ m.

Figure 7

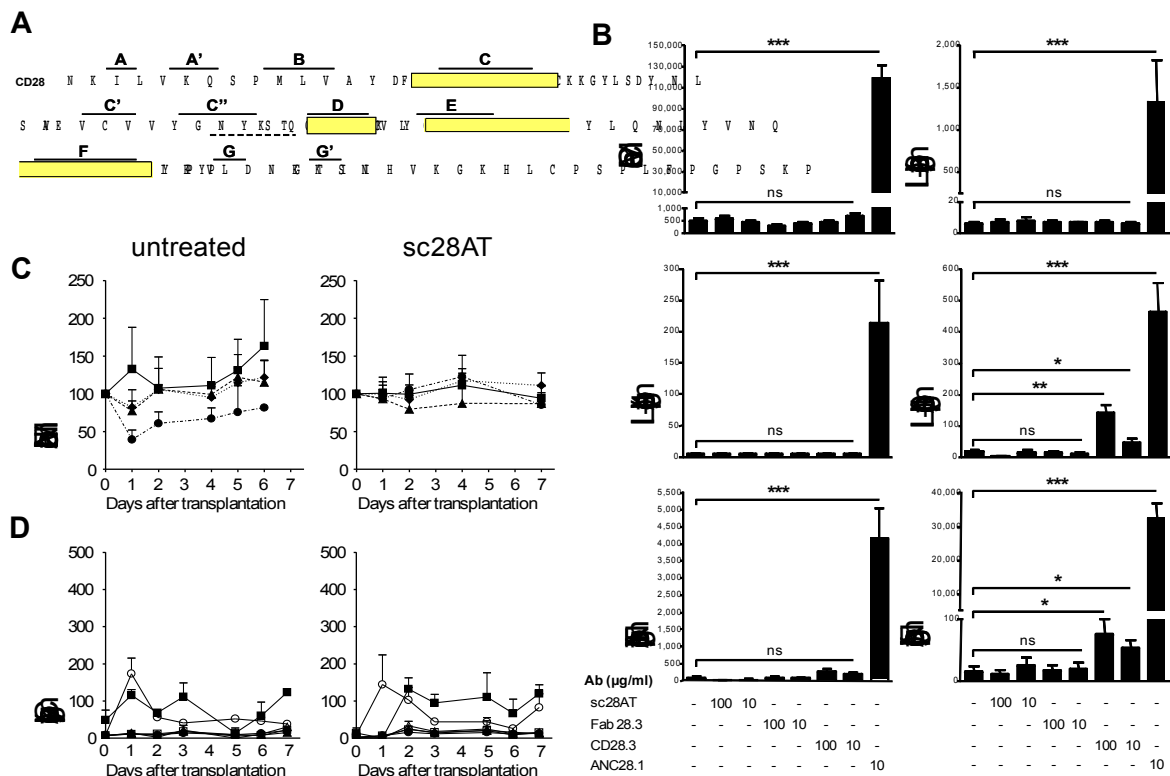


Selective CD28 inhibition prolongs cardiac allograft survival and prevents cardiac allograft vasculopathy in macaques.

(A) Cardiac allograft survival for monkeys without therapy (n=5; dotted grey line) or treated with sc28AT monotherapy at 2 mg/kg/day (n=3; dotted black line) or 10 mg/kg/day (n=3; dashed/dotted black line), Cyclosporine A monotherapy (n=6; solid gray line), Cyclosporine A + sc28AT at 0.4 mg/kg bitherapy (n=2; dashed black line) or Cyclosporine A + sc28AT at 2mg/kg bitherapy (n=3; solid black line). *, p<0.05 and ***, p<0.001 (indicated group versus control untreated recipients). (B) A representative vessel from a cardiac allograft treated with Cyclosporine A (day 72, left panel) shows grade 2 cardiac allograft vasculopathy (CAV) with distinct neointimal thickening and 10-50% (estimated at 25% in this instance) luminal narrowing. In contrast, a representative graft artery from a recipient treated with sc28AT + Cyclosporine A shows an absence of neointimal proliferation (day 80, right panel). (C) CAV incidence and severity at day 70-90, graded as described in Methods, were significantly lower (p<0.05) in CD28 blockade plus Cyclosporine A combination therapy (n=4) as compared with Cyclosporine A alone (n=5).

Supplementary Figures

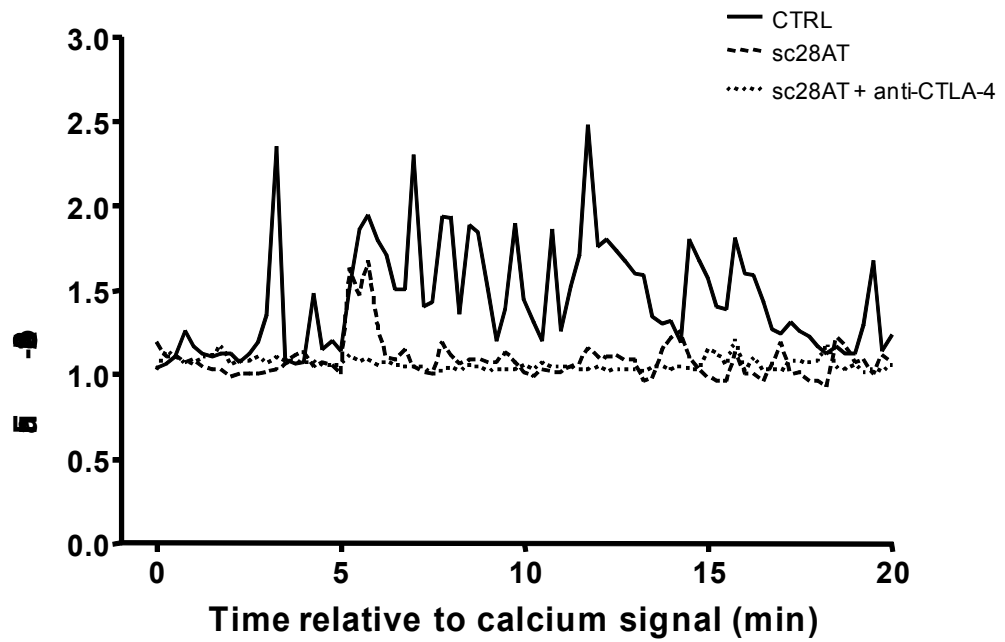
Fig. S1



Non agonistic properties of monovalent fragments from the CD28.3 antibody.

(A) Amino acid sequence of human CD28. Solid lines and letters: domains of the protein. Boxed: CD28.3 Fab-contacts. Dashed underlining: target of superagonistic antibodies. (B) Proliferation and cytokine synthesis by human PBMC after 5 days in the presence of monovalent (sc28AT or Fab), intact divalent CD28.3 IgG1 antibodies or divalent superagonist ANC28.1 antibody at the indicated concentrations. Results are means ±SD of results from 7 unrelated healthy donors. *, ** and *** significant difference at p<0.05, 0.01 and 0.001, respectively. (C) Phenotypic analyses of blood T cells during the first week post transplantation in controls (n=3; left panel) and sc28AT monotherapy recipients (n=4; right panel). Curves indicate the median fluorescence intensity (MFI) of the following markers: CD25 (■, solid black lines), MHC-DR (▲, dashed black lines), CD62L (◆, dotted gray lines), CD45RO (●, dashed gray lines). Data are means ± SD and normalized to the initial MFI on day 0. (D) Cytokines in the blood during the first week after transplantation in controls (left panel; n=3) and recipients treated with sc28AT monotherapy (right panel; n=4). ■, IL-2; ▲, IL-4; ●, IL-5; □, TNFα; △, IFNγ; ○, IL-6. Results are expressed as mean ± SD.

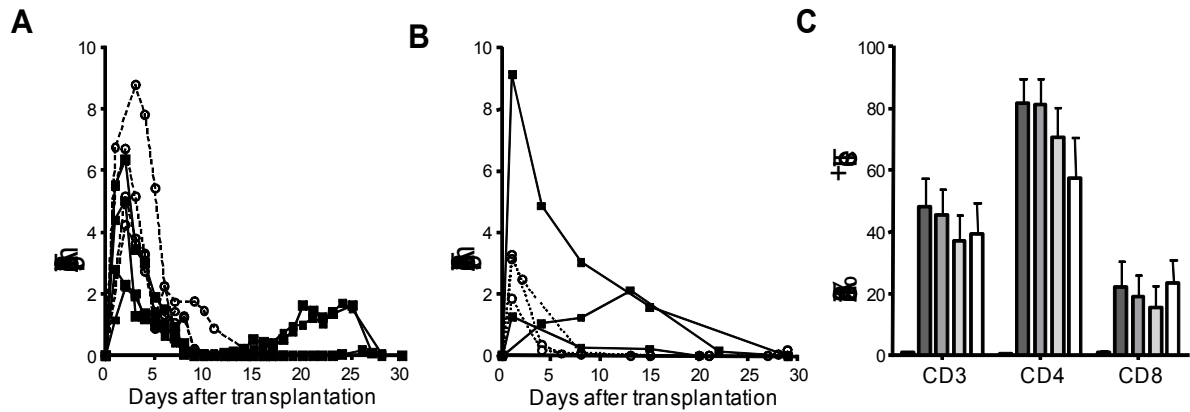
Fig. S2



Calcium flux profiles *in vitro*.

T cells that had established a contact with an APC were tracked by time-lapse microscopy and the fluorescence of the FURA-2 probe was recorded over 20 min. One representative T cell is shown for for each condition. Cells were treated with 10 μ g/ml mouse Ig (CTRL), sc28AT or sc28AT + anti-CTLA-4 Fab fragments.

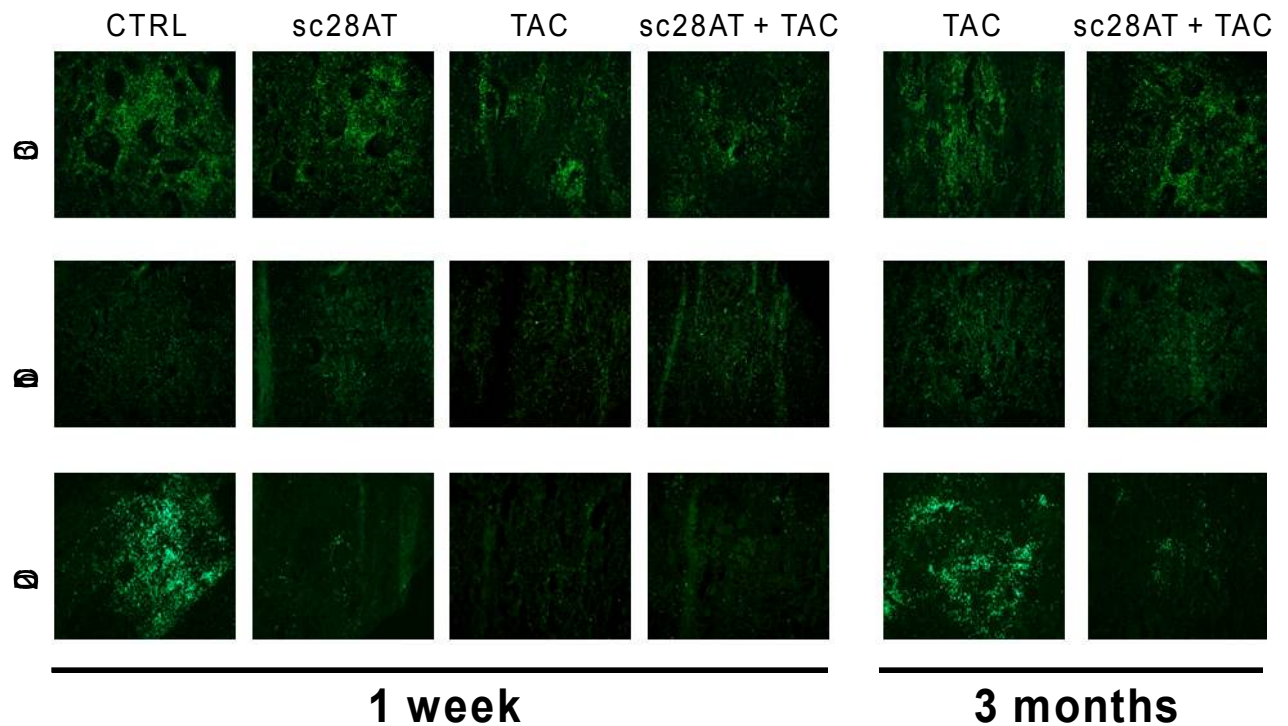
Fig. S3



Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of sc28AT.

(A) Blood samples were drawn at the indicated time points, just before the new daily injection, from baboon recipients of kidney allograft under sc28AT monotherapy (○) or sc28AT + calcineurin inhibitor bitherapy (■). Trough levels were measured by ELISA in the serum. Different lines represent individual animals. (B) Same as in (A), in the cardiac transplant model in macaques. (C) In the baboon kidney graft model, the percentage of CD3+, CD4+ and CD8+ blood cells loaded with sc28AT was recorded by flow cytometry (mean \pm SD; n=4). For each phenotype, from left (dark) to right (white), analyses on day 0 and 1, 2, 4 and 6 post transplantation.

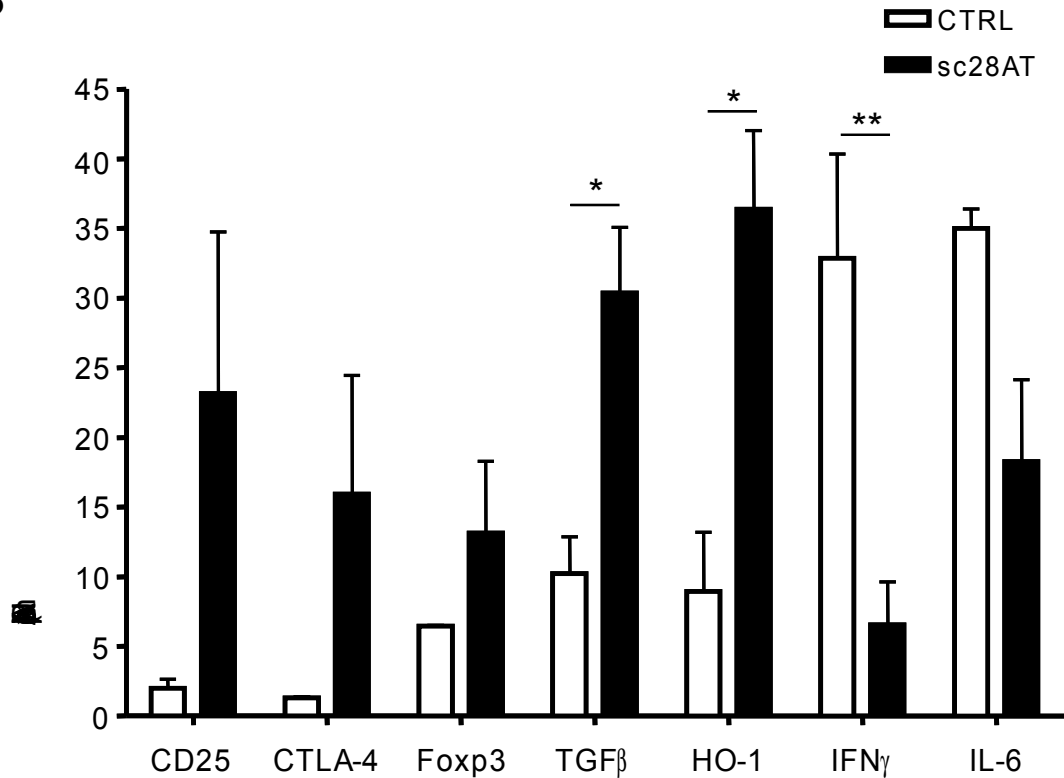
Fig. S4



Immunohistological analyses of kidney graft biopsies.

Representative biopsies from kidney transplants in the baboon model, at 1 week post transplantation for controls (CTRL) and animals treated with sc28AT monotherapy (sc28AT), and 1 week or 3 months post transplantation for animals treated with Tacrolimus (TAC) and sc28AT + Tacrolimus. FITC-labeled antibodies against CD3 (T cells), CD11b (monocytes/macrophages) and CD20 (B cells) were used.

Fig. S5

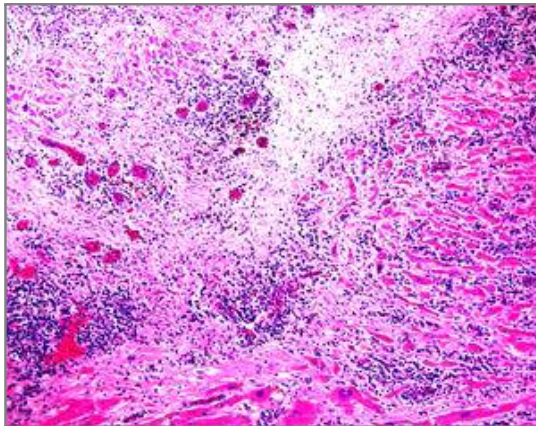


qPCR measurement of mRNA transcripts in kidney graft biopsies.

Kidney graft biopsies were harvested 1 week after transplantation from baboon recipients either untreated (CTRL; n=2) or treated with sc28AT (n=4) and processed for mRNA analysis by qPCR as indicated in the Methods section. Results are means \pm SD of the expression level normalized to HPRT expression. *, p<0.05 and **, p<0.01.

Fig. S6

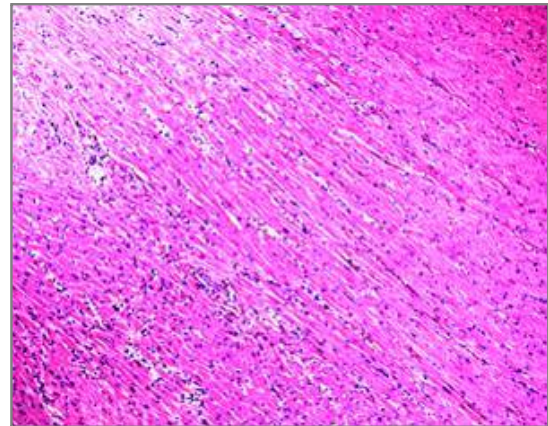
A



Explanted heart graft at day 72
CsA alone

ISHLT Grade 2

B



Explanted heart graft at day 80
CsA + sc28AT (2mg/kg)

ISHLT Grade 1A

Representative histological analysis of cynomolgus monkey heart allografts at 3 months after transplantation (H&E staining).

A recipient treated with Cyclosporine A (**A**) shows intra-graft cellular infiltrate and edema (ISHLT Grade 2), whereas a recipient treated with Cyclosporine A + sc28AT (**B**) shows preserved myocardial structure (ISHLT Grade 1A).

Supporting Online Material

Materials and Methods

Reagents. A non-activating human CD28-specific scFv antibody fragment was developed from the CD28-specific CD28.3 clone (1), and linked to alpha-1 anti-trypsin (sc28AT) to prolong its half-life in the serum *in vivo* (2). Sc28AT was produced by TcL Pharma (Nantes, France) and by a NIH production platform (Dr. K. Reimann, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA) from transformed CHO cells and purified from supernatant by ion exchange chromatography. Sc28AT was quantified by two complementary specific sandwich ELISA (TcL Pharma). Sc28AT cross-reacts with CD28 from cynomolgus monkey, baboon and marmoset but not from dog, rabbit, rat and mouse (BV, *unpublished observations*), and has the same binding affinity as the parental murine Fab fragment(2). Anti-human CTLA-4 antibody (clone 147.1) was provided by Medarex (Princeton, New-Jersey). Fab monovalent fragments were prepared using Immunopure[®] IgG1 Fab preparation kit (Pierce, Rockford, Illinois). Fluorescent mAbs against human CD3 (SP34-2), CD4 (L200), CD8 (RPA-T8), CD28 (28.6), CD25 (M-A251), CD45RO (UCHL1), CD62L (FMC46), CD127 (hIL-7R-M21), CTLA-4 (BNI3) and HLA-DR (G46-6) were from BD Biosciences (San-Diego, California). Biotinylated anti-human α -1-anti-trypsin (Abcam, Cambridge, MA) was used with Streptavidin-PE (Beckman Coulter, Fullerton, CA) for sc28AT staining on T cells. The APC-conjugated anti-human Foxp3 staining kit (PCH101 and 236A/E7) was purchased from eBioscience (San-Diego, California) and used according to the manufacturer's instructions. Primary antibodies used for immunohistochemical staining were: rabbit anti-human CD3 (DAKO, Glostrup, Denmark), human IDO-1 (provided by Dr. I. Anegon, Nantes, France (3)), mouse anti-human CD11b (BEAR1; Beckman Coulter, Fullerton, California), human CD20 (L26; DAKO), human CD31 (LCI4; Serotec, Oxford, UK), human CTLA-4 (BNI3; BD Bioscience), human Foxp3 (236A/E7; eBioscience), human DC-SIGN (DCN46; BD Bioscience) and human alpha smooth muscle actin (O.N.5; Abcam).

Epitope analysis. The determination of the epitope recognized by the CD28.3 antibody was performed by Agrobio (Orleans, France). Briefly, CD28.3 Fab fragments were added to human CD28 (R&D Systems, Lille, France) immobilized on sepharose. Immune complexes were reduced and alkylated using iodoacetamide (55mM, 1h) before chymotrypsin (1

mg/50mg bound antibody) was added for 4h at 18-25°C. The sepharose was then washed with 25mM ammonium carbonate followed by 50mM glycine, pH 2.5. Eluted peptides were then concentrated on a C18 matrix and analyzed by MALDI-TOF/TOF. The epitope was determined by peptide mass fingerprinting.

Live cell dynamic microscopy. A human EBV-specific CD4⁺CD28⁺ T cell clone (T-EBV (4); 2.10⁵ cells) was stained with the FURA-2 AM probe (0.5 μM for 30 min; Interchim, Montluçon, France), washed and added to 4.10⁵ human EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines (pool of cells from 3 donors, obtained as described (5)) on a coverslip coated with Poly-L-Lysine (0.001%; Sigma, Saint-Louis, Minnesota). Using the Metafluor® image-analysis software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), bright-field and fluorescent images were acquired at 15 second intervals on a Leica microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Individual T cell/APC interactions and individual T cell calcium peaks were recorded manually over a 20 min. incubation period with Metafluor (version 7.1.7) and Metamorph (version 7.5.6; Roper Scientific, Göttingen, Germany) software. A calcium peak was recorded when fluorescence levels reached 2-fold the baseline level. T cells were tracked using the ImageJ free software (version 1.41). The total number of cells analyzed was 55 cells for control condition (from 9 experiments), 29 cells for sc28AT condition (from 5 experiments) and 25 cells for sc28AT + anti-CTLA-4 (from 3 experiments). Antibodies were all used at 10 μg/ml. Data are presented as mean ± SD for each condition.

Mixed Lymphocyte Reactions (MLR). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood by density centrifugation over Ficoll-Paque (Eurobio, Les Ulis, France). Freshly isolated PBMC were incubated with allogeneic irradiated PBMC (10⁵ cells/well of each cell type) for 5 days at 37°C, 5% CO₂, in complete medium (RPMI 1640, 10% heat-inactivated allogeneic pooled sera, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1mM sodium pyruvate and 5mM HEPES, all from Sigma). Cells were pulsed with 1μCi of ³H-thymidine during the final 8 hours of culture and then harvested and counted in a scintillation counter. In other experiments, PBMC were maintained in culture without allogeneic cells and assayed similarly as above.

Cytokine secretion assays. To assess IL-2 production by T cells, 105 Jurkat T cells were stimulated with 2.104 Raji B cells in microtiter plates in the presence of 5 ng/ml staphylococcus enterotoxin E for 48h at 37°C, 5% CO₂ in complete medium. IL-2 secretion

was evaluated in supernatant by using the Max™ Set Deluxe Human IL-2 ELISA Kit (Biolegend, Uithoorn, The Netherlands). To analyze the synthesis of multiple cytokines by human PBMC, 10⁵ PBMC from healthy humans were cultured in triplicate for 5 days in complete medium with control or anti-CD28 antibodies. After 48h, 30μl supernatant was collected from each triplicate, pooled and analyzed for cytokines concentration using a human Th1/Th2 cytokine kit (BD Biosciences).

Suppression assays. All experiments were performed with PBMC obtained from healthy donors. CD4⁺ T cells were enriched from PBMC by negative selection using CD4⁺ T cells isolation Kit II (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) and an autoMACS separator (Miltenyi). Enriched CD4⁺ cells were then stained with anti-human CD4, CD25 and CD127 mAbs at 4°C for 30min. CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} regulatory T cells and CD4⁺CD25⁻ naïve T cells were then sorted (purity routinely above 95%) using a high-speed cell sorter (FACS Aria; BD Biosciences) and FACSDiva software (BD Biosciences). 2.10⁴ CD4⁺CD25⁻ cells were co-cultured with 10⁵ allogeneic irradiated PBMC and autologous CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Treg at a 1:1 or 1:0.25 ratio for 5 days at 37°C, 5% CO₂ in human complete medium. Blocking Abs were added at the start of the culture at 10μg/ml. Proliferation was assessed by ³H-thymidine incorporation during the last 8 hours of culture.

Allogeneic mature DC were generated from monocytes as previously described (6). Briefly, monocytes were enriched by elutriation (>85% CD14⁺) and cultured for 6 days in medium supplemented with IL-4 (40ng/ml; R&D systems, Minneapolis, Minnesota) and GM-CSF (1000 IU/ml; Gentaur, Kampenhout, Belgium). Cells were harvested on day 5 and cultured for 24h with LPS for maturation (1μg/ml; E. coli 0111:B4, Sigma). 5.10³ allogeneic mDC were then co-cultured with 5.10⁴ Treg in complete medium with the indicated blocking Abs (10μg/ml) for 18h. mDC/Treg cells were washed and added to 5.10⁴ CD4⁺CD25⁻ cells (same donor as Treg) stimulated with 5.10³ allogeneic mDC (same donor as mDC used for Treg activation). Cells were then cultured for 5 additional days and proliferative responses were assessed by ³H-thymidine incorporation.

Baboon Treg suppression assays. CD25⁺ and CD25⁻ cells were prepared from PBMC during the 3rd month post transplantation using FITC anti-human CD25 mAb and specific anti-FITC microbeads (Miltenyi) and positive or negative selection, respectively. To determine suppression, 10⁵ CFSE-labelled CD25⁻ PBMC were mixed with different numbers of unlabelled CD25⁺ PBMC (at ratios of 1:0.5 to 1:0.0078) in duplicate wells of a plate

previously coated with anti-human CD3 antibodies (10 μ g/ml; 2h at 37°C). The proliferative response was evaluated after 3 days by measuring the percentage of CFSE-diluted cells by flow cytometry. The percentage of suppression was calculated by comparing the % of proliferated cells (CFSE dilution) in the presence of indicated numbers of CD25⁺ PBMC to the % of proliferated cells in the absence of CD25⁺ cells (= maximal proliferation).

Animals. Cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (2 to 3 kg) were obtained from Covance Research Products (Alice, TX) and Three Springs Scientific Inc (Perkasie, PA). Baboons (*Papio anubis*) (6 to 15 kg) were obtained from the CNRS primatology center (Rousset, France). Experiments performed on macaques were in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the University of Maryland Medical School and carried out in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (HHS, NIH Publication 86-23, 1985). Experiments performed in baboons complied with recommendations of the Institutional Ethical Guidelines of the “Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale” (France). The donor-recipient combinations were chosen according to blood group compatibility, major histocompatibility complex (MHC class II) mismatching by DRB typing and verification of MHC incompatibility by MLR (stimulatory index > 5).

Renal transplantation in baboons. Renal allotransplantation was performed in binephrectomized recipients, as previously described (7). Twenty-four hour diuresis was monitored daily as well as blood urea nitrogen. Transplantectomies were performed when plasma creatinin levels rose up to 400 μ M and surgical biopsies were performed for histological examination prior to euthanasia. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin blinded histological examination by a pathologist. A second fragment was snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA extraction and a third fragment was placed in Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Villeneuve d’Ascq, France) for immunohistochemical staining. Protocol biopsies were performed at one week, one month and 3 months after transplantation. Control groups were either untreated (n=3) or received Tacrolimus alone (Prograf[®], provided by Astellas, Tokyo, Japan) (n=4). Tacrolimus was given once daily from day 0 to day 90 after transplantation (0.05 to 0.15 mg/kg i.m.) to achieve target therapeutic trough levels (10 to 20 ng/ml). Sc28AT was administered once daily (4mg/kg i.v.) during the first 25 days after transplantation. Blood samples were collected

for FACS analysis and assessment of serum levels of sc28AT and cytokines (Non-Human Primate Th1/Th2 cytokine kit; BD Biosciences) before the daily administration of sc28AT.

Cardiac transplantation in cynomolgus monkeys. All recipient animals underwent heterotopic intra-abdominal cardiac allograft transplantation, as described previously (8). Open cardiac biopsies were performed on postoperative days 7, 14, 28 and monthly thereafter until graft explant. Graft function was monitored daily by palpation and implanted telemetry (Data Sciences International, St. Paul, MN). Clinical acute graft rejection was detected as consistent high body temperature ($>38.5^{\circ}\text{C}$) coupled with either a decrease in graft heart rate (to <120 beats per min., or a drop of >40 beats per min. from a stable baseline) or an increase in graft diastolic pressure of >10 mmHg. Graft rejection was defined as loss of contraction by telemetry and confirmed at explant and was always preceded by signs of acute rejection. Control groups were either left untreated ($n=5$) or received Cyclosporine A (Neoral, Novartis, Hannover, NJ, $n=6$). Cyclosporine A was given once daily (5-25 mg/kg i.m.) to achieve target therapeutic trough levels (>400 ng/ml). Sc28AT was given as indicated in Fig. 6a. In three Cyclosporine A-treated animals, a first episode of symptomatic acute rejection was treated with three daily steroid boluses (Solu-Medrol®, Pharmacia, Kalamazoo, MI; 10 mg/kg). Rejection was reversed in two of the 3 treated animals. In one Cyclosporine A-treated animal, suspected rejection based on histological analysis of the biopsy tissue sample was also treated with a three day course of steroids. One recipient died of infection at day 26 and was excluded from statistical analysis. Cellular infiltrates were analyzed on hematoxylin and eosin-stained paraffin sections and graded for acute rejection by ISHLT criteria (International Society for Heart and Lung Transplantation (9)). Cardiac allograft vasculopathy (CAV) incidence in beating hearts explanted after day 70 was recorded as percent of arteries and arteriolar vessels involved (CAV score ≥ 1) at each time point. CAV severity was scored in these explanted hearts as follows: Grade 0, normal arterial morphology; Grade 1, activated endothelial cells with enlarged nuclei and/or adherent leukocytes, without luminal narrowing ($<10\%$); Grade 2, distinct neointimal thickening, luminal narrowing $<50\%$; Grade 3, extensive neointimal proliferation with greater than 50% luminal occlusion. Scoring was independently performed for each explanted heart by three evaluators (TZ, RNP, BN) blinded with respects to the treatment group. The mean CAV score for each biopsy or explant was calculated using the equation: $(\# \text{grade 0-vessels} \times 0 + \# \text{grade 1-vessels} \times 1 + \# \text{grade 2-vessels} \times 2 + \# \text{grade 3-vessels} \times 3) / \text{total number of arterial vessels scored}$ and individual means were averaged to calculate the group mean \pm SD for each treatment group.

Immunohistochemical staining. Serial frozen sections (10µm) were prepared from surgical or protocol renal biopsies. Slides were air dried at room temperature for 1h before acetone fixation for 10 min at room temperature. Sections were saturated with PBS containing 10% baboon serum, 2% normal goat serum and 4% BSA. Sections were incubated overnight with primary Abs at 4°C, followed by fluorescent secondary Abs and nuclear staining (DAPI; Invitrogen). For intracellular immunostaining (CTLA-4, Foxp3 and IDO), sections were permeabilized with 0.5% Saponin (Sigma) in the saturating solution. Treg infiltration was determined by a triple staining with anti-human CD3 antibodies (followed by anti-rabbit IgG-Alexa 350; Invitrogen), anti-human CTLA-4 (followed by anti-mouse IgG2a Alexa 594; Invitrogen) and anti-human Foxp3 (followed by anti-mouse IgG1-Alexa 488; Invitrogen). The percentage of CD3 cells expressing Foxp3, CTLA-4 or both was quantified manually (by an investigator blinded to the experimental conditions) on 4 different pictures from 2 different areas of each tissue section separated by at least 100µm. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) localization was determined by double staining with anti-human IDO-1 (followed by anti-rabbit IgG FITC; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and anti-human CD31, anti-human DC-SIGN or anti-human alpha smooth muscle actin (followed by anti-mouse IgG-Alexa 568; Invitrogen). The specificity of IDO-1 staining was confirmed by competition experiments with the IDO-1 peptide that had been used to raise the antibody. Slides were analyzed using standard fluorescence microscopy or confocal-like microscopy (Apotome, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and the AxioVision imaging software (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

mRNA analysis. mRNA was extracted from snap-frozen renal biopsies using QIAgen RNA microextraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The quality and quantity of mRNA was controlled by infrared spectrometry (NanoDrop; Thermo scientific, Wilmington, DE). Messenger RNA was amplified and retrotranscribed with the Omniscript RT kit (Qiagen) and real-time quantitative PCR was then performed as previously described(7), using an ABI Prism 7700-Perkin Elmer Sequence Detection System (Perkin Elmer, Foster City, CA). Amplifications were performed for hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT; probe Hs99999909_m1; Applied Biosystems, Foster City, California), IDO (F: 5'-ACGGTCTGGTGTATGAAGGGT-3'; R: 5'-CACGGACTGAGGGATTTGACT-3'), IL2-R (probe Hs00907778_m1, Applied), CTLA-4 (F: 5'-TCTTCATCCCTGTCTTCTCCAA-3'; R: 5'-GGTCAACTCATTCCCCATCA-3'),

Foxp3 (F: 5'-CCCTGCCCTTCTCATCCA-3'; R: 5'-GTGGCCCGGATGTGAAAA-3'), Heme Oxygenase 1 (HO-1; probe Hs00157965_m1, Applied), IFN- γ (F: 5'-TGGGTTCTCTTGGCTGTTACTG-3'; R: 5'-TTAATGTCTTCCTTGATGGTCTCC-3') and IL-6 (probe Hs00174131_m1, Applied).

Statistical analyses. Graft survival times were plotted using the Kaplan-Meyer representation and survival time between different groups was evaluated with a log-rank test. Continuous variables were expressed as mean \pm SD unless otherwise indicated and were compared using the Mann-Whitney non parametric test. MLR data were analyzed using unpaired t tests. Discrete variables (i.e. incidence of early rejection) were compared using a contingency table and the Chi-square test. *P*-values less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed on a personal computer with the statistical package SPSS for Windows XP (Version 11.0, SPSS, Chicago, IL, USA) or GraphPad InStat (version 5.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

References of the Supporting Online Material

1. J. Nunes *et al.*, *Int Immunol* **5**, 311 (Mar, 1993).
2. B. Vanhove *et al.*, *Blood* **102**, 564 (Jul 15, 2003).
3. M. Hill *et al.*, *Eur J Immunol* **37**, 3054 (Nov, 2007).
4. C. Ibisch *et al.*, *J Immunol* **164**, 4924 (May 1, 2000).
5. G. Gallot *et al.*, *Clin Exp Immunol* **144**, 158 (Apr, 2006).
6. C. Chauveau *et al.*, *Blood* **106**, 1694 (Sep 1, 2005).
7. G. Boulday *et al.*, *Nephrol Dial Transplant* **19**, 1752 (Jul, 2004).
8. R. N. Pierson, 3rd *et al.*, *Transplantation* **68**, 1800 (Dec 15, 1999).
9. M. E. Billingham *et al.*, *J Heart Transplant* **9**, 587 (Nov-Dec, 1990).

I.2- Résultats complémentaires

Etude pilote de sc28AT chez le babouin en l'absence de transplantation

Dans une étude pilote, la toxicité de sc28AT a été évaluée sur 2 babouins en absence de transplantation. Aucune toxicité biochimique ou hématologique n'est visible 24h, 1 semaine ou 1 mois après une injection unique en *iv* de 2mg/Kg de sc28AT (Fig. C1). De même, aucune modification n'a pu être observée pour les paramètres du ionogramme sanguin, le bilan lipidique, les paramètres hépatiques et pancréatiques.

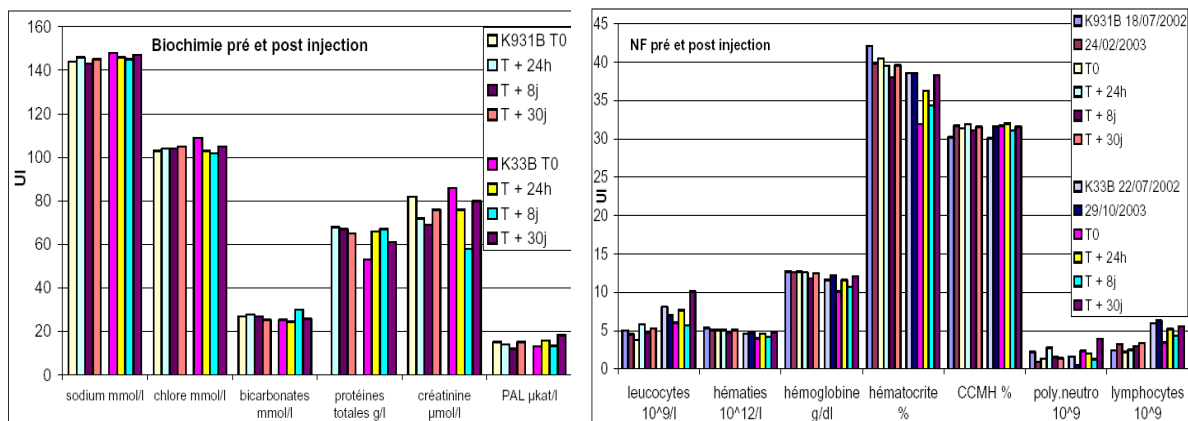


Figure C1 : Etude pilote de toxicité de sc28AT après une injection unique en *iv* à 2mg/kg chez le babouin en absence de transplantation.

Cette étude pilote a également permis d'évaluer la pharmacocinétique et pharmacodynamie de sc28AT chez le babouin en absence de transplantation. Ainsi, sc28AT a une très bonne distribution et une demie-vie d'environ 20h après injection en *iv* à 2 mg/Kg et montre un bon maintien sur les lymphocytes T CD28+ pendant au moins 3 jours après une seule injection (Fig. C2).

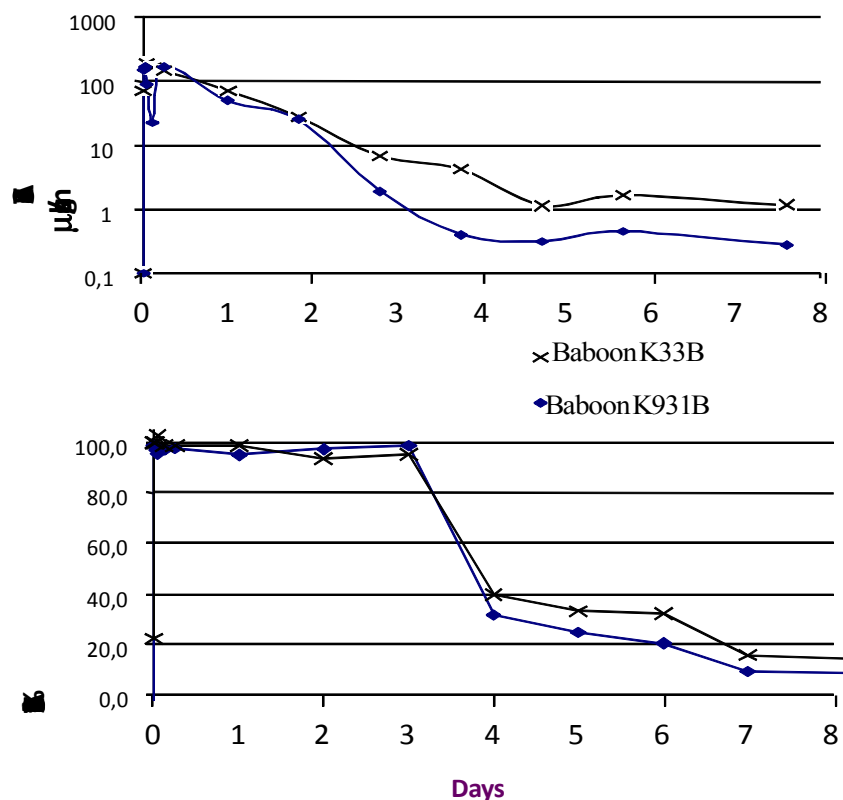


Figure C2 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie de sc28AT après une injection unique en *iv* de 2mg/Kg de sc28AT.

L'immunogénicité en absence de transplantation a également été évaluée dans cette étude pilote après injections répétées en *iv* de sc28AT (2mg/kg) sur une période de 6 mois post-injection (Fig. C3). Aucun anticorps anti-sc28AT n'a pu être mis en évidence par ELISA durant cette période de suivi de 6 mois et l'addition d'adjuvant complet de Freund en *s.c.* a été nécessaire pour obtenir un sérum faiblement positif (1/100).

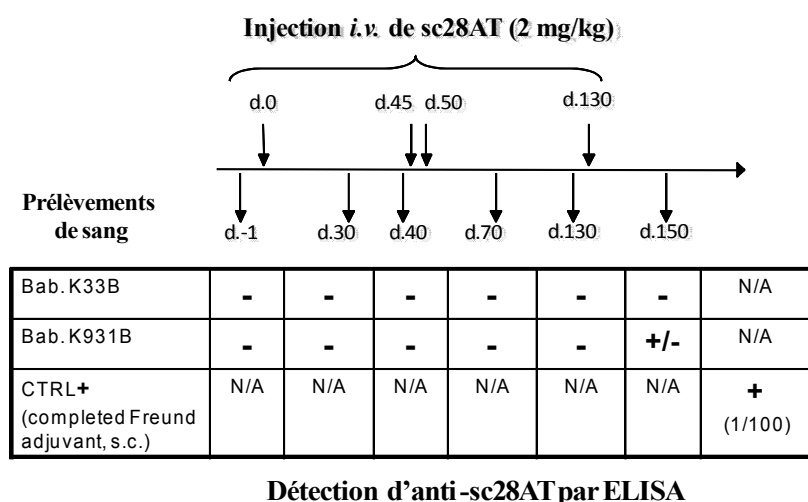


Figure C3 : Etude pilote d'immunogénicité sur 2 babouins en absence de transplantation.

Enfin, cette étude pilote a permis de montrer que la molécule de sc28AT est stable à 4°C et température ambiante pendant au moins 6 mois après production interne dans le laboratoire (Fig. C4).

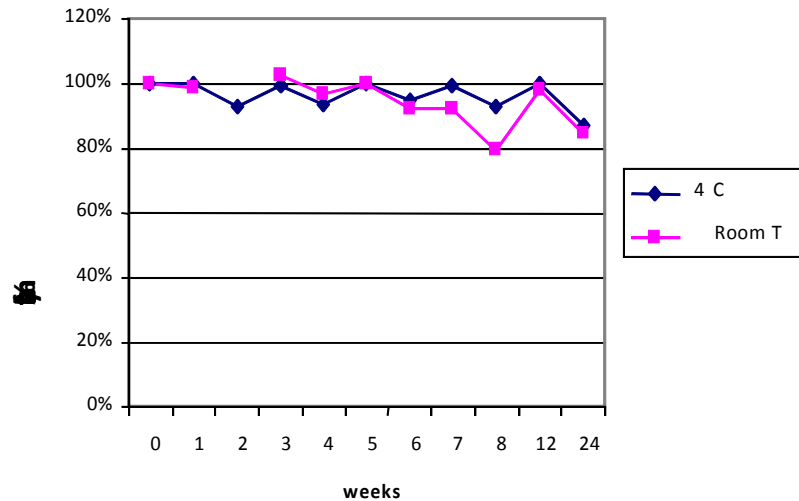


Figure C4 : Stabilité de la molécule de sc28AT à 4°C et température ambiante après production interne dans le laboratoire.

Pharmacocinétique et pharmacodynamie après transplantation rénale chez le babouin

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie de sc28AT ont été évaluées de nouveau après transplantation rénale chez le babouin en monothérapie. Ces transplantations nécessitant une quantité importante de molécule, la production a été confiée à une société extérieure. Ainsi, deux premiers animaux ont reçu quotidiennement 4 mg/Kg de sc28AT en *iv*. La pharmacocinétique mesurée après la première injection en bolus montre les mêmes caractéristiques que lors de l'étude pilote (Fig. C5). Par manque d'efficacité dans la prévention du rejet aigu, les deux animaux suivants ont reçu 8 mg/Kg quotidiennement en *iv*. De manière surprenante, la pharmacocinétique s'est avérée moins bonne chez ces animaux, malgré cette dose supérieure (Fig. C5). De même, alors que les cellules CD4+ (toutes CD28+) sont bien protégées durant la première semaine suivant la transplantation pour les animaux recevant 4 mg/Kg, une diminution progressive du pourcentage de lymphocytes T CD4+ sc28AT+ est observée au cours du temps avec la dose de 8 mg/Kg (Fig. C6). Enfin, il apparaît également une perte du maintien de sc28AT sur les lymphocytes T de manière très brutale une semaine après transplantation pour l'animal ayant développé un rejet aigu après la première semaine (Fig. C6).

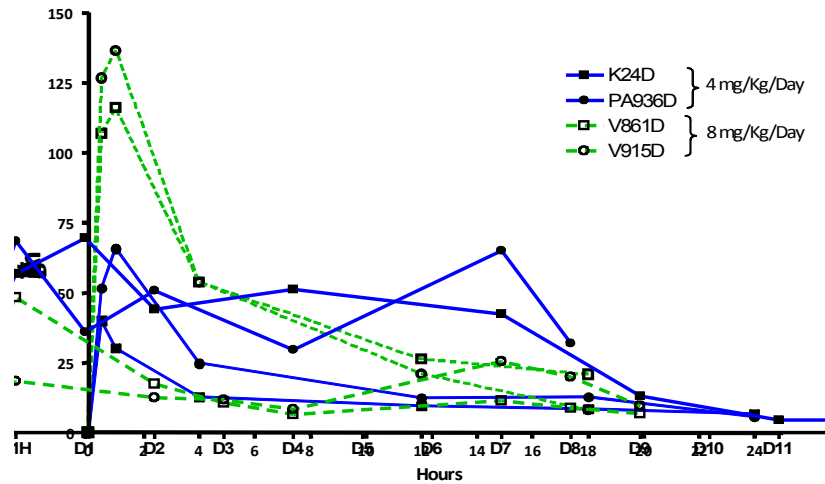


Figure C5 : Pharmacocinétique de sc28AT après la première injection *iv* en bolus après transplantation rénale chez le babouin en monothérapie.

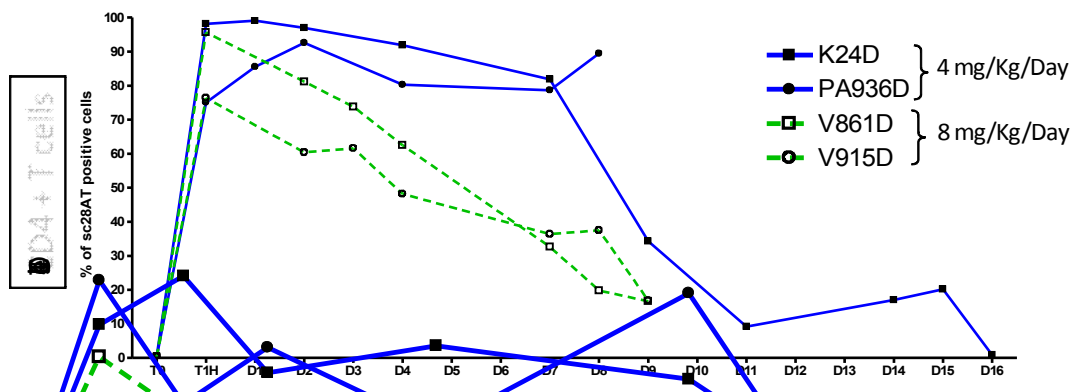


Figure C6 : Pharmacodynamie (pourcentage de lymphocytes T CD4+ sc28AT+ 24h après injection) de sc28AT après transplantation rénale chez le babouin en monothérapie.

Les différences de pharmacocinétique et pharmacodynamie entre les deux premiers animaux à 4 mg/Kg et les deux suivant (1 mois plus tard) à 8 mg/Kg nous ont conduits à analyser en HPLC le lot fourni par la société extérieure. Alors que la présence d'agrégats était relativement faible avant le début des expérimentations et que notre molécule pilote avait montré une stabilité parfaite durant 6 mois à 4°C et température ambiante, nous avons ici observé qu'après un mois de stockage à 4°C (lors de la réalisation des transplantations à 8 mg/Kg), le lot préclinique présentait une quantité importante d'agrégats et, par conséquent, une faible présence de molécule monomérique (Fig. C7). Cette dégradation prématurée de notre lot préclinique peut expliquer la non-amélioration et la moins bonne pharmacocinétique lors des transplantations réalisées à la dose de 8 mg/Kg en monothérapie.

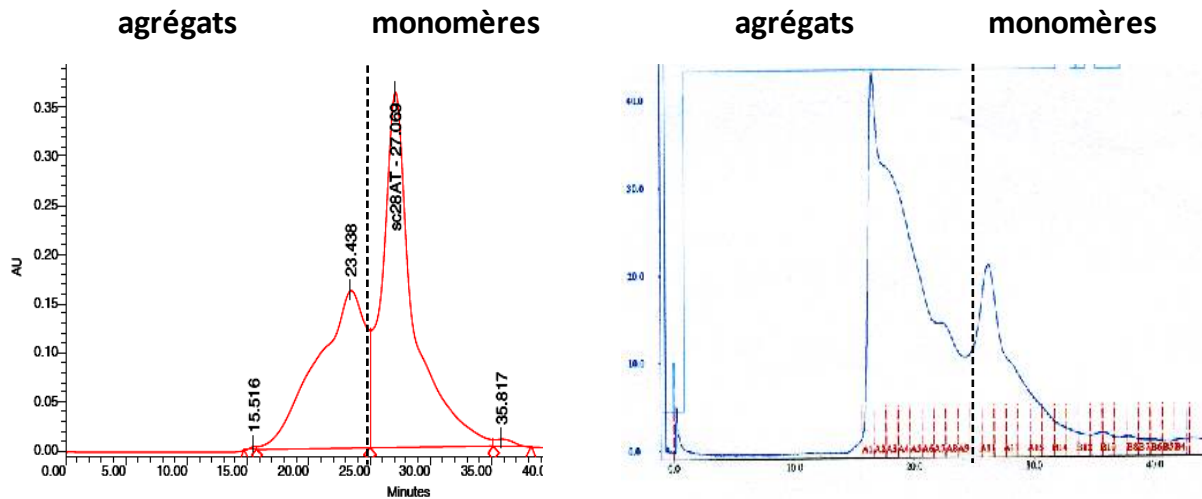


Figure C7 : Profil HPLC du premier lot préclinique de sc28AT produit par une société extérieure avant l'étude (gauche) et un mois après conservation à 4°C (droite).

Immunogénicité de sc28AT après transplantation rénale chez le babouin

La molécule de sc28AT n'étant pas humanisée et issue d'un anticorps murin, l'immunogénicité de ce réactif a été analysée après transplantation rénale chez le babouin. Bien qu'elle ne montrait aucune immunogénicité chez des animaux naïfs après plusieurs injections répétées sur une période de 6 mois ; les animaux en monothérapie à 4 mg/Kg ont développé rapidement des anticorps (IgM puis IgG) dirigés contre sc28AT (nous les appellerons BASCA : Baboon Anti-SC28AT Antibody), dès une semaine de transplantation (Fig. C8). Les animaux ayant reçu 8 mg/Kg, du lot contenant beaucoup d'agrégats, développent quant à eux des BASCA de type IgM dès J4 après transplantation, suggérant que ces agrégats sont au moins en partie responsables de l'immunogénicité. En effet, en « coatant » l'ELISA avec du sc28AT contenant beaucoup d'agrégats vs un lot interne contenant peu d'agrégats, nous avons observé que ces anticorps BASCA étaient principalement dirigés contre les agrégats (Fig. C9). En revanche, ces anticorps BASCA ne sont pas neutralisants *in vitro* puisque qu'en présence d'un sérum contenant de grandes quantités de BASCA IgM et IgG, nous obtenons la même réduction de la production d'IL-2 dans notre bioassay qu'en présence de sérum issu d'animaux naïfs (Fig. C10).

Enfin, l'association de Tacrolimus au sc28AT ne modifie en rien la production de ces anticorps BASCA, puisque les animaux en bithérapie développent aussi rapidement des BASCA de type IgM ou IgG que les animaux en monothérapie sc28AT (Fig. C8).

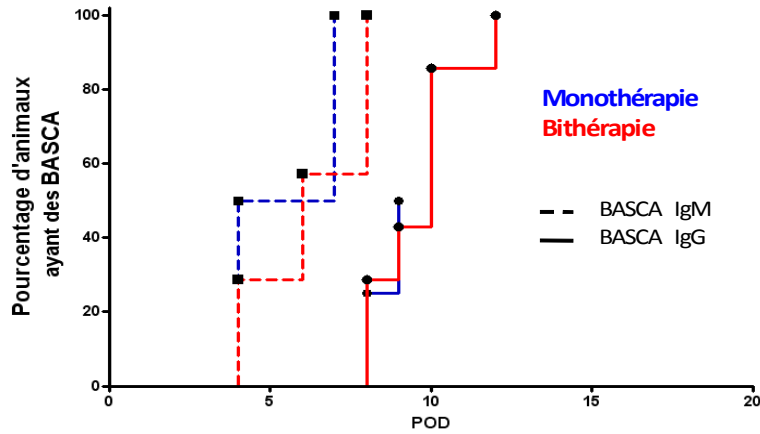


Figure C8 : Pourcentage d’animaux ayant développé des anticorps BASCA après transplantation en monothérapie ou en bithérapie de type IgM ou IgG.

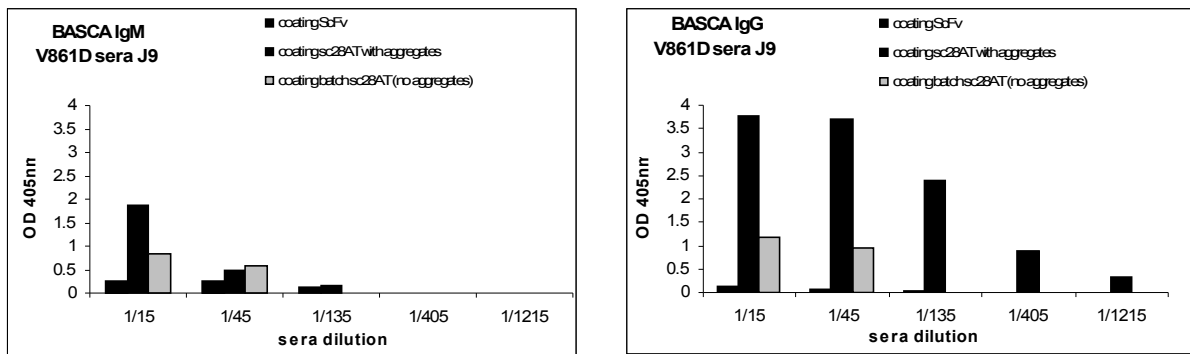


Figure C9 : Détection des BASCA en ELISA avec un « coating » sc28AT issu d’un lot faiblement ou fortement agrégé.

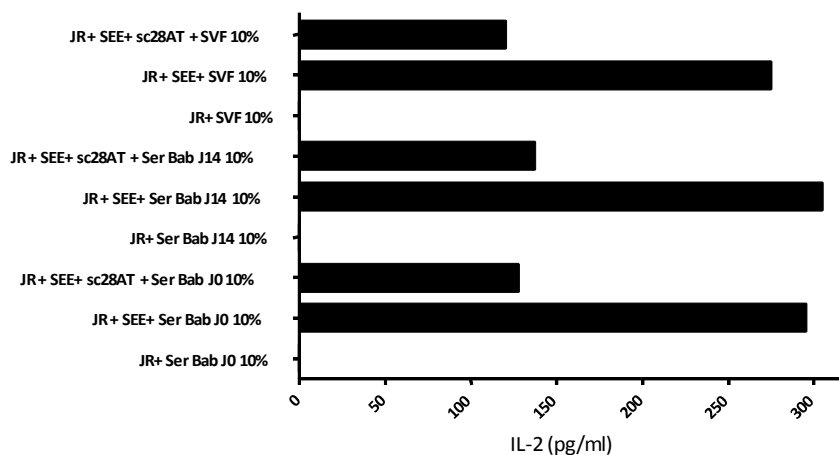


Figure C10 : Production d’IL-2 dans un bioassay Jurkat (lignée de lymphocytes T) en coculture avec des Raji (lignée de lymphocyte B) et un superantigène (SEE), en présence de sérum de babouin contenant ou non des anticorps BASCA.

Fonction rénale et détérioration des greffons

Nous observons que les animaux ayant reçu sc28AT (durant les 25 premiers jours) et du Tacrolimus montrent une meilleure fonction rénale sur la créatininémie après transplantation et ceci de manière prolongée dans le temps en comparaison avec les animaux tacrolimus monothérapie (Fig. C11). Les animaux en monothérapie Tacrolimus ou bithérapie ne présentant pas de différence de tacrolémie résiduelle (Fig. C11). La meilleure créatininémie dans le groupe bithérapie ne peut donc s'expliquer par une moindre exposition à cet inhibiteur de la calcineurine connu pour son caractère néphrotoxique.

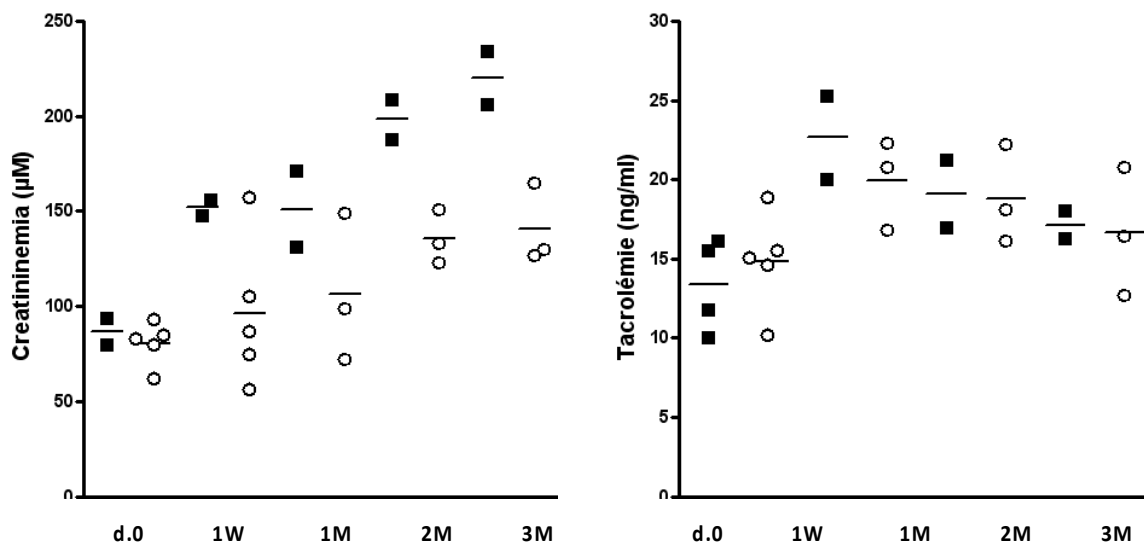


Figure C11 : Créatininémie et Tacrolémie des animaux en monothérapie Tacrolimus (noir) et en bithérapie Tacrolimus + sc28AT (blanc) à J0, 1 semaine, 1 mois, 2 mois et 3 mois.

Bien que les animaux en bithérapie aient montré une créatininémie moindre par rapport aux animaux en monothérapie Tacrolimus, ils ont développé progressivement à partir du deuxième mois une légère insuffisance rénale, se prolongeant jusqu'à 1 à 6 mois après l'arrêt du Tacrolimus. Ainsi, même si ces animaux ne développent pas de rejet après l'arrêt du Tacrolimus à 3 mois, leur fonction rénale déclinante nous a conduits à arrêter le protocole chez ces animaux malgré l'absence de signes évidents de rejet aigu. En effet, lors de biopsie protocolaire ou à l'arrêt de l'animal, l'analyse anatomopathologique n'a pas mis en évidence de signes de rejets aigu ou chronique (nous n'observons d'ailleurs pas de développement d'alloanticorps dans ce modèle, y compris dans le groupe bithérapie après l'arrêt des traitements (résultats non présentés)). En revanche elle a mis en évidence une souffrance tubulaire importante, avec des signes de nécroses, de mitoses et de calcification, ainsi qu'une

légère fibrose en bande (Fig. C12). Ces signes sont plutôt attribués en général à une toxicité aux inhibiteurs de la calcineurine, tel le Tacrolimus. Il est vrai que les doses administrées et les tacrolémies résiduelles sont plus élevées que celles couramment administrées en clinique en bi- ou trithérapie, bien qu'elles correspondent à des doses courantes pour le primate. Le babouin ne semble donc pas tolérer aussi bien au long-courant une tacrolémie résiduelle comprise entre 15-25 ng/ml et montre des signes importants de toxicité pour ces doses.

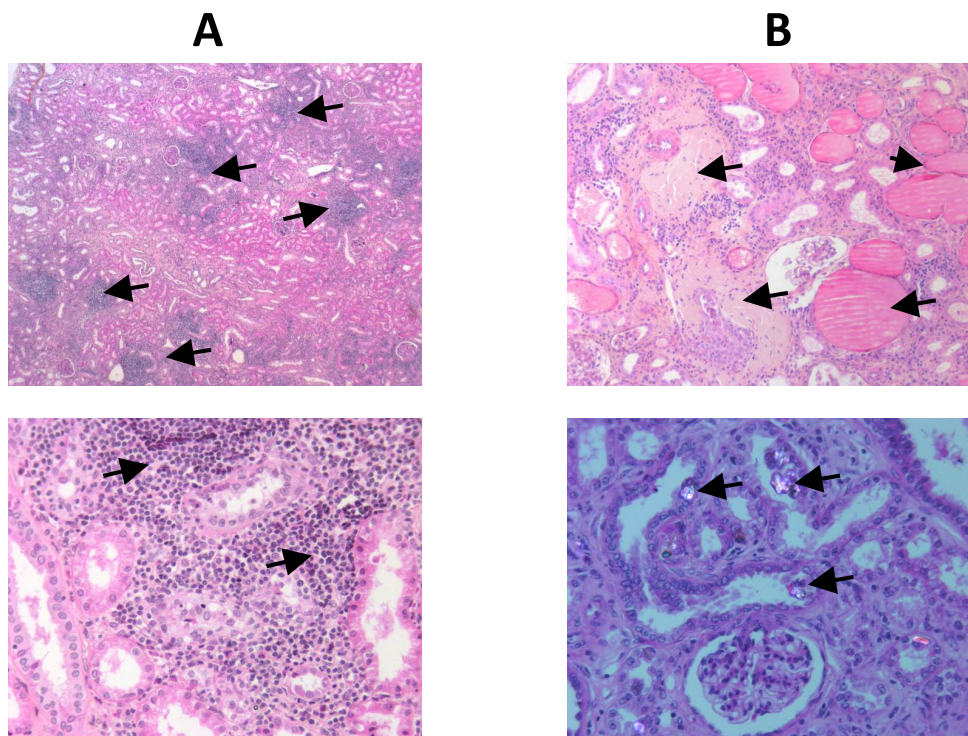


Figure C12 : Analyse anatomopathologique des greffons explantés 1 semaine après l'arrêt du Tacrolimus dans le groupe Tacrolimus monothérapie (A, signe évident de rejet aigu cellulaire) et 1 mois après l'arrêt du Tacrolimus pour le groupe bithérapie (B, signe de souffrance tubulaire, de fibrose et de calcification).

Surexpression de HO-1 par des macrophages infiltrants

Parmi l'analyse des transcrits des greffons des animaux ayant reçu sc28AT, outre la signature potentielle de la présence de lymphocytes T régulateurs (surexpression de Foxp3, TGF- β , CD25 et CTLA-4), l'enzyme anti-inflammatoire HO-1 (hème-oxygénase 1) s'est révélée également être exprimée de manière plus importante que dans les greffons des animaux contrôles. Par immunohistochimie, nous avons pu observer que HO-1 est exprimé dans ces greffons par des macrophages CD68+ (Fig. C13).

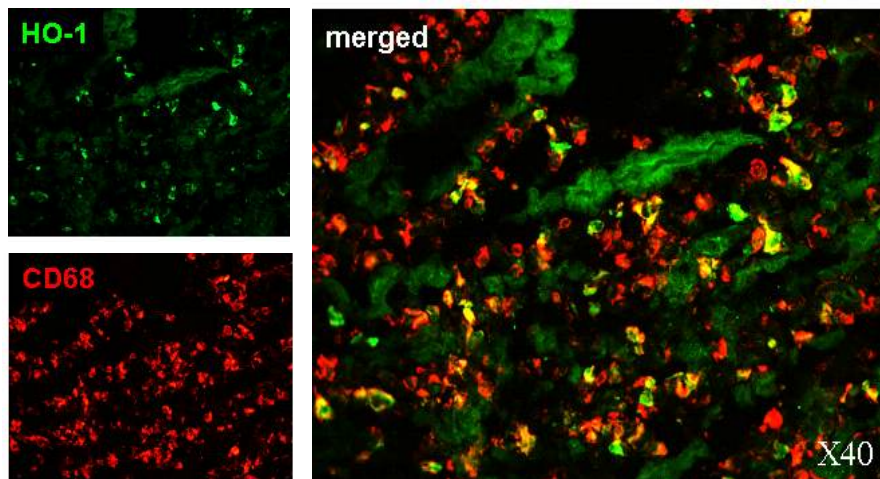


Figure C13 : Surexpression de HO-1 par des macrophages infiltrant les greffons des animaux ayant reçu sc28AT après transplantation.

Mécanismes favorisant l'induction ou l'augmentation de Treg par sc28AT

Je me suis plus particulièrement intéressé à comprendre quels mécanismes conduisent à une augmentation significative des Treg CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en périphérie et une accumulation dans le greffon après blocage sélectif de CD28.

Nous avons déjà exclu un effet superagoniste de sc28AT *in vitro* sur des PBMC humaines et *in vivo* chez le primate (pas de sécrétion massive de cytokines, ni d'activation pan-lymphocytaire). Cependant la sensibilité de CD28 pour les Tregs pourrait être différente des autres lymphocytes. C'est pourquoi nous avons démontré que les anticorps conventionnels anti-CD28 (en particulier les monovalents, dont sc28AT), n'induisent aucune prolifération de type « superagoniste » de Tregs humaines (CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}, pureté > 98,5%) *in vitro* (Fig. C14). Une stimulation sélective de la prolifération des Tregs *in vivo* est donc une hypothèse exclue.

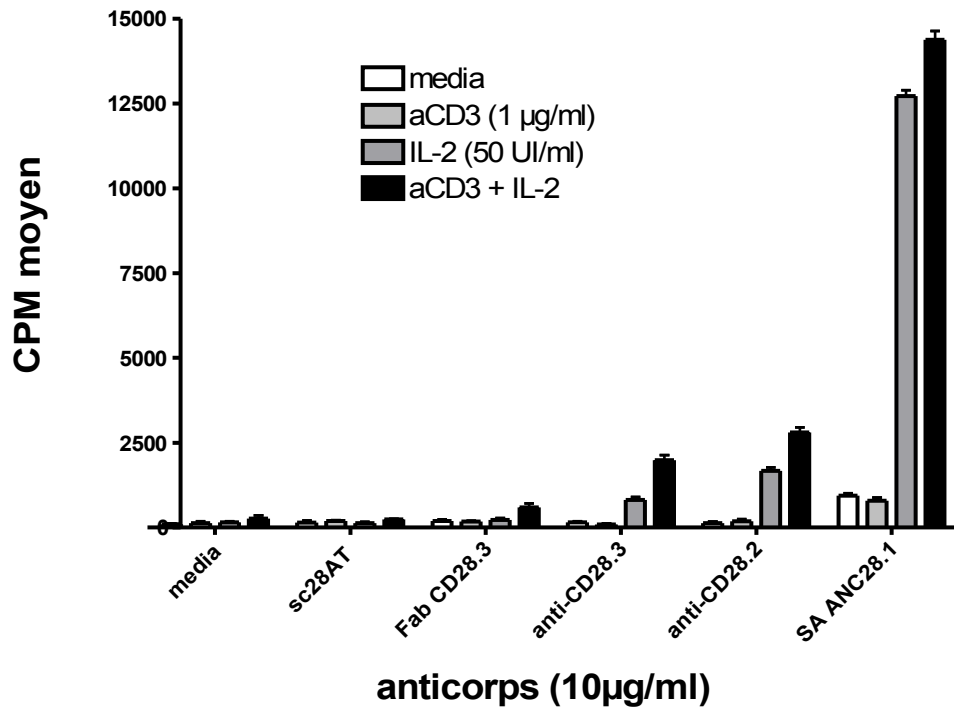


Figure C14 : Prolifération de Tregs humaines à J3 en présence de monovalent anti-CD28, des bivalents anti-CD28.3 ou CD28.2 et du superagoniste commercial ANC28.1. Les cellules sont stimulées ou non par un « coating » anti-CD3 à 1µg/ml en présence ou non d’une faible concentration d’IL-2 (50 UI/ml).

Comme il ne semble pas s’agir d’une stimulation de la prolifération des Tregs directement par sc28AT, nous nous sommes intéressés à leur induction de Tregs à partir de CD4 CD25- naïfs. Chez la souris, cette conversion est largement décrite comme étant dépendante de l’IL-2 + TGF-β et se produisant dans des conditions « subimmunogéniques » de stimulation (peu d’antigènes, peu de costimulation B7, CPA immatures, stimulation de CD28 inhibant cette induction, ...). Nous avons alors étudié si le blocage sélectif de CD28, qui peut en théorie induire des conditions « subimmunogéniques » et bloquer l’engagement des molécules B7, permet de faciliter ou d’induire plus de Treg par ce mécanisme de conversion. Pour cela, des lymphocytes T CD4+ CD25- humains ont été cultivés pendant 3, 5 ou 7 jours avec des DC (ratio 1/5 ou 1/20) allogéniques (générés à partir de monocytes + IL-4 et GM-CSF) immatures ou maturées avec du LPS, en présence ou non d’IL-2 +/- TGF-β, avec ou sans sc28AT à différentes concentrations. Après de multiples expériences, aucune condition (dans le contexte humain) ne semble induire préférentiellement la génération de Treg à partir de CD4 CD25- (pour exemple Fig. C15). Dans le contexte humain, les DC immatures ou matures, avec de l’IL-2 et/ou du TGF-β, semblent uniquement induire l’activation et la prolifération de

lymphocytes T effecteurs, qui expriment également CD25 et Foxp3 après activation. L'IL-2 dans ces expériences, permet notamment de maintenir une forte expression de son récepteur, CD25 (Fig. C15). Plus tard, plusieurs groupes ayant décrit cette génération de Treg chez la souris, décrivent (dans des revues) que ces mécanismes ne sont pas reproductibles chez l'homme. Il est donc difficile de savoir si le blocage sélectif de CD28 (dans le contexte humain) favorise l'induction de Treg.

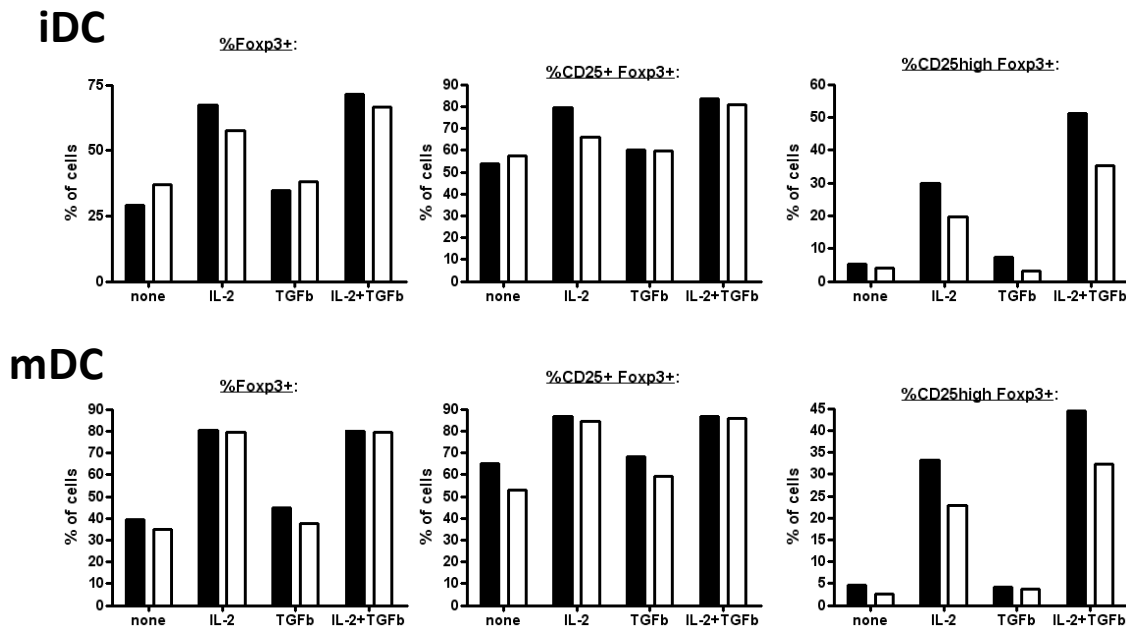


Figure C15 : Analyse phénotypique par FACS de lymphocytes CD4 naïfs cultivés pendant 7 jours avec des iDC ou mDC allogéniques (ratio 1/5) en présence d'IL-2 +/- TGF- β , avec (blanc) ou sans (noir) sc28AT (10 μ g/ml).

Enfin, un groupe a publié à deux reprises que, dans le contexte humain, les pDC activées par du CPG (TLR 9) conduisent à la conversion de CD4 naïfs en Treg et que cette induction est IDO et B7-dépendante. Nous avons donc voulu savoir si ces expériences (reproduites par aucun autre laboratoire) sont dépendantes de CTLA-4 et non de CD28, auquel cas le blocage sélectif de CD28, en favorisant l'engagement de CTLA-4, pourrait faciliter cette induction de Treg. Comme précédemment, l'activation ou non de pDC par un ligand du TLR9 ou 7 n'a permis dans aucune de nos nombreuses expériences d'induire de telles cellules régulatrices mais bien au contraire d'activer et d'induire la prolifération de lymphocytes T CD4 effecteurs (Fig. C16).

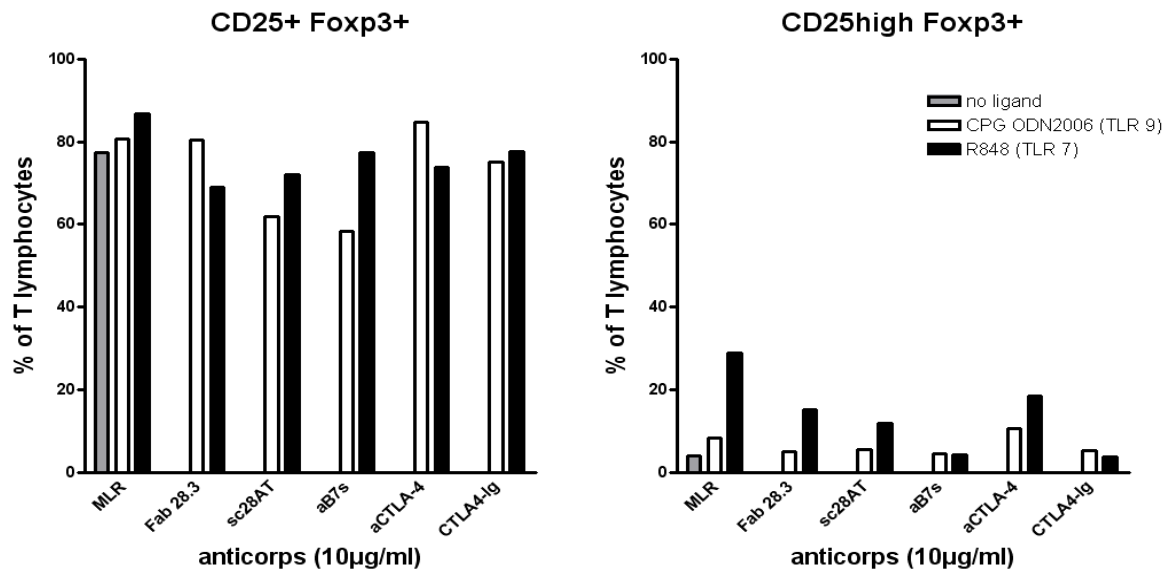


Figure C16 : Analyse phénotypique par FACS de lymphocytes CD4 naïfs cultivés pendant 5 jours avec des pDC allogéniques (ratio 1/10) en présence de CPG ODN 2006 (ligand TLR 9) ou de R848 (ligand TLR 7).

I.3- Discussion

Notre travail montre que le blocage sélectif de CD28, laissant libre l'interaction CTLA-4/B7, prévient les rejets aigu et chronique et prolonge la survie dans deux modèles précliniques de transplantation rénale ou cardiaque chez le primate non-humain. Nous montrons notamment que cette nouvelle stratégie induit une immunorégulation basée sur la disponibilité de l'interaction CTLA-4/B7 et qu'elle est compatible avec la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs qui semblent s'accumuler préférentiellement après transplantation.

Les agents bloquant la voie CD28/B7/CTLA-4, en ciblant B7, inhibent l'alloréactivité des lymphocytes T et préviennent le rejet aigu chez le primate ou chez l'homme (A D Kirk et al. 2001; Boulday et al. 2004; Christian P Larsen et al. 2005; Flavio Vincenti et al. 2005). Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle l'interaction CTLA-4/B7 en absence de CD28 régule la réponse lymphocytaire T n'a pas pu être vérifiée jusqu'à maintenant chez le primate. Chez le rongeur, il a été montré qu'un anticorps induisant une internalisation de CD28 inhibe les rejets aigu et chronique en transplantation (T J Dengler et al. 1999; Victor M Dong et al. 2002; Guillonnet, Séveno, et al. 2007). En revanche, aucun antagoniste « vrai » et sélectif de CD28 n'était disponible chez le primate. C'est pourquoi, notre équipe s'est particulièrement intéressée à développer un tel antagoniste sélectif de CD28 : sc28AT (Vanhove et al. 2003). Cette molécule est constituée d'un fragment monovalent *single-chain Fv* afin de prévenir une stimulation (par multimérisation) de CD28 en synergie avec des signaux TCR (Vanhove et al. 2003), « cross-réagit » avec le CD28 de primate et d'humain (KD de $6,8 \times 10^{-8}$ M), et inhibe la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T (**Figure 2A-B**). Sc28AT reconnaît le domaine DEF de la molécule CD28 (**Figure S1A**), qui comprend en partie le site de reconnaissance de B7, et qui est différent de l'épitope des anti-CD28 superagonistes chez l'homme et le rongeur (Lühder et al. 2003). De plus, nous avons montré *in vitro* chez l'homme que les monovalents anti-CD28 n'induisent pas de prolifération ou de sécrétion massive de cytokines comme les superagonistes sur des PBMC (**Figure S1B**) ou des Treg (**Figure C14**) et, *in vivo* chez le primate, que sc28AT n'induit aucune déplétion ou activation lymphocytaire (**Figure 3B-C, S1C**), ni de relargage massif de cytokines en périphérie (**Figure S1D**).

Dans cette étude, nous montrons également *in vitro* que le blocage sélectif de CD28 (par sc28AT) est différent du blocage de la voie en ciblant B7, puisque seul le blocage sélectif de

CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable (**Figure 1**) par un mécanisme CTLA-4 dépendant : le « reverse of the TCR-induced STOP signal » (Helga Schneider et al. 2006). La motilité accrue des lymphocytes T après engagement de CTLA-4, avec les molécules de B7 des CPA, empêchant ainsi la formation de ces synapses nécessaire à l'activation. Bien que cette augmentation de motilité lymphocytaire inhibe la formation de synapses immunologiques stables, nous ignorons quelles sont les conséquences *in vivo* d'une motilité accrue des lymphocytes T ? Ainsi se discutait toujours si l'activation d'un lymphocyte T naïf requière une interaction prolongée avec une seule CPA ou si l'activation requière de multiples contacts brefs avec différentes CPA. Le groupe de Amigorena S. a apporté une réponse à cette problématique en montrant par microscopie biphotonique que *in vivo* lors d'une réponse immune primaire, les lymphocytes T forment de longues interactions avec une ou des cellule(s) dendritique(s) et qu'ils ont une très faible motilité. En revanche, dans des conditions de tolérance spécifique à un antigène, ils n'observent aucun « STOP » des lymphocytes T, les contacts sont très brefs, les lymphocytes T sont mobiles et forment d'autres contacts très brefs avec d'autres CPA (Hugues et al. 2004; Bousso 2008). Il semble donc que des contacts stables soient nécessaires à l'initiation de la réponse lymphocytaire T, alors que des interactions brèves, multiples et continues semblent être une caractéristique des lymphocytes T dans des conditions tolérogènes.

Un point important sera d'analyser dans de futures expériences le comportement *in vitro* des Treg dans ces expériences de Time-Lapse en présence de sc28AT. En effet, un des mécanismes de plus en plus reconnu pour la fonction suppressive des Tregs est l'agrégation de ces cellules sur les CPA par un mécanisme LFA-1 dépendant (Q. Tang et Matthew F Krummel 2006; Onishi et al. 2008) ou Nr1p-1 dépendant (Sarris et al. 2008), empêchant ainsi l'accès aux lymphocytes T effecteurs. La question est donc de savoir si le blocage sélectif de CD28 empêcherait également les interactions prolongées entre les Tregs et CPA, inhibant alors leur fonction suppressive ? Pourtant, nous avons montré que la fonction suppressive des Tregs n'est pas dépendante de CD28, mais de CTLA-4, et que le blocage de CD28 non seulement n'empêche pas la suppression par les Tregs (**Figure 2C**) mais encore la renforce quand les Tregs sont activés par des cellules dendritiques matures (**Figure 2D**). Ce résultat peut s'expliquer par la théorie du modèle du « rhéostat » où la stimulation de CD28 par CD86 (surexprimé par l'inflammation) permet d'éteindre la fonction de ces cellules (David M Sansom et al. 2003). En revanche, en absence d'inflammation, CTLA-4, exprimé constitutivement sur les Treg et s'engageant préférentiellement avec CD80, permet aux Treg d'exercer leur fonction. Par conséquent, puisque l'inflammation est une composante

importante de l'acte de transplantation, le blocage sélectif de CD28 induirait deux mécanismes favorisant la suppression par les Tregs : 1) préservation de la fonction suppressive des Tregs en conservant la régulation CTLA-4 dépendante et 2) prévention de l'extinction de la fonction suppressive des Tregs en prévenant l'engagement de CD28 avec CD86. Il faut néanmoins rappeler que CD28 est nécessaire à la génération thymique et à la survie et prolifération en périphérie des Tregs (B Salomon et al. 2000; Hélène Bour-Jordan et Blueston 2002; Jeffrey A Bluestone et Abul K Abbas 2003). Une administration chronique pourrait donc s'avérer délétère sur le long-court, d'autant plus que les Tregs sont également dépendantes de la sécrétion paracrine d'IL-2 par les lymphocytes T effecteurs en périphérie (Tai et al. 2005; Shimon Sakaguchi et al. 2008), en partie sous le contrôle de la signalisation de CD28 (Thompson et al. 1989).

In vivo, malgré la fusion du scFv avec la molécule humaine d' α -1-anti-trypsine, la demi-vie est relativement faible (+/- 20 h, **Figure C5**), nous contraignant à une injection quotidienne en IV de sc28AT à 4 mg/Kg (doses relativement faible). Grâce à ces injections quotidiennes, la pharmacodynamie s'est révélée très bonne la première semaine post-transplantation (**Figure S3C**), mais s'est très vite dégradée après cette semaine avec une pharmacocinétique montrant des faibles taux résiduels 24h post-injection (**Figure S3A, C6**). En fait, tandis qu'en absence de transplantation la molécule sc28AT ne présentait aucune immunogénicité même après des injections répétées sur une période de 6 mois (**Figure C3**), en situation de transplantation, les animaux développent rapidement des anticorps BASCA (Baboon Anti-SC Antibody) de type IgM puis IgG (**Figure C8**), d'autant plus rapidement quand notre lot préclinique contenait de plus en plus d'agrégats (**Figure C7**). Ces anticorps BASCA, étant principalement dirigés contre ces agrégats (**Figure C9**), ne sont pas pour autant neutralisants et ne compromettent pas l'activité de sc28AT (**Figure C10**). Cette différence d'immunogénicité et de comportement de bioréactifs dans un contexte pro-inflammatoire vs conditions de repos interpelle aussi et pourrait s'expliquer par « la théorie du danger » de Matzinger (Matzinger 1994). Pourtant, la voie *iv* utilisée ici n'est pas une voie d'administration très immunogène en comparaison à la voie sous-cutanée ou intra-dermique.

En transplantation rénale chez le babouin, la monothérapie à 4 ou 8 mg/Kg s'est révélée décevante, peut-être en partie à cause de ce problème important d'immunisation précoce contre le réactif, avec une très faible prolongation de survie (**Figure 3A**). Chez le rongeur, le blocage de CD28 seul est suffisant pour induire une tolérance à une allogreffe rénale (Haspot

et al. 2005), mais en transplantation cardiaque il requière un court traitement avec de la cyclosporine A (Victor M Dong et al. 2002) ou un traitement CD40-Ig (Guillonnet, Séveno, et al. 2007). Il faut également rappeler que la molécule humaine de CTLA4-Ig d'origine s'est révélée inefficace dans la prévention du rejet aigu en transplantation rénale chez le primate (médiane de survie à 8 jours) et que ce n'est que la version modifiée (LEA29Y, affinité augmentée de 4 fois et 2 fois pour CD86 et CD80, respectivement) qui s'est révélée efficace dans la prévention du rejet aigu en monothérapie (médiane de survie à 45 jours) et surtout en association avec une immunosuppression chronique (Christian P Larsen et al. 2005). Le seul fait d'améliorer le KD de 6,5 à 3,6 nM pour CD80 et de 13,9 à 3,2 nM pour CD86 a permis cette nette amélioration dans la prévention du rejet aigu. Le KD expérimentale de sc28AT étant de 68,3 nM, il est possible que l'inefficacité en monothérapie soit en partie liée à une trop faible affinité. Des mécanismes du rejet CD28-indépendant ont précédemment été décrits et peuvent également expliquer ce manque d'efficacité en monothérapie (Yamada et al. 2001; Chitnis et al. 2001; Habicht et al. 2007), comme l'absence de tolérance par les traitements anti-B7s ou CTLA4-Ig chez le PNH (A D Kirk et al. 2001; Boulday et al. 2004; Christian P Larsen et al. 2005). Enfin, dans le modèle de transplantation cardiaque chez le macaque (collaboration avec le laboratoire de R. Pierson, Baltimore), nous avons montré une dose-réponse *in vivo* (**Figure 7A**), alors que la monothérapie à 2mg/Kg est relativement peu efficace (médiane de survie à 13 jours), une monothérapie à 10 mg/Kg a permis de prolonger de manière plus significative la survie (médiane de survie à 34 jours).

Malgré l'immunisation contre sc28AT et l'inefficacité des inhibiteurs de la calcineurine (CNI) pour prévenir cette immunisation (**Figure C8**), l'association avec les CNI a permis de prévenir significativement l'apparition du rejet aigu dans les deux modèles précliniques et les signes de rejet chronique (sévérité et incidence) à 3 mois dans le modèle de transplantation cardiaque (**Figure 3A, 7**). Dans notre modèle de transplantation rénale chez le babouin, alors que les animaux en monothérapie Tacrolimus développent un rejet dans la semaine suivant l'arrêt du traitement à 3 mois, les animaux en bithérapie n'en développent pas malgré l'interruption de tout traitement, avec notamment un animal qui s'est maintenu 6 mois et un autre plus de 40 jours sans aucun traitement et sans rejet aigu ou chronique (**Figure 3A, C12**). Malheureusement nous avons perdu précocement un animal 13 jours après l'arrêt du Tacrolimus sur un accident d'anesthésie, alors que l'analyse anatomo-pathologique excluait tout signe de rejet, et un autre animal sur pyélonéphrite. Par ailleurs, les autres animaux ont développé une insuffisance rénale chronique avec des signes de souffrances tubulaires et de

calcifications qui peuvent être attribués à une toxicité au tacrolimus dans notre étude (**Figure C12**). Le babouin ne semble donc pas tolérer aussi bien que l'homme des tacrolémies de 15-25 ng/ml. L'anesthésie quotidienne durant le premier mois pour l'injection de sc28AT, plus cette toxicité au Tacrolimus, peuvent expliquer la perte précoce (nécrose tubulaire, pyélonéphrite) ou à long-terme de ces animaux (accident d'anesthésie, insuffisance rénale).

Nous observons chez tous les animaux ayant reçu sc28AT après transplantation (mono- et bithérapie) que les Tregs (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} Foxp3⁺ CTLA-4⁺) augmentent très rapidement (dès la première semaine post-transplantation) en périphérie, alors qu'il n'y a pas d'augmentation chez les animaux contrôles non-traités ou en monothérapie Tacrolimus (**Figure 4A-C**). Ces Tregs se sont révélés être très suppressifs *ex vivo* (**Figure 4D**) et peuvent expliquer la non-réponse spécifique contre le donneur observée *ex vivo* chez les animaux en bithérapie (**Figure 3D**). Nous avons également retrouvé ces Tregs (CD3⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺) accumulés au sein des greffons des animaux en monothérapie sc28AT à 1 semaine et de manière stable en bithérapie à 1 mois et 3 mois post-transplantation (**Figure 5**), ainsi qu'une signature transcriptionnelle compatible avec la présence de ces cellules : surexpression de CD25, CTLA-4, Foxp3, TGF- β et HO-1, sous-expression de l'IFN- γ et de l'IL-6 (**Figure S5**). Cette accumulation de Tregs directement au sein du greffon peut alors expliquer la présence de forts infiltrats mononucléés, en particulier CD3⁺, dans le greffon de tous les groupes, alors que les animaux en bithérapie ne développent pas de rejet après l'arrêt de tout traitement (**Figure S4**). De même, nous observons que les lymphocytes B infiltrent de façon importante les greffons des animaux contrôles non-traités ou en monothérapie Tacrolimus, alors qu'ils sont faiblement présents dans tous les greffons des animaux ayant reçu sc28AT en mono- ou bithérapie (**Figure S4**). C'est un résultat important, car la présence d'un fort infiltrat en lymphocyte B est significativement corrélée avec la perte de greffon et le développement de sévère rejet aigu, résistant au glucocorticoïde, dans une étude de transplantation rénale chez l'homme (Sarwal et al. 2003). L'origine de l'inhibition de l'infiltration de ces cellules dans notre modèle peut être diverse. En effet, l'activation des lymphocytes B et la formation de centres germinatifs sont dépendants de la costimulation (Akalın et al. 1996), en particulier CD28, ICOS et CD40 ; les Tregs peuvent également être à l'origine de cette inhibition puisque ces derniers exercent également une fonction suppressive sur la réponse des lymphocytes B (Ludwig-Portugall et al. 2008). Par ailleurs, ces mécanismes peuvent également expliquer l'absence de développement d'alloanticorps dans notre modèle, y compris après 6 mois sans traitement. Le Tacrolimus peut également avoir un effet (bien qu'il

ne prévienne pas l'immunisation contre sc28AT) puisque les animaux en monothérapie Tacrolimus ne développent pas d'alloanticorps sous traitement. Enfin, nous observons au sein de ces greffons la surexpression des transcrits de l'Indoleamine-2,3-dioxygénase (IDO) qui est exprimée principalement dans la paroi des vaisseaux de ces greffons et peut-être des cellules dendritiques au phénotype immature (**Figure 6**). Les mécanismes à l'origine de cette surexpression de IDO dans les cellules endothéliales ne sont pas claires encore, à l'inverse d'autres modèles de rongeur de notre laboratoire (P Thebault et al. 2007; Guillonau, Marcelo Hill, et al. 2007), où les Tregs seraient responsables de cette expression dans les cellules endothéliales par un mécanisme dépendant de l'IFN- γ . Par ailleurs, le rôle de la molécule CTLA-4, ou des Tregs qui surexpriment CTLA-4, dans l'induction d'IDO au sein de cellules dendritiques est lui clairement identifié (Andrew L Mellor et Munn 2004).

Enfin, il est important d'essayer de comprendre par quel(s) mécanisme(s) les Tregs s'accumulent en périphérie et dans les greffons des animaux ayant reçu sc28AT. CD28 étant nécessaire à la génération thymique et à la survie et prolifération en périphérie, le blocage de CD28 devrait être néfaste à la régulation des Tregs (B Salomon et al. 2000; Jeffrey A Bluestone et Abul K Abbas 2003; Shimon Sakaguchi et al. 2008). Pourtant, nous observons cette induction dans les deux modèles primates, ainsi que dans un modèle de transplantation cardiaque chez la souris traitée par un scFv murin anti-CD28 (résultats non publiés). Dans ce modèle murin, la molécule CTLA-4 joue un rôle primordial puisqu'un anticorps anti-CTLA-4 est capable d'induire un rejet chez des souris rendues tolérantes par le scFv anti-CD28. De plus, bien qu'aucun réel travail sur les Tregs n'ait été effectué dans les modèles précliniques avec les anti-B7 ou CTLA4-Ig, notre étude au laboratoire a montré qu'il n'y avait pas de clones cellulaires suppresseurs, mais anergiques, au sein des cellules infiltrant les greffons des babouins traités par les anti-B7s (Boulday et al. 2004). De même, plusieurs études rapportent maintenant qu'en transplantation rénale clinique, les patients sous MMF + Belatacept n'ont pas plus de Treg en périphérie que les patients sous MMF + CsA (Chavez et al. 2007; J A Bluestone et al. 2008). Cette régulation après transplantation par les Tregs semble donc être spécifique des monovalents anti-CD28. En effet, alors que les anticorps anti-CD28 superagonistes chez le rongeur ou chez l'homme sont capables d'induire de manière indépendante du TCR une prolifération des Tregs, nous avons montré que sc28AT ou le Fab anti-CD28 n'induisent aucune prolifération de type superagoniste sur des PBMC ou des Tregs humaines *in vitro* (**Figure S1, C14**). L'hypothèse la plus vraisemblable est donc que les lymphocytes T allogéniques pourraient se différencier *in vivo* en lymphocytes T régulateurs

(au lieu d'effecteurs) en absence de signalisation CD28 alors que les interactions CTLA-4/B7 sont présentes. En effet, chez la souris, la conversion *in vitro* et *in vivo* de CD4 naïfs en Tregs requiert des conditions de stimulation suboptimales, comme la présentation de faibles concentrations d'antigènes, une faible costimulation (en particulier B7, expliquant que les cellules dendritiques immatures favorisent cette conversion), et l'absence de signaux CD28 (Belghith et al. 2003; Kretschmer et al. 2005; Benson et al. 2007). De plus, l'engagement sélectif de CTLA-4 peut favoriser l'induction de Treg spécifique de l'antigène *in vitro* et *in vivo* (Vasu et al. 2004; Ruobing Li et al. 2007). L'observation selon laquelle les PBMC des animaux en bithérapie présentent un défaut de prolifération spécifiquement contre le donneur est compatible avec cette possibilité, puisque ces Tregs induits ont un répertoire alloréactif alors que les Tregs naturels ont un répertoire auto-réactif (Curotto de Lafaille et Lafaille 2009). Nous avons donc souhaité vérifier cette hypothèse *in vitro* avec des CD4 naïfs humains, malheureusement aucune de nos expériences n'a pu induire une telle conversion de CD4 en lymphocytes T régulateurs (**Figure C15**). Les spécialistes de cette thématique de conversion semblent maintenant d'accord pour dire que ces mécanismes ne sont pas reproductibles chez l'homme, même après plusieurs restimulation en présence de TGF- β (Ethan M Shevach et al. 2008). Enfin, le groupe de B. Blazar (Mineapolis, USA) a montré dans deux articles que les cellules dendritiques plasmacytoïdes humaines (pDC), après stimulation TLR 9, sont capables d'induire la conversion de CD4 naïfs humain en Tregs par un mécanisme B7- etIDO-dépendant (Moseman et al. 2004; Wei Chen et al. 2008). Nous avons tenté de répéter ces expériences pour étudier les rôles respectifs de CD28 et CTLA-4 dans ce système et comprendre si par ce mécanisme sc28AT pourrait favoriser l'induction de Treg. Néanmoins, comme précédemment, nous n'avons pas observé d'induction de Tregs par ce système mais plutôt l'expansion et la prolifération de lymphocytes T effecteurs qui expriment également CD25, Foxp3, CTLA-4 et Lag-3 après activation (**Figure C16**). Depuis 2004, aucun autre groupe, y compris ceux spécialisés sur les pDC, n'a publié de tels résultats. *In vivo*, il semble donc que le blocage sélectif de CD28 favorise la balance Treg/Teff et l'hypothèse d'une conversion à partir de CD4 naïfs alloréactifs demeure plausible, peut-être la plus réaliste, en revanche nous n'avons aucun moyen à l'heure actuelle pour explorer cette piste *in vitro*. Enfin, l'immunogénicité et la faible pharmacocinétique de sc28AT n'ont pas permis d'atteindre des concentrations réellement saturantes, ce qui peut également expliquer cette modification de la balance Treg/Teff : les concentrations atteintes pourraient ne pas être suffisantes pour inhiber la survie et prolifération Tregs suite à l'inflammation post-

transplantation, alors qu'elles pourraient être suffisantes pour atténuer ou inhiber les réponses lymphocytaires effectrices.

I.4- Perspectives :

Cette première étude nous a appris de nombreuses choses quant aux mécanismes mis en jeu par notre stratégie, mais nous a surtout montré que le réactif tel quel n'est pas mûr pour une utilisation clinique (immunogénicité, faible demi-vie, formation d'agrégats, affinité non-optimale). C'est pourquoi, depuis plusieurs mois maintenant, une nouvelle molécule monovalente contre CD28 est en développement. Basé sur la stratégie du Fab pegylé anti-TNF ([Cimzia](#)) et à partir des parties murines de sc28AT, un Fab pegylé contre CD28 est en cours de production. Cette nouvelle molécule (FR104) sera ensuite modifiée : « humanisation » (les parties immunogènes seront modifiées) et mutation des régions responsables de la formation des agrégats. Avant ces étapes de modification, l'affinité a déjà été déterminée : $KD = 0,3nM$. Ce nouveau réactif est donc 200 fois plus affiné que sc28AT et 10 fois plus que la molécule belatacept qui est en étude clinique. Par ailleurs, le [Cimzia](#) ayant une très bonne demi-vie (+/- 12 jours), nous pouvons nous attendre à obtenir une nette amélioration de la pharmacocinétique et pharmacodynamie.

Cette nouvelle molécule fera l'objet d'une nouvelle étude préclinique dans notre modèle au cours de l'année 2010. L'association avec le Tacrolimus sera de nouveau testée, ainsi que l'induction de tolérance après arrêt des traitements, mais probablement avec des tacrolémies légèrement plus faibles et un protocole un peu plus court pour éviter la néphrotoxicité observée dans l'étude actuelle. Par ailleurs, une association MMF + FR104, de manière chronique, pourrait être envisagée pour étudier la possibilité de la non-utilisation d'inhibiteurs de la calcineurine aux propriétés néphrotoxiques. Enfin, parmi les traitements d'immunosuppression chimique, la Rapamycine pourrait également être intéressante en association avec une stratégie anti-CD28 monovalent. En effet, alors que les immunosuppresseurs chimiques semblent plutôt délétères à la régulation des Tregs, la Rapamycine pourrait synergiser avec le blocage sélectif de CD28 en favorisant l'expansion et la régulation de ces Tregs. En parallèle à cette étude chez le primate, une autre étude chez la souris humanisée (NOD/SCID reconstituée par des PMBC humaines) permettra d'évaluer l'immunotoxicité, en particulier l'effet superagoniste *in vivo* sur des cellules humaines, et l'efficacité dans la prévention du rejet d'une allogreffe d'îlots de Langerhans.

Un premier essai clinique pourrait avoir lieu d'ici 2011-2012 en fonction de nos résultats. Comme le belatacept, la stratégie (risquée) pourra être de ne plus utiliser les inhibiteurs de la calcineurine néphrotoxiques. La phase III actuelle avec le belatacept montre 22% de rejet aigu dans le groupe forte dose et 15% dans le groupe faible dose, contre 7% dans le groupe contrôle avec Cyclosporine A (résultats non publiés). Un court traitement en début de transplantation avec un CNI paraît finalement être requis pour « passer » la première phase précoce de greffe. L'induction de tolérance chez l'homme pourrait être une piste explorée si nos résultats chez les primates laissent entrevoir cette possibilité. Une confirmation de l'induction d'une régulation mettant en jeu les lymphocytes T régulateurs pourraient permettre d'ouvrir cette stratégie vers des pathologies autoimmunes (comme le diabète de type 1) ou la GVHD (Graft vs Host Disease) ; pathologies qui semblent, expérimentalement, bien répondre à une surrégulation par les Tregs.

II- Projet II

II.1- Article II

Rejet aigu humoral en allotransplantation rénale chez le porc alloimmunisé.

Nicolas Poirier*, Frédéric Maillet*, Marie-Line Barussaud, Karine Renaudin, Joanna Ashton-Chess, David Minault, Jeremy Hervouet, Jean-Paul Soullillou, et Gilles Blancho.

** Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article publié dans Journal of Surgical Research 139, 261-268 (2007).

Titre original : *Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs.*

ease and rapidity of breeding and low cost of pigs makes this species a valuable large animal model for transplantation studies. Nevertheless, while various models of blood transfusion-induced rejection [11], acute cellular rejection [12], or acute humoral xenograft rejection [13] exist in large animals, a model of acute humoral renal allograft rejection has yet to be described. We therefore set out to establish a model of AHR in pigs by inducing antidonor Ab in recipients prior to transplantation (Tx). To this end, pigs were alloimmunized by injection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from donors of identical blood group and subsequently received a renal transplant from the same donor. The efficiency of the alloimmunization as well as the nature of the induced rejection were studied.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiments were performed on 14 nonsibling pigs (five donors and nine recipients; EARL du Pont Romain, Surzur, France), weighing approximately 20 kg at the beginning of the study. The animals were housed at the large animals facility of the INSERM Unit 643.

All procedures were carried out under general anesthesia, consisting of induction with Zoletil (Virbac, Carron, France) followed by oro-tracheal intubation and ventilation with a mixture of 60% nitrous oxide, 40% oxygen, and 3% Isoflurane (Forène; Abbot, Rungis, France). Donor-recipient pairs were chosen according to identical blood group and major histocompatibility complex (MHC class II) mismatching by positive mixed lymphocyte culture (data not shown).

Study Protocol

Two recipients served as nonimmunized control animals, whereas six others were immunized with PBMC from three blood group-matched donors. In addition, one recipient was immunized against a specific donor and thereafter received a kidney transplant from a third-party animal to assess the donor specific humoral response *in vivo*.

Briefly, 40 mL of heparinized blood were collected from donors and PBMC were isolated by density gradient centrifugation over a lymphocyte separation solution (Eurobio, Les Ulis, France). After two washes in phosphate buffered saline (PBS) and lysis of RBCs in hypotonic lysis buffer, the cells were resuspended in 10 mL of PBS and counted. The cell concentration was adjusted to eighty million cells in 4 mL of PBS to be injected into the two potential recipients (forty million cells per animal). The injections were performed intradermally at the internal side of the right leg under neuroleptic analgesia (20 mg/kg of Zoletil). A second challenge injection was performed using the same dose and protocol at the same site, two weeks later. After confirmation of immunization by FACS, each animal received a renal transplant from the original PBMC donor during the plateau of immunization, between days 30 and 40 postinjection.

Confirmation of Immunization by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Four $\times 10^5$ donor PBMC were incubated with 25 μ L of recipient serum for 30 min at room temperature. After three washes in FACS buffer (PBS/1% FBS/0.1% azide) the cells were incubated with 25 μ L of FITC-labeled goat anti-pig IgG Ab diluted 1/150 (goat anti-pig IgG H and L, FITC; Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) for 30

min on ice in the dark. After three further washes in FACS buffer, the cells were resuspended in FACS buffer and analyzed immediately by a FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA) with CellQuest software (Becton Dickinson). As a negative control, the serum samples were tested in parallel with autologous recipient cells. To assess specificity of immunization, third party cells were also tested.

Renal Allotransplantation

Renal transplantation was performed between histoincompatible donor-recipient pairs determined by MLR analysis. One pig served as a donor for two recipients. The donor kidneys were harvested after heparinization (300 U/kg) and were washed in Ringer (B. Braun, Boulogne, France) at 4°C. Transplantation was performed immediately by a median incision in the heterotopic position, with end-to-side vascular anastomoses on the proximal section of the inferior vena cava and distal to the aorta. An end-to-end uretero-ureteral anastomoses was performed and protected by a double pigtail stent (6/16). Thereafter, the ureter was tied and the recipient was perfused, according to its blood pressure, with at least 500 mL of 10% Mannitol (Aguettant, Lyon, France), and 1 mg/kg of Lasilix (Sanofi-Aventis, Paris, France) 10 min before declamping. The animal was extubated on return to spontaneous ventilation and analgesia was continued with buprenorphine at 0.003 mg/kg (Temgésic; Schering-Plough, Levallois-Perret, France). Following Tx, the animals were maintained for 3 d in a metabolic cage, and received infusions of physiological serum (saline solution at 0.9%) for 2 L/24 h and perioperative treatments. Twenty-four h diuresis was monitored daily together with a blood test consisting of plasma creatinine, clinical chemistry measurement, as well as a blood formula enumeration. Three days post-Tx, the graft was inspected macroscopically and, in the case of rejection, a transplantectomy was performed for histological examination prior to euthanasia. One biopsy fragment was collected in Formol solution for histological examination and a second fragment was placed in Tissue Tek O.C.T. compound (Miles, Elkhart, IN) and snap frozen in liquid nitrogen for immunohistochemical studies.

Histology

Biopsy tissue was fixed in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded tissues were sectioned at 4 μ m and stained with hematoxylin and eosin. The distribution of infiltrate (focal, multifocal, diffuse), cell type (mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes), presence of edema, necrosis, capillaritis, arteritis, and interstitial hemorrhage was assessed. All sections were examined by a pathologist blinded to the experimental conditions.

Immunohistochemistry

Renal biopsy sections were cut at a thickness of 6 μ m and frozen at -20°C . After fixation in acetone (10 min), the sections were rinsed in PBS and rehydrated. Next, the sections were incubated for 30 min with a FITC-conjugated anti-pig IgG (Abcam, goat anti-pig IgG H + L-FITC diluted 1/150), a mouse anti-pig IgM (Serotec, Mouse anti-Porcine IgM Ab, diluted 1/150), or an anti-human C5b-9 monoclonal Ab (aE11, 5010; Diatec.com, Oslo, Norway, diluted 1/1000). After three washes in PBS, sections were incubated with a secondary Ab (Jackson Immunoresearch, donkey anti-mouse IgG H + L diluted 1/150) for a further 30 min. All incubations with fluorescent Ab were performed in the dark. After washing, the sections were fixed in a drop of Immu-mount, analyzed using a fluorescence microscope, and photographed using ACT-1 software.

Flow Cytometry Complement-Mediated Cytotoxicity Assay (FCCA)

Two $\times 10^5$ donor PBMC were incubated with 25 μ L of recipient serum (taken at day 28 postimmunization) for 30 min at 4°C. After

TABLE 1
Summary of Donor and Recipient Pigs Used in Each Study Group

Donor	Recipients	Immunization	Grafted	Histology
105	103	Nonimmunized (control)	Yes	Subnormal
	104	Nonimmunized (control)	Yes	Subnormal
102	106	Immunized	Yes	Suspicion of AHR
	107	Immunized	Yes	Suspicion of AHR
126	127	Immunized	Yes	Suspicion of AHR
	129	Nonimmunized (nonresponder)	No	
130	128	Immunized	Yes	Suspicion of AHR
	131	Immunized	Preoperative deceased	
207	210	Third party immunized	Yes	Subnormal

incubation, the cells were washed twice with FACS buffer (previously described) and then incubated for 30 min at 37°C with 25 μ L of rabbit complement diluted three times in PBS (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were washed twice with FACS buffer, and then incubated for 15 min at room temperature with 0.4 μ g of propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich). After a last wash, the cells were resuspended in FACS buffer and analyzed immediately using a LSR II Flow cytometer (Becton Dickinson), with DIVA software. The percentage of propidium iodide-positive cells was calculated to determine the extent of cytotoxicity as previously described [14]. Cells incubated with neither recipient serum nor rabbit complement, and cells incubated with rabbit complement alone, served as negative controls. To assess cytotoxic specificity, autologous and third-party cells were also tested. To calculate the percentage of specific cytotoxicity (% SC), recipient serum at day 0 postimmunization were also tested. Each experiment included a control containing complement in the absence of sera, as described [15].

$$\% \text{ SC} = \frac{[(\% \text{ PI-positive cells at Day 28}) - (\% \text{ PI-positive cells at Day 0})]}{100 - (\% \text{ PI-positive cells at Day 0})} \times 100 \quad (1)$$

Anti-Class I Depletion: Serum Absorption with Platelets

To test whether immunized animals developed anti-Class I immunization, recipient serum at day 28 postimmunization were incubated twice for 1 h at room temperature with a pool of platelets from 25 pigs, and tested in the same FCCA.

RESULTS

A summary of the immunizations and transplantations is given in Table 1. Eight of the nine planned transplantations were carried out; immunization was ineffective in one animal, as determined by an absence of antidonor Ab by FACS. One recipient died during the perioperative period following declamping of the graft because of an anesthesia-related complication.

Immunization

All recipient serum samples were tested against donor, autologous, and third party PBMC (Fig. 1B), until day 49 postinjection for the first two immunized recipients and, based on their kinetics, until day 28 for the others. As determined by FACS, antidonor antibodies were detectable (before Tx) in immunized recipient serum from day

14 onwards and reached maximal levels at day 28 in all but one recipient (animal 129) (Fig. 2A). As expected, control recipients displayed no immunization (Fig. 1A). A typical kinetic profile of immunization revealed by FACS is shown in Fig. 2B, with an increase in the percentage of fluorescent donor cells thus recognized by recipient Ab, but not in third party cells.

Renal Function

The creatinine values at the time of transplantation ranged from 62 to 106 μ mol/L (within the normal range for pigs). On the first post-transplant day, this stabilized at between 150 and 300 μ mol/L. Monitoring was not continued beyond day 3 because in preliminary Tx, rejection was already at a necrotic level at day 4, resulting in a graft that could not be exploited for further analyses.

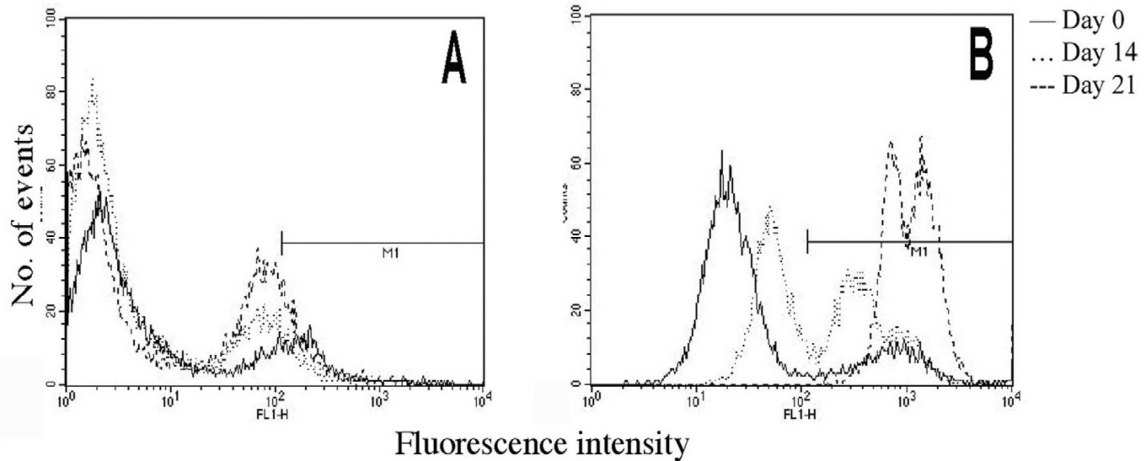
Graft Histology

In nonimmunized and third party-immunized recipient pigs (not shown), no differences between the grafted kidney at day 3 and the native kidney were observable upon macroscopic examination, whereas in the case of immunization, the graft was already severely altered with congestion, hemorrhage, or even ruptures (Fig. 3A). This rejection developed rapidly, since the graft was macroscopically preserved at day 2. Microscopic examination of the native kidneys of all animals revealed normal histology (not shown). The grafts of nonimmunized and the third party-immunized pigs had a normal aspect but nevertheless showed signs of potential initiation of acute rejection, such as mild infiltrate and mild tubular necrosis (Fig. 3B and D). On the contrary, the biopsies of the immunized pigs showed suspicious signs of acute humoral rejection, with interstitial hemorrhage, edema, a diffuse acute tubular necrosis, capillary margination of inflammatory cells, and also a marked mononuclear infiltrate, but no tubulitis or intimal arteritis (Fig. 3C).

Intragraft Antidonor IgM, IgG, and C5b9 Deposition

As determined by immunohistochemistry, the graft biopsies of native, nonimmunized and third party-

Panel A



Panel B

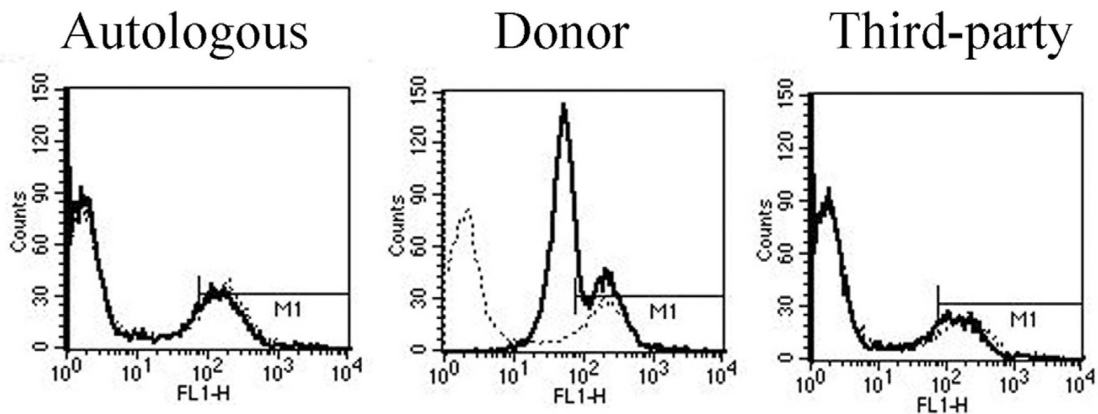


FIG. 1. Specific-immunization of pigs confirmed by flow cytometry. Panel A. A typical profile of IgG measured in the serum of a non-immunized control animal (A) and an immunized animal (B) by FACS at day 0, 14, and 21 post-Tx using donor cells. Panel B. Specific IgG production, measured by FACS, against donor but not third party or autologous cells in immunized animals. The two panels show that only immunized animals developed alloAb, which were directed specifically against donor cells and not against autologous or third-party cells.

immunized animals showed no evidence of IgM, IgG, or C5b9. On the contrary, biopsies taken from transplants of immunized animals were characterized by IgM, IgG, and C5b9 staining essentially in mesengial area, but not peritubular capillaries (Fig. 4).

Cytotoxicity Assay and Anti-MHC Class I Specificity of alloAb

Recipient sera were tested for FCCA against donor cells at day 0 and at the plateau phase of the alloimmunization. Cytotoxicity specific for donor cells was ob-

served with unmanipulated serum but no cytotoxicity against third-party cells was noted. The donor-specific sera preabsorbed on platelets showed a loss of cytotoxicity, proving that the induced alloAb were directed against donor MHC class I donor, since platelets are known to express only class I determinants [16, 17] (Fig. 5).

DISCUSSION

Acute humoral rejection, also called antibody mediated rejection, remains an unsolved problem in renal

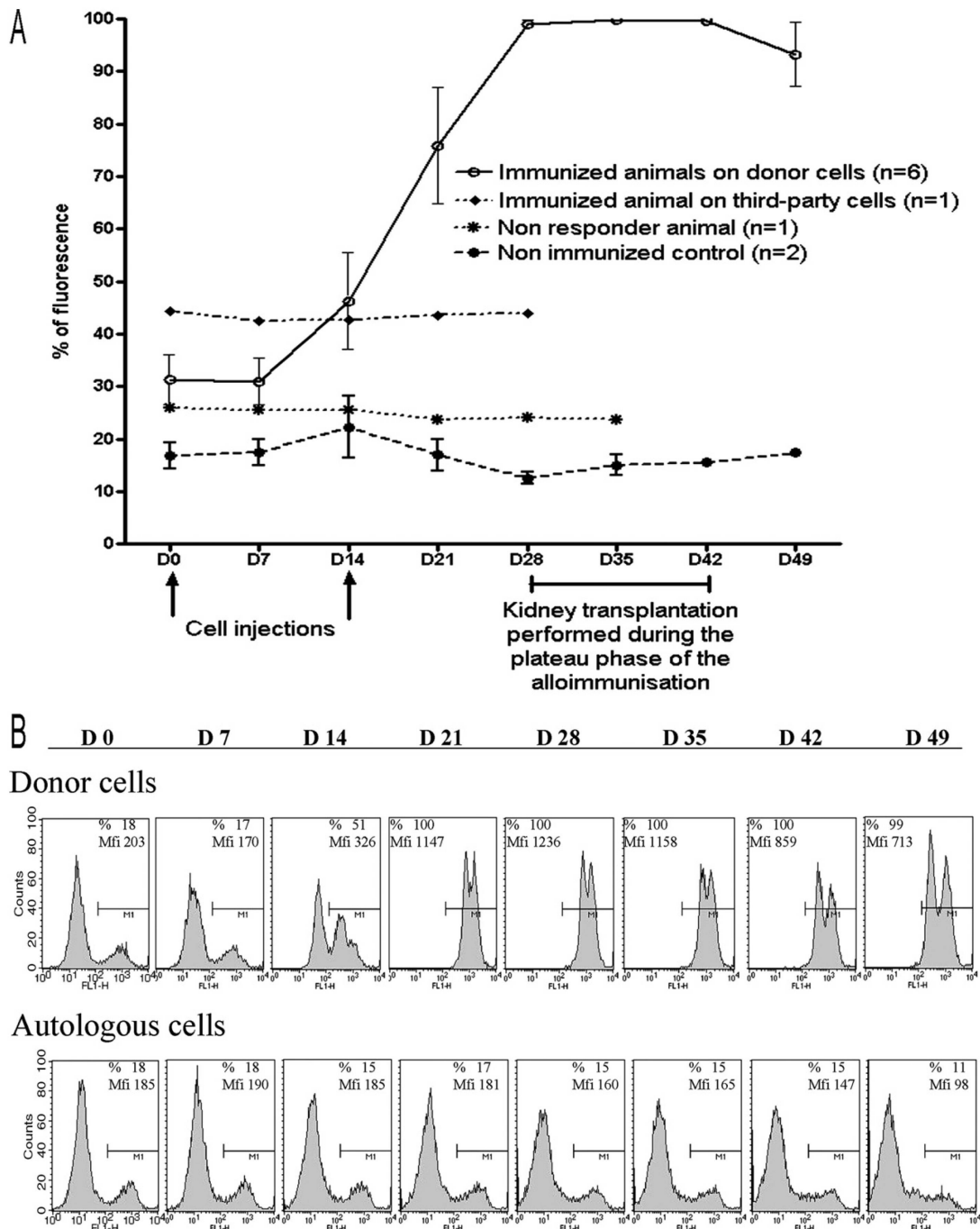


FIG. 2. Immunization kinetic of pigs confirmed by flow cytometry. (A) Appearance of IgG recognizing donor, but not third party cells, in immunized animals and not the non responder or non immunized control animals. (B) Typical kinetic measurement by flow cytometry of IgG in the serum from a recipient (106) directed against donor (102) but not autologous cells. The two panels show that immunized animals developed antidonor IgG from day 14 until day 28 postinjection when they reached a plateau.

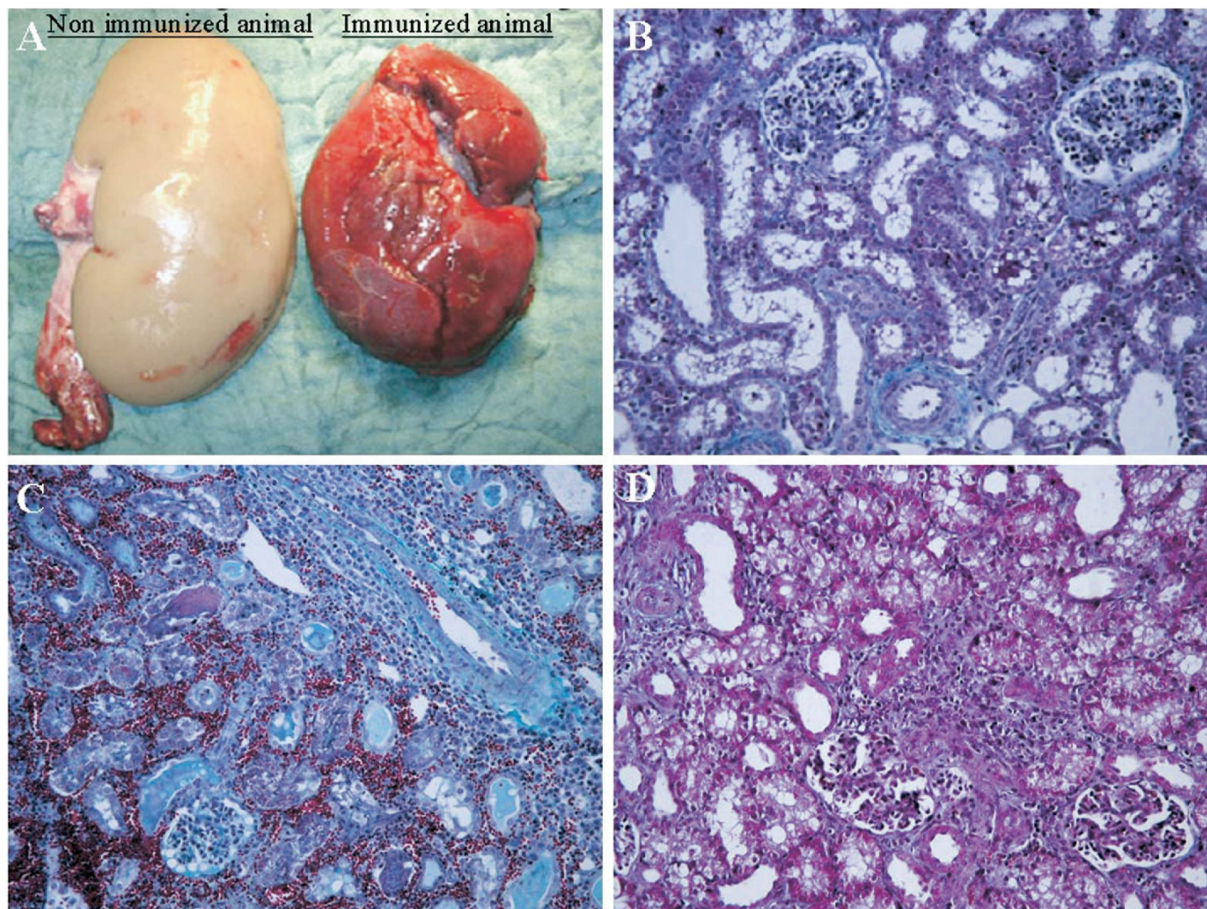


FIG. 3. Macroscopic examination and histology at day 3 post-Tx. (A) Representative gross and pathological changes of a rejected kidney graft by an immunized animal compared with a control graft from a non-immunized animal. (B), (C), and (D): Masson's trichrome at a $\times 20$ magnification. (B) Control graft with subnormal histology. (C) Graft from an immunized pig with suspicious signs of AHR, such as: interstitial hemorrhage, edema, acute tubular necrosis, and capillaritis. (D) Third-party immunized graft with subnormal histology.

allotransplantation. In this study, we set out to establish a large animal model of AHR, which would serve as a basis for future studies of its pathophysiology and of various immunointerventions aimed at its prevention or cure.

According to the results of a preliminary analysis (not shown), PBMC injection was found to be as efficient as skin Tx in immunizing pigs and was thus chosen for further studies. We chose to perform two injections at an interval of 15 d to boost the magnitude of the immune response. This method of immunization was found to be efficient in the preliminary animals (data not shown) as well as in six out of seven experimental animals. The animal on which the immunization did not work (animal 129) could have had an antigenic profile similar to its donor, although unfortunately this could not be proven. This animal was therefore excluded from the transplantation protocol. In animals on which immunization was

effective, antidonor Ab appeared from day 14, reached a plateau at day 28, and started to decrease by day 49. Thus, the day of Tx was chosen during this plateau period. By choosing to perform Tx during this short period, we have studied an induced immunization and not a memory response as observed also in the clinic (the study of a memory response could be the subject of a future experiment).

The appearance of antidonor Ab was demonstrated by flow cytometry with a fluorescent-labeled anti-pig IgG. The specificity of the induced Ab was confirmed by testing the recipient immunized sera against donor, autologous, and third party cells. The rapid appearance of Ab following PBMC injection was due to the absence of immunosuppression during the immunization phase. Furthermore, the use of FACS to detect and monitor the presence of antidonor Ab has already been established as a reliable sensitive and reproducible

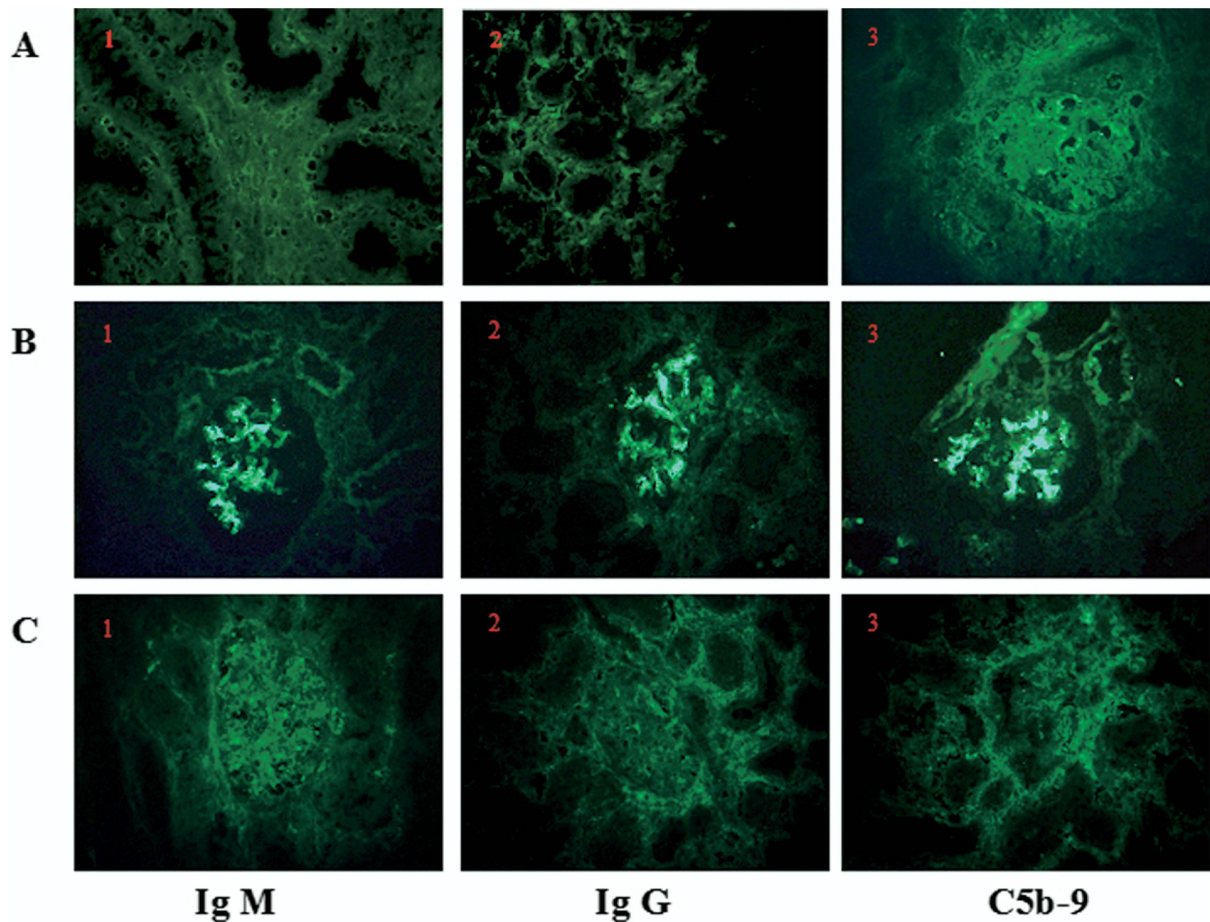


FIG. 4. Immunostaining within the graft at day 3 post-Tx. (A) Nonimmunized control animal. (B) Immunized animal. (C) Third-party immunized animal (1) IgM staining. (2) IgG staining. (3) C5b9 staining ($\times 40$ magnification). Strong IgM, IgG, and C5b-9 staining in the grafts of immunized pigs but not in those of nonimmunized controls and third-party immunized animals.

technique [4], and is thus more frequently used for clinical studies. However, this technique is not quantitative and therefore cannot be used to assess a threshold level of donor-specific Ab.

Such perioperative monitoring enabled the rejection to be easily detected. Acute renal allograft rejection in naive pigs and the third party immunized animal occurred after 1 wk, later than in the immunized recipients. In the majority of the alloimmunized animals, rejection was detected early on the third post-transplant day. In one animal, however, rejection had already started on day 2 and the graft displayed severe thrombosis by day 4. We chose to perform graft biopsies on day 3 so as to enable an early histological examination in the absence of ghost cells and marked ischemic lesions. The abnormalities observed in the control and third-party immunized pigs without clinical abnormalities sug-

gested the beginnings of a rejection process, which would probably become clinically significant a few days later because of the absence of immunosuppression. The grafts of alloimmunized pigs were all acutely rejected, displaying a marked hemorrhagic infiltration. The histology of the rejected kidneys was reminiscent of the AHR observed in rejection in the case of presensitized or hyperimmunized patients or in xenotransplantation. Infiltrating cells may also have participated to the tissue injury observed, but to a lesser extent.

In humans, nonspecific C4d and/or immunoglobulin staining within glomeruli is not considered as characteristic of AHR (unless it is intense), as opposed to C4d peritubular capillaries staining. In this model, immunoglobulin and complement staining were limited to the mesangial area, and were negative in peritubular capillaries. Nevertheless, none of the nonimmunized or

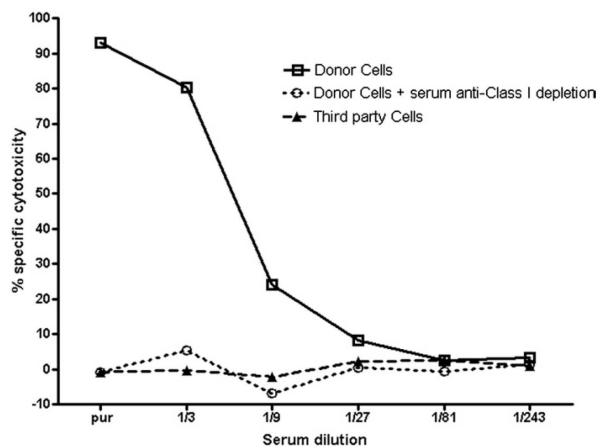


FIG. 5. Complement-mediated cytotoxicity and anti-MHC class I specificity of alloAb. Strong cytotoxicity of immunized recipient serum against donor but not third-party cells at the plateau of immunization. Depletion of antidonor class I Ab in immunized recipient sera by platelet absorption abolished cytotoxicity, proving the induced alloAb to be specific for donor MHC class I.

third-party immunized animals showed C5b-9 or immunoglobulin staining within glomeruli. Again, this feature is in accordance with rejection aspects observed in presensitized patients grafted in a positive cross-match context or in xenotransplantation.

Although recent data suggest that non-MHC Ab can be involved in AHR [18], the correlation between the presence of antidonor Ab in the serum, IgG, IgM, and C5b-9 within the biopsies, and an induced cytotoxic anti-MHC class I Ab immunization, confirmed the humoral nature of this rejection. In contrast, subclinical rejections in nonimmunized or third party-immunized animals showed no signs of Ab implication, but still showed some minor vascular damage, essentially due to the absence of immunosuppression. Based on these findings, immunizing pigs by PBMC injection seems to be an efficient method to provoke AHR in this allogeneic model. The model set up herein will enable us to study AHR in more detail, as well as to assess the impact of various types of immunointervention on this form of rejection. Such studies should enable improvement of current Tx protocols, especially in the case of AHR and presensitized or hyperimmunized patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by a grant from Agence de Biomédecine, France.

REFERENCES

1. Kamath S, Dean D, Peddi VR, et al. Efficacy of OKT3 as primary therapy for histologically confirmed acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1997;64:1428.
2. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: New concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:609.
3. Stegall MD, Gloor J, Winters JL, et al. A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody. *Am J Transplant* 2006;6:346.
4. Crespo M, Pascual M, Tolkoff-Rubin N et al. Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology, and clinical characteristics. *Transplantation* 2001;71:652.
5. Shah A, Nadasdy T, Arend L, et al. Treatment of C4d-positive acute humoral rejection with plasmapheresis and rabbit polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation* 2004;77:1399.
6. McCarthy GP, Roberts IS. Diagnosis of acute renal allograft rejection: Evaluation of the Banff 97 guidelines for slide preparation. *Transplantation* 2002;73:1518.
7. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, et al. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:779.
8. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria—an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003;3:708.
9. Schroeder TJ, Weiss MA, Smith RD, et al. The efficacy of OKT3 in vascular rejection. *Transplantation* 1991;51:312.
10. Moll S, Pascual M. Humoral rejection of allografts. *Am J Transplant* 2005;5:2611.
11. Tanabe K, Takahashi K, Nemoto K, et al. Effect of deoxyspergualin on vascular rejection in canine kidney transplantation. *J Urol* 1994;152:562.
12. Kiss E, Adams J, Grone HJ, et al. Isotretinoin ameliorates renal damage in experimental acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2003;76:480.
13. Kuwaki K, Knosalla C, Dor FJ, et al. Suppression of natural and elicited antibodies in pig-to-baboon heart transplantation using a human antihuman CD154 mAb-based regimen. *Am J Transplant* 2004;4:363.
14. Chen G, Qian H, Starzl T, et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidney. *Nat Med* 2005;11:1295.
15. Diaz TM, Moscoso I, Centeno A, et al. Flow cytometry complement-mediated cytotoxicity assays detects baboon xenobodies directed to porcine epitopes undetected by hemolytic assay. *Transpl Immunol* 2004;13:313.
16. Taylor CJ, Tang KG, Smith SI, et al. HLA-specific antibodies in highly sensitized patients can cause a positive crossmatch against pig lymphocytes. *Transplantation* 1998;65:1634.
17. Hosenpud JD, Shipley GD, Morris TE, et al. The modulation of human aortic endothelial cell ICAM-1 (CD-54) expression by serum containing high titers of anti-HLA antibodies. *Transplantation* 1993;55:405.
18. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005;352:558.

II.2- Article III

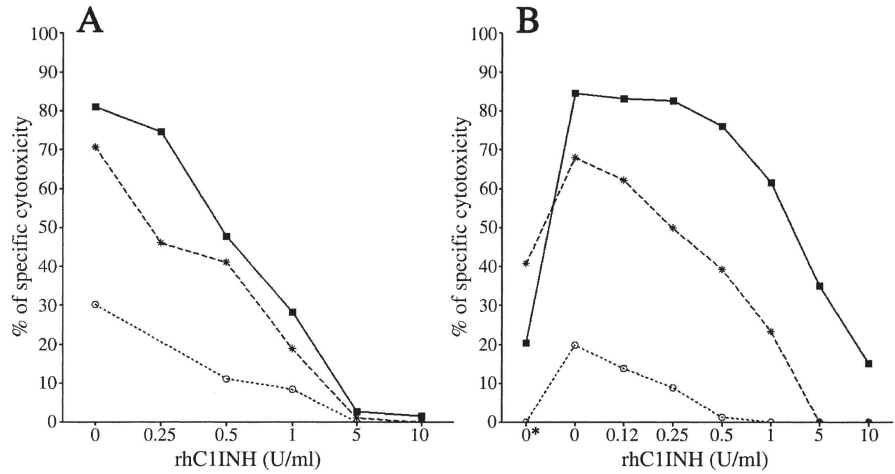
La molécule humaine de C1-inhibiteur recombinant inhibe la cytotoxicité induite par les allo- et xénoanticorps.

Nicolas Poirier et Gilles Blancho.

Article publié dans *Transplantation Proceedings*, 40, 581-583 (2008).

Titre original : *Recombinant human C1-inhibitor inhibits cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies.*

Fig 1. Anti-donor alloantibody cytotoxicity is inhibited by increased rhC1-INH concentration. **(A)** Preventive strategy: rhC1-INH added before 30-minutes complement incubation. **(B)** Curative strategy: rhC1-INH added 5 minutes after the beginning of 30-minutes complement incubation. 0* cytotoxicity after 5-minutes complement incubation without rhC1-INH; —, nondiluted sera of alloimmunized pig, ----, sera diluted three times,, sera diluted nine times.



the use of this reagent in vivo. Using a previously described cytotoxic test,⁷ two rhC1-INH therapeutic strategies were analyzed: (1) a preventive strategy, in which rhC1-INH was added before complement incubation, and (2) a curative strategy, where rhC1-INH was added 5 minutes after complement incubation.

RESULTS

As previously described,⁷ allo-Ab directed against MHC class I molecules were found to be cytotoxic against PBMC. The results in Fig 1 show that rhC1-INH produced dose-dependent inhibition, of cytotoxicity induced by anti-donor allo-Ab in the preventive (Fig 1A) as well as in the curative strategy (Fig 1B). An important cytotoxicity inhibition was observed by increasing rhC1-INH concentrations in the preventive strategy, with total abolition at 5 U/mL. In the curative strategy, cytotoxicity reversibility was observed with higher rhC1-INH concentrations.

Baboon sera were found to be highly cytotoxic toward pig PBMC, even with sera diluted 10 times (Fig 2). rhC1-INH

appeared efficient, in a dose-dependent manner, to prevent this cytotoxicity induced by xenogeneic Ab, with a total abolition from 17.5 U/mL (Fig 2A). The curative strategy in a xenoccontext was much less efficient, even with high rhC1-INH concentration (70 U/mL). However, by decreasing xeno-Ab titer (sera diluted 10 or 50 times), rhC1-INH recovered its efficiency in a dose-dependent manner (Fig 2B).

DISCUSSION

AMR remains an unsolved problem in allo- and xenotransplantation. We evaluated the potential therapeutic effect of a new rhC1-INH on the in vitro cytotoxicity induced by anti-donor allo-Ab, as well as xenogeneic Ab. Moreover, we chose to evaluate two different possible strategies to anticipate the potential therapeutic uses of rhC1-INH in allo-transplantation, as well as xenotransplantation.

According to previous results with a concentrated C1 inhibitor⁸ or other anti-complement agents,^{9,10} the rhC1-INH was able to inhibit complement activation. An important cytotoxicity inhibition was observed (and thus preven-

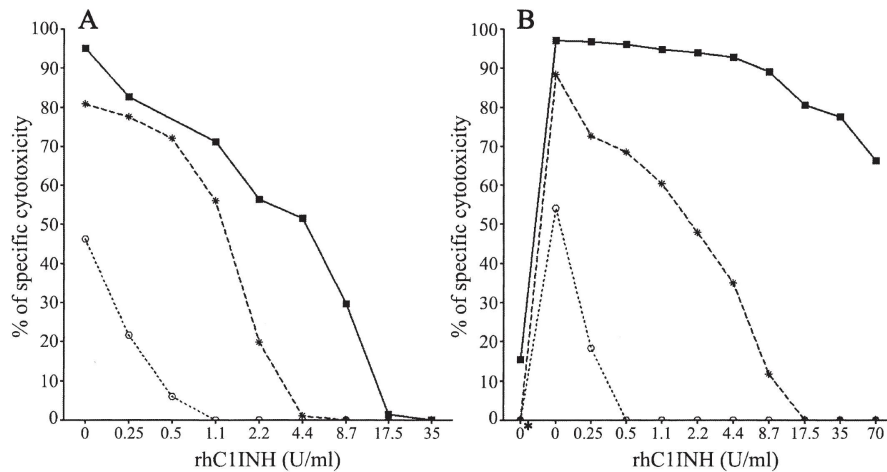


Fig 2. Xenoantibodies cytotoxicity is inhibited by increased rhC1-INH concentration. **(A)** Preventive strategy: rhC1-INH added before 30-minutes complement incubation. **(B)** Curative strategy: rhC1-INH added 5 minutes after the beginning of 30-minutes complement incubation. 0*, cytotoxicity after 5-minutes complement incubation without rhC1-INH; —, nondiluted sera of alloimmunized pig; ----, sera diluted 10 times;, sera diluted 50 times.

tion of complement activation) by increasing rhC1-INH concentrations before complement activation. Cytotoxicity abolition of anti-donor allo-Ab was observed in this preventive strategy with 5 U/mL, which corresponds nearly to 1.2 g/L, only two to three times the physiological concentration. The curative strategy also appeared to be efficient to reverse the cytotoxicity induced by anti-donor allo-Ab, but to a lesser extent than in the preventive strategy. Consequently, the therapeutic use of rhC1-INH in the goal of treating AMR should be realistic but with rhC1-INH plasma concentrations up to 10 U/mL.

Cytotoxicity of natural xeno-Ab was observed to be less suitable than anti-donor allo-Ab to complement inhibition by rhC1-INH. Preventive and curative strategies needed higher rhC1-INH concentrations possibly because of a high titer of preformed anti-Gal xeno-Ab. We noted a proportionate effect of increased rhC1-INH concentrations and xenoantibody titers, which prove that rhC1-INH efficiency, in the context of preformed circulating cytotoxic xeno-Ab, is dose-dependent. Indeed, whereas a preventive strategy appeared to be efficient *in vitro* at 17.5 U/mL of rhC1-INH, a curative strategy was expected to be efficient toward control of a strongly initiated xenogenic humoral response. The possibility of combining Gal-KO with transgenic pigs for complement regulators with an immunosuppression including rhC1-INH could help to overcome antibody-mediated xenograft rejection.

In conclusion, this study served as a basis for future *in vivo* studies aimed at the prevention or cure of AMR by rhC1-INH in allotransplantation, as well as in xenotransplantation.

REFERENCES

1. Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, et al: Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. *Transplantation* 52:214, 1991
2. Roos A, Daha MR: Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. *Transpl Immunol* 9:257, 2002
3. Ashton-Chess J, Roussel JC, Manez R, et al: Cellular participation in delayed xenograft rejection of hCD55 transgenic pig hearts by baboons. *Xenotransplantation* 10:446, 2003
4. Ashton-Chess J, Roussel JC, Bernard P, et al: The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation* 10:552, 2003
5. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al: Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411, 2003
6. Chen G, Qian H, Starzl T, et al: Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 11:1295, 2005
7. Poirier N, Maillet F, Barussaud ML, et al: Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs. *J Surg Res* 139:261, 2007
8. Vangerow B, Hecker JM, Lorenz R, et al: C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation* 8:266, 2001
9. Wang H, Liu W, Kubelik D, et al: Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine. *Transplantation* 79:1121, 2005
10. Thorgersen EB, Ghebremariam YT, Thurman JM, et al: Candidate inhibitors of porcine complement. *Mol Immunol* 44:1827, 2007

II.3- Article IV

La molécule humaine de C1-inhibiteur recombinant prévient le rejet aigu à médiation humorale chez le babouin alloimmunisé.

Xavier Tillou*, **Nicolas Poirier***, **Stéphanie Le Bas-Bernardet**, **Jeremy Hervouet**, **David Minault**, **Karine Renaudin**, **Fabio Vistoli**, **Georges Karam**, **Mohamed Daha**, **Jean-Paul Soulillou**, et **Gilles Blancho**.

** Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article en revision dans *Kidney International*.

Titre original : *Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons.*

**Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated
rejection in alloimmunized baboons**

X. Tillou*^{1,2}, N. Poirier*¹, S. Le Bas-Bernardet¹, J. Hervouet¹, D. Minault¹, K. Renaudin³, F. Vistoli¹, G. Karam¹, M. Daha⁴, JP. Soulillou¹, G. Blancho¹

¹ INSERM U643, IUN (Institut ITERT-Urology-Nephrology), Centaure network, Nantes, France. ² Department of Urology and Transplantation, University Medical Center, Amiens, France. ³ Pathology laboratory, CHU Hôtel-Dieu, Nantes, France. ⁴ Department of Nephrology, University Medical Center, Leiden, The Netherlands.

* Both authors contributed equally to this work.

Running title: C1-INH prevents AAMR in primate.

Address for Correspondence: Pr. Gilles Blancho,
ITERT, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd
Jean Monnet, F-44093 Nantes, France.

Tel.: 33 (0) 240 08 74 39, Fax: 33 (0) 240 08 74

11, E-mail address: gilles.blancho@chu-nantes.fr

ABSTRACT

Acute antibody-mediated rejection (AAMR) remains an unsolved issue in transplantation, especially in the context of pre-transplant immunization. The deleterious effect of preformed cytotoxic anti-HLA antibodies (Ab) through complement activation is well proven, but very little has been reported concerning complement blockade to prevent/cure AAMR. Here we used a baboon model of preimmunization to explore the prevention of AAMR by early inhibition of the classical complement pathway using human recombinant C1-inhibitor (rhC1INH).

Baboons were immunized against peripheral blood mononuclear cells from allogeneic donors and subsequently received a kidney from the same donor, once a specific and stable immunization had been established. Rejection occurred at day 2 post-transplant in untreated pre-sensitized recipients, with characteristic histological lesions of AAMR and complement deposition. Since rhC1INH blocks the *in vitro* cytotoxicity induced by donor-specific Ab, other alloimmunized baboons received the drug thrice daily by i.v. injection during the first five post-transplant days. Rejection could be prevented during the treatment, but occurred 1-2 days after treatment discontinuation.

These results demonstrate that early blockade of complement activation by rhC1INH can prevent AAMR in presensitized recipients suggesting that this treatment could also be useful in other forms of AAMR due to induced Abs.

INTRODUCTION

Acute antibody-mediated rejection (AAMR) remains a major hurdle in transplantation, with a constant incidence (8-10% in renal transplantation) and a markedly poor prognosis (27-40% of graft loss at 1 year) (1, 2). The diagnosis of AAMR in renal allografts is based on 3 well-defined cardinal features (1): 1- Morphologic evidence of acute tissue injury 2- Immunopathologic evidence of antibody involvement (C4d and/or immunoglobulin deposition (3)) 3- Serologic evidence of circulating antibodies to donor antigens.

Preformed donor-specific antibodies (DSA), induced by prior blood transfusions, transplantations or pregnancies, play a central role in this physiopathology. DSA are strongly associated with kidney graft loss and related to an increased risk of AAMR (4, 5).

Multiple forms of aggressive therapies are used to treat or prevent AAMR (reviewed in (6)), such as high dose intravenous immunoglobulin (IVIG), immunoadsorption/plasmapheresis, and anti-lymphocyte Ab. However, the efficacy of these treatments is questionable, given the elevated percentage of graft loss at 1 year and the high rate of severe, refractory and steroid-resistant AAMR. More recently, the addition of rituximab (anti-CD20 mAb) with or without desensitization protocols led to an improvement in outcome in patients suffering from AAMR (7), although refractory rejections still occurred, probably mediated by spleen memory B cells and bone marrow plasma cells that do not express CD20. Some groups have suggested adding splenectomy as a rescue therapy, which would eliminate the majority of the lymphocyte pool and possibly some plasma cells (8). All of these desensitization procedures aim at lowering DSA levels and their activity or at depleting DSA-secreting cells. However, besides high dose IVIG that has an inhibitory effect on complement activation *in vitro* (9), none of these desensitization procedures target the classical complement pathway activated by Ag-Ab binding.

The role of the classical complement pathway is broadly documented in allo- and xenotransplantation (10). Briefly, the classical pathway is activated upon C1q binding to antibody-antigen complexes, leading to the formation of split products such as C4d, and finally to the deposition of membrane attack complex (MAC) C5b-9, cell lysis and severe graft injury. Several strategies that inhibit complement activation at different steps have been reported, such as the use of the soluble complement receptor 1(sCR1), C5a receptor antagonist, anti-C5a antibody and cobra-venom factor (CVF) in the ABO-incompatible or xenotransplantation settings (reviewed in (11)). Transgenic expression of human complement regulatory molecules, such as CD46, CD55 and CD59 has also shown efficacy in pig

xenografts (reviewed in (12)). A few studies reported the use of concentrated C1-inhibitor (a physiological inhibitor) extracted from human plasma, to specifically block the classical pathway by acting directly at its first step of activation (13, 14). Recently, a recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) has been developed, produced in transgenic rabbit milk (15), and is currently undergoing phase III clinical trials for the treatment of hereditary angiodema (16). We have recently proven that this rhC1INH inhibits *in vitro* cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies (17).

The aim of this study was to analyze the effect of this rhC1INH (provided by Pharming technologies BV, Leiden, Netherlands) in the prevention of AAMR in presensitized baboon renal allograft recipients. Here, we describe a model of AAMR in non-human primates (NHP) and show that early blockade of the classical complement pathway alone, by rhC1INH, is sufficient and effective at preventing acute AAMR during the treatment phase.

RESULTS

Alloimmunisation

Two intradermal injections of donor PBMC, with a 2-week interval, were sufficient to immunize all baboons. As determined by FACS, anti-donor IgG antibodies were detectable in recipient sera 2 weeks after the second injection and increased until reaching a plateau after 3 to 4 weeks (Figure 1A). Some animals (2/8 in this study), developed earlier alloAb, (2 weeks after the first injection) and were therefore immunized a second time in order for the transplantations to be performed systematically during the plateau phase at a similar time post immunization. These alloAb were specifically directed against donor Ag, since they bound donor cells but neither autologous nor third party cells (Figure 1B). Recipient sera were then tested for cytotoxicity against donor cells at day 0 and at the plateau phase of the alloimmunization. Specific cytotoxicity for donor cells was observed without cytotoxicity against third-party or self cells (Figure 1C). Finally, donor-specific sera lost their cytotoxicity when pre absorbed on donor platelets (expressing only class I antigen; Figure 1D), proving that the induced alloAb were cytotoxic and directed against donor MHC class I molecules.

Anti-donor presensitization induces AAMR

Whereas non-immunized and non immunosuppressed baboons (n=3) rejected their kidney allograft around day 6 post transplantation; preimmunized recipients (n=4) developed an accelerated rejection (p=0.0134), 3 animals rejected at day 2 and one at day 3 (Figure 2A-D). At the autopsy, none of the animals shown any signs of Disseminated Intravascular Coagulation (DIC), platelet consumption or vascular thrombosis (data not shown). Graft histology after rejection in non-immunized animals showed typical signs of acute cellular rejection with a large and diffuse mononuclear cell infiltrate with tubulitis, and some vascular infiltration (Figure 3A). In contrast, pre-sensitized recipient grafts showed severe alterations and lesions characteristic of AAMR, with interstitial hemorrhage, edema, a diffuse acute tubular necrosis, capillary margination of inflammatory cells, and also a small mononuclear cell infiltrate, but no tubulitis or intimal arteritis (Figure 3B). By immunohistochemistry, deposition of C5b-9 and C3c was detected around glomeruli and tubules as well as in arteries and capillaries but was absent in controls. However, whereas C3c staining clearly revealed peritubular capillaries, C4d staining remained essentially restricted to glomeruli and arteriolar endothelium (Figure 3A-B). Finally, the dense CD3⁺ and CD20⁺ cell infiltrates present in rejected grafts of non-sensitized recipients were barely detectable in rejected grafts of alloimmunized monkeys (Figure 3A-B).

rhC1INH inhibits alloantibody-mediated cytotoxicity

The efficiency of rhC1INH in inhibiting complement activation by alloAb was analyzed by a cytotoxicity assay. Recipient sera were tested for cytotoxicity against donor cells at the alloimmunization plateau, with increasing concentrations of rhC1INH. Cytotoxicity was inhibited by rhC1INH in a dose-dependent manner, and was totally abolished at 2g/L (Figure 1E).

rhC1INH therapy prevents AAMR in presensitized recipients

Preliminary experiments showed the estimated half-life of rhC1INH to be approximately 6 hours (data not shown). Therefore, recipients received 1 i.v. injection every 8 hours during the first five post-transplant days. The two first alloimmunized baboons, receiving 100 Units/Kg of rhC1INH, showed suboptimal plasmatic concentrations, with a C_{max} at 15 min rising to just 0.6g/L (Figure 4A). One of these two recipients rejected on day 4, whereas the second one rejected on day 6, one day after treatment discontinuation (Figure 2A-D). The two subsequent recipients received 200 Units/Kg and showed a better pharmacological profile, with a C_{max} of 1g/L at 15 min but the same C₀ as the recipients receiving 100 Units/Kg (Figure 4A). No rejection occurred during the treatment, but did so rapidly thereafter at day 6 and 7 respectively, like the non-sensitized untreated recipients (Figure 2A-D). As expected, total IgG seric levels decreased in both group (Figure 4B) suggesting an early, but not deleterious (without complement activation), Ab binding into the graft. However, serum monitoring of the C3 and C4 complement fractions (Figure 4C-D), as well as functional analysis of the classical (CH50), alternate (AP50) and Mannose Binding Lectin (MBL50) pathways of the complement system (Figure 4E-H) did not differ significantly between treated and non treated animals. However, some activation of the alternate pathway was noticed from day one, probably due to the surgical stress as already known (20). Histological examination of the rejected organs showed signs characteristic of AAMR (Figure 3C) under both regimen, albeit less pronounced in the more intensively treated baboons. Immunostaining of graft biopsies revealed a poor infiltration of T and B cells in the 100 Units/Kg recipients (data not shown) and a mild infiltration (but still less than the non-sensitized controls) in the animals receiving 200 Units/Kg (Figure 3C). Complement deposition did not differ between untreated pre-sensitized recipients and recipients treated with 100 Units/Kg (data not shown). Finally, C4d artery staining was absent and C3c and C5b-9 deposition was less pronounced in the 200 Units/Kg group, even 1 to 2 days after drug discontinuation (Figure 3C).

The stability of the classical pathway, associated with complement factors deposition, suggests strongly an activation only locally inside the graft.

DISCUSSION

The increasing detection of AAMR in allotransplantation together with the suboptimal current treatments justify the need to develop a relevant preclinical model to study the mechanisms involved in this pathology and to test new therapeutic strategies. In this study, we describe a stringent primate model of rapid AAMR that could look close to hyperacute rejection described in presensitized patients, ABO-incompatible transplantation and xenotransplantation. Moreover, we demonstrate that early blockade of the classical complement pathway, through rhC1INH, is effective at preventing this form of rejection.

According to our previous study in pigs (18), two subsequent intradermal injections of donor PBMC were sufficient to immunize all recipients prior to transplantation. To ensure a stringent and reproducible model of AAMR, we preferred not to perform transplantation before the appearance of alloAb, but rather only in graft recipients with a positive cross-match, with a plateau of anti-donor alloAb. All immunized animals developed specific anti-donor antibodies directed against MHC Class I molecules that were cytotoxic in the presence of complement. This sensitization procedure resulted in an accelerated rejection of the immunizing donor organ, within 48-72h, as opposed to one week for untreated non-immunized baboons. At transplantectomy, rejected kidneys were characterized by an intense edema, congestion, hemorrhagic infiltration or even graft ruptures without obvious signs of DIC. The histology of these rejected grafts was compatible with that observed in presensitized or hyperimmunized patients with severe humoral injury. Infiltrating cells were rare at day 2, and were therefore unlikely to contribute to the rejection processes, at least to any great extent. C4d staining outside PTC (glomeruli, vessels etc.) in humans is generally considered as nonspecific. In this model complement deposition (C3c, C4d and C5b-9) was restricted to the mesangium, tubules and blood vessels. Only C3c staining was detected in PTC. C4d, the well characterized molecule that stains PTC in humans thus appears to be less specific in NHP.

Given the pivotal role of complement-fixing alloAb clearly described in this context of AAMR, the aim of this study was to test the effect of blocking classical complement pathway activation, with a view to associating this strategy with other anti-humoral therapies. Recently, Montgomery's group successfully used an antibody (Eculizumab) directed against the complement protein C5 to treat severe AAMR (19). rhC1INH is currently being studied in a phase III trial of hereditary angiodema but to date has never been used in transplantation or autoimmunity. This molecule may offer the advantage of specifically blocking the

complement activation pathway and leaving the alternative and lectin pathways intact so as to preserve antibacterial defense. As previously described (17), this molecule was very efficient *in vitro* at inhibiting induced alloAb cytotoxicity. The 6-8 hour half-life of rhC1INH in baboons meant that we had to establish a protocol of 3 i.v. injections per day. Such a treatment schedule could only be envisioned in the context of a short-term treatment of a rejection crisis or during the induction phase. In this proof of evidence study, we administrated the drug for 5 days simply to test whether monotherapy using complement blockade would enable the pre-immunized recipients to experience the same post transplant course as non immunized recipients who reject after day 5. The plasmatic concentrations of C1-inhibitor reached in our model appeared to be efficient in preventing AAMR during the effective treatment phase. As expected, treated animals rejected their grafts at day 6 or 7 with humoral rejection and a few signs of cellular injury, and it is clear that a full curative strategy should associate T and B cell immunosuppression. This will be the object of our next *in vivo* studies in this model. In immunized untreated rejected animals, no activation of the classical pathway was noticed in the peripheral blood, but only locally inside grafts. In fact, we did not notice any significant modulation of the classical pathway during the rhC1INH use, suggesting essentially a local effect at the site of Ab binding within the graft on the classical pathway activation, as shown by the C4d staining. C1-inhibitor has also been described as having a broad range of effects of potential interest in the context of transplantation, such as inhibition of T cell activation, inhibition of leukocyte transmigration, inhibition of endothelial activation, and protection against ischemia-reperfusion damage (reviewed in (20)). However, in this model we did not observe any reduction in T cell involvement and *in vitro* no effect was observed in T cell activation and proliferation assays (data not shown). One important risk of any complement inhibiting strategy, especially in the context of additional immunosuppression, is a potentially increased susceptibility to infection. An interesting characteristic of C1-inhibitor is its protective role in sepsis through enhancement of bacterial uptake by and/or bactericidal capacity of phagocytes (21). Moreover, we could anticipate as well its use in Ab mediated renal diseases such as lupic nephropathy or vasculitis.

In conclusion, we describe here a stringent pre-clinical model of AAMR in NHP, which enabled us to study the mechanisms involved in this pathogenesis and to test a new strategy aimed at preventing or treating AAMR. In this study, we showed that early blockade of the classical complement pathway alone, using the rhC1INH molecule, could prevent AAMR in presensitized and hyperimmunized patients. These data suggest that this molecule may be

even more efficient in less severe experimental or clinical situations. More studies will be required to assess whether the association of C1INH-based complement inhibition with other strategies aimed at lowering DSA levels and/or eliminating secreting and memory B cells, could improve the overall impact on AAMR.

MATERIALS AND METHODS

Animals

In vivo studies were performed on 13 baboons (*Papio anubis*; from the CNRS primatology center, Rousset, France). Animals were housed at the large animal facility of our laboratory and all experiments were performed in accordance with our institutional ethical guidelines. Pharmacokinetic studies of rhC1INH were performed in naive animals. Three groups of transplant recipients were included for study: three non immunized recipients receiving no treatment, four immunized recipients receiving no treatment and four immunized recipients receiving 3 daily i.v. injections of rhC1INH for the first 5 post transplant days. The first injection was performed before declamping of graft vessels. Two of the 4 treated animals received 100 Units/Kg of rhC1INH per injection and 2 others received 200 Units/Kg per injection.

Immunization protocol

Donor-recipient pairs were chosen according to an identical blood group, the absence of preformed donor-specific antibodies and major histocompatibility complex (MHC class II) mismatching assessed by positive mixed lymphocyte culture and PCR techniques (data not shown). Briefly, 80 ml of heparinized blood were harvested from donors and PBMC were isolated by density gradient centrifugation. After lysis of red blood cells, cells were resuspended in PBS and adjusted to 20×10^6 /ml to be injected intradermally into recipients (2 injections of 1ml per animal). A challenge injection was performed with the same protocol two weeks later. After confirmation of immunization by FACS, each animal received a renal transplant from the original donor at the plateau of immunization.

Anti-donor antibody detection

Donor PBMC were incubated for 30 min at room temperature with heat inactivated recipient sera collected weekly. After washing in FACS buffer, cells were incubated with FITC-labeled goat anti-monkey IgG (H&L, Serotec) for 30 min on ice in the dark. Cells were washed and resuspended in FACS buffer and analyzed using a LSR IITM Flow cytometer (Becton Dickinson) with DIVA software. To assess the specificity of immunization, serum samples were tested in parallel with autologous recipient and third party cells.

Complement-mediated cytotoxicity Assay

As previously described (17), donor PBMC were stained with propidium iodide, after incubated with recipient sera and rabbit complement, to be analyzed by FACS. To assess cytotoxic specificity, autologous and third-party cells were also tested. As previously described (18), to test whether immunized animals developed anti-Class I alloAb, positive recipient sera were incubated twice for one hour at room temperature with 10×10^9 donor platelets and tested in the test. In some experiments, the rabbit complement incubation step was performed in the presence of different concentrations of rhC1INH (0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 g/L).

Renal transplantation

Life-sustaining renal allotransplantation was performed as previously described (18). Twenty-four hour diuresis was monitored daily as well as BUN (blood urea nitrogen). Transplantectomy was performed when plasma creatinine increased to $400 \mu\text{M}$ and/or absence of diuresis. Surgical biopsies were performed for histological examination prior to euthanasia. For ethical reasons, no protocol biopsies were planned but rather only for clinical events. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin (H&E) histological examination and a second fragment was placed in Tissue Tek O.C.T. Compound (Miles), snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for immunohistochemical studies.

Histology and immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were cut at $4 \mu\text{m}$ and stained with H&E. All sections were examined by a pathologist in a blinded manner.

Immunostainings were performed on transplantectomy sections cut at a thickness of $10 \mu\text{m}$ and fixed in acetone. Sections were incubated for one night at 4°C with either a rabbit anti-human CD3 (Dako), mouse anti-human CD20 (clone L26, Dako), mouse anti-human C4d (Quidel), mouse anti-human C5b-9 (clone aE11, Diatec) or rabbit anti-human C3c (Dako). After washing, sections were incubated with either FITC-labeled goat anti-mouse IgG (Beckman Coulter) or FITC-labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) for 90 min at room temperature. Sections were analyzed using a fluorescence microscope and Axion Vision software. All Ab used for staining were previously checked for cross-reactivity on baboon counter part.

Measurement of serum total immunoglobulin G and complement monitoring.

Total immunoglobulin G level was evaluated by serum electrophoresis. Complement factors were measured in 1/20-diluted heparinized samples using rabbit antisera to human complement factors C1-inhibitor, C3 and C4 (Dade Behring). Measurements were made by a Berhing Analyzer II machine using nephelometry at room temperature and after 4 hours of incubation. Functional analysis of the classical (CH50) , alternative (AP50) and Mannose Binding Lectin (MBL50) pathways of the complement system were determined by ELISA as previously described (22).

ACKNOWLEDGMENTS

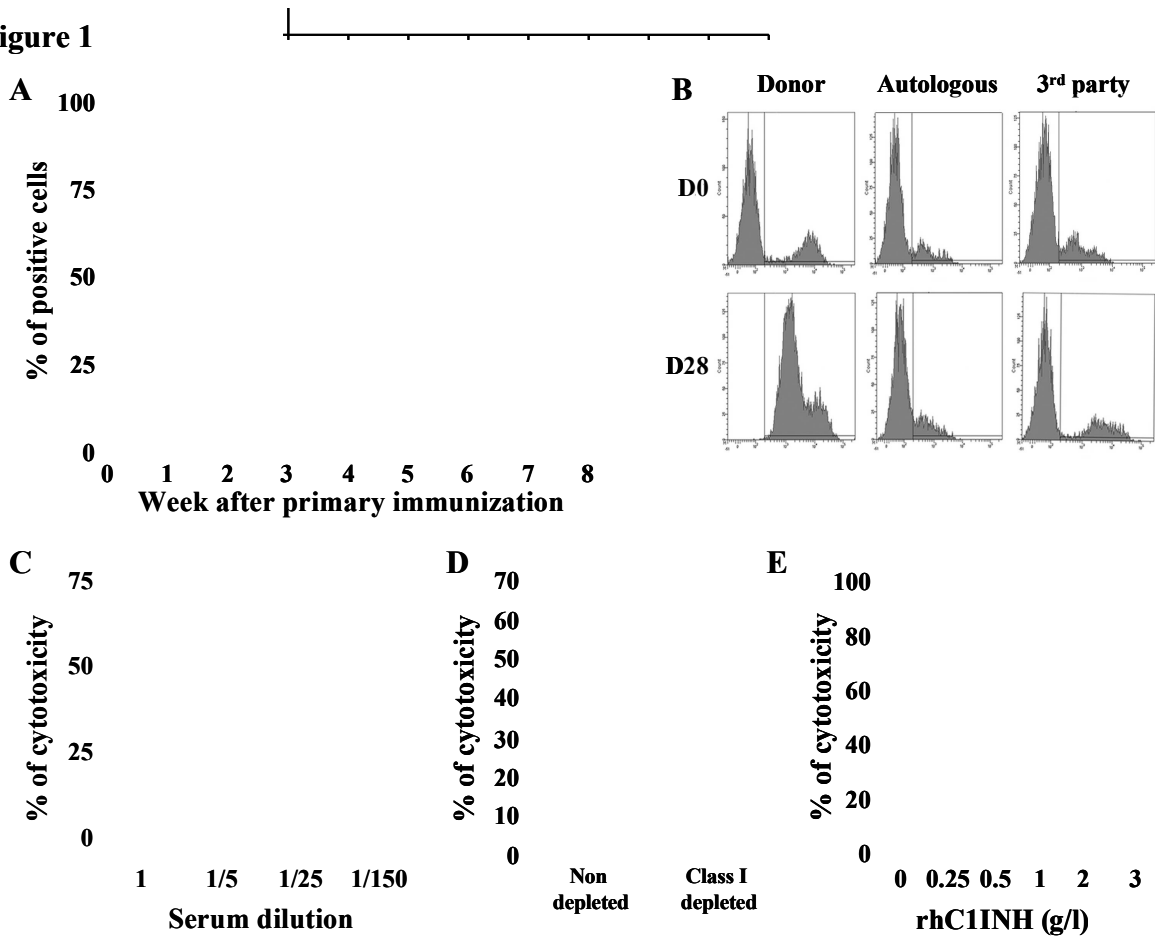
We thank Martin Schata (Pharming technologies BV) for rhC1INH supplying. This work was supported by a grant from the “Agence de Biomédecine” (France) and the European Commission’s Sixth Framework Programme, under the priority thematic area *Life Sciences, Genomics and Biotechnology for health*, contract n° L5HB-CT-2006-037377, Xenome. This work was also funded by a grant from the “Académie de Médecine” (France). None of the authors of this article have any conflict of interest with the molecule.

REFERENCES

1. Racusen, L.C. et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3, 708-14(2003).
2. Solez, K. et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 8, 753-60(2008).
3. Moll, S. & Pascual, M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant* 5, 2611-8(2005).
4. Lefaucheur, C. et al. Clinical Relevance of Preformed HLA Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation* 8, 324-331(2008).
5. Wahrmann, M. et al. Pivotal Role of Complement-Fixing HLA Alloantibodies in Presensitized Kidney Allograft Recipients. *American Journal of Transplantation* 6, 1033-1041(2006).
6. Gloor, J. et al. The Spectrum of Antibody-Mediated Renal Allograft Injury: Implications for Treatment. *American Journal of Transplantation* 8, 1367-1373(2008).
7. Becker, Y.T. et al. Rituximab as Treatment for Refractory Kidney Transplant Rejection. *American Journal of Transplantation* 4, 996-1001(2004).
8. Locke, J.E. et al. The Utility of Splenectomy as Rescue Treatment for Severe Acute Antibody Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation* 7, 842-846(2007).
9. Watanabe, J. & Scornik, J.C. IVIG and HLA Antibodies. Evidence for Inhibition of Complement Activation but Not for Anti-Idiotypic Activity. *American Journal of Transplantation* 5, 2786-2790(2005).
10. Platt, J.L. & Saadi, S. The role of complement in transplantation. *Mol Immunol* 36, 965-71
11. Damman, J. et al. Complement and renal transplantation: from donor to recipient. *Transplantation* 85, 923-7(2008).
12. Le Bas-Bernardet, S., Anegon, I. & Blancho, G. Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther* 15, 1247-56(2008).
13. Kirschfink, M. C1-inhibitor and transplantation. *Immunobiology* 205, 534-41(2002).
14. Hecker, J.M. et al. C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 73, 688-94(2002).
15. Koles, K. et al. N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* 14, 51-64(2004).
16. Longhurst, H. Rhucin, a recombinant C1 inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and cerebral ischemia. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 310-23(2008).
17. Poirier, N. & Blancho, G. Recombinant Human C1-Inhibitor Inhibits Cytotoxicity Induced by Allo- and Xenoantibodies. *Transplantation Proceedings* 40, 581-583(2008).
18. Poirier, N. et al. Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs. *J Surg Res* 139, 261-8(2007).

19. Locke, J.E. et al. The Use of Antibody to Complement Protein C5 for Salvage Treatment of Severe Antibody-Mediated Rejection. *Am J Transplant* (2008).doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02451.x
20. Davis, A.E., Mejia, P. & Lu, F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 45, 4057-63(2008).
21. Liu, D. et al. C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol* 179, 3966-72(2007).
22. Seelen, M.A. et al. Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 296, 187-98(2005).

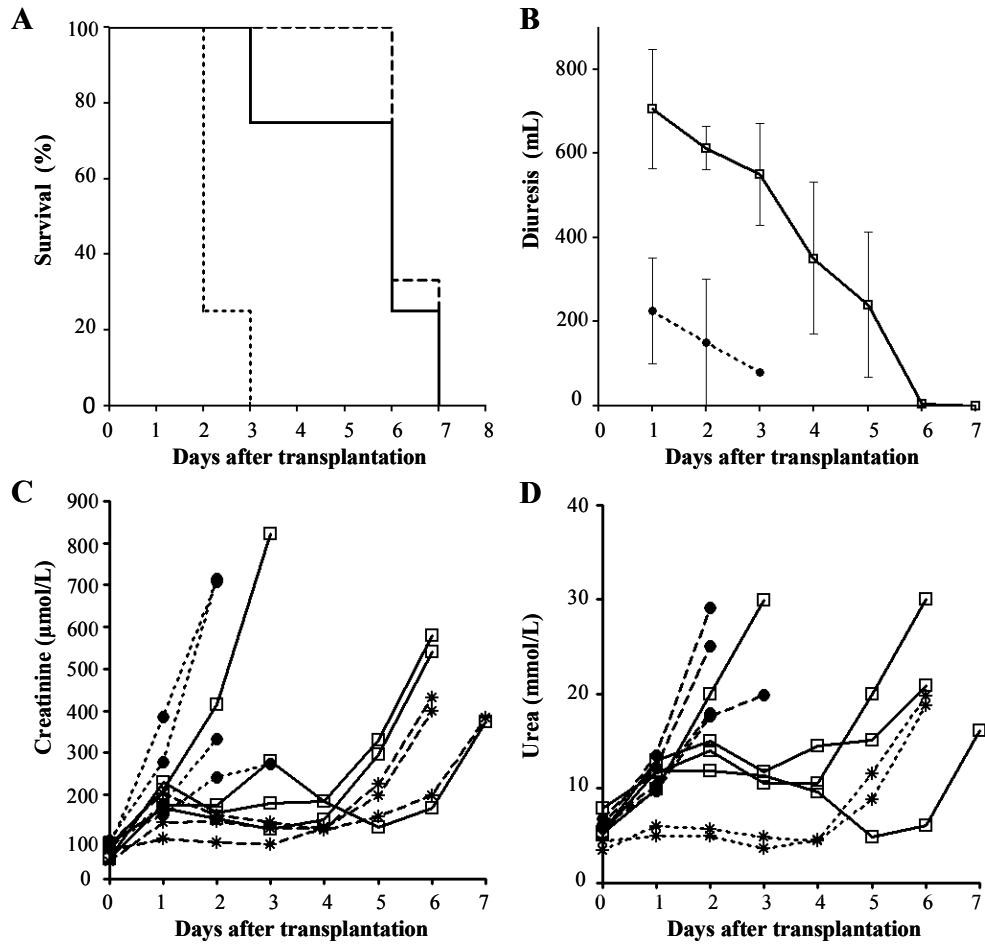
Figure 1



Specificity and cytotoxicity of the induced alloAb.

A. Kinetics of anti-donor IgG development after primary immunization, analyzed by FACS every week. **B.** Specific IgG production, measured by FACS, against donor but not third-party or autologous cells in immunized animals at Day 28 after primary immunization in comparison to Day 0. **C.** Complement-mediated cytotoxicity of immunized recipient serum against donor (n=6) but not third-party cells (n=3) at the plateau of immunization. **D.** Depletion of anti-donor class I Ab in immunized recipient sera by donor platelet absorption abolished cytotoxicity, proving the induced alloAb to be specific for donor MHC class I (n=6). **E.** Anti-donor alloAb cytotoxicity is inhibited by increased rhC1INH concentration (n=3).

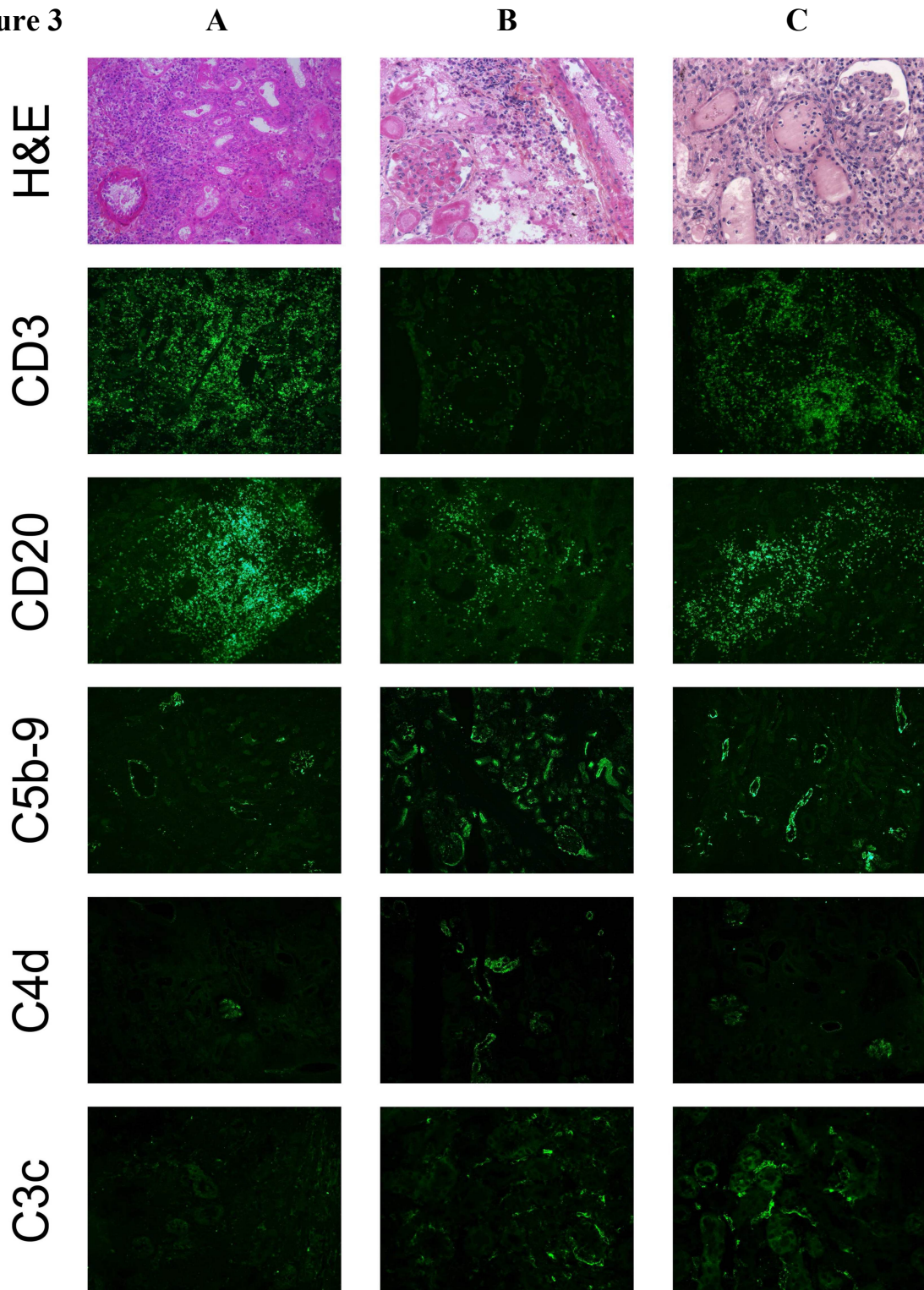
Figure 2



Clinical and biological effects of rhC1INH administration in presensitized transplanted recipients.

A. Renal allograft survival in non-immunized baboons (n=3; dashed line), immunized baboons without therapy (n=4; dotted line) or treated with rhC1INH (n=4; solid line). *, p=0.0134 versus the non-immunized group. **B.** Daily diuresis of immunized baboons without therapy (n=4; dotted line) or treated with rhC1INH (n=4; solid line). **C.** Daily creatinine levels and **(D)** blood urea nitrogen measurement after transplantation in immunized recipients without therapy (n=4; dotted line) or treated with rhC1INH (n=4; solid line).

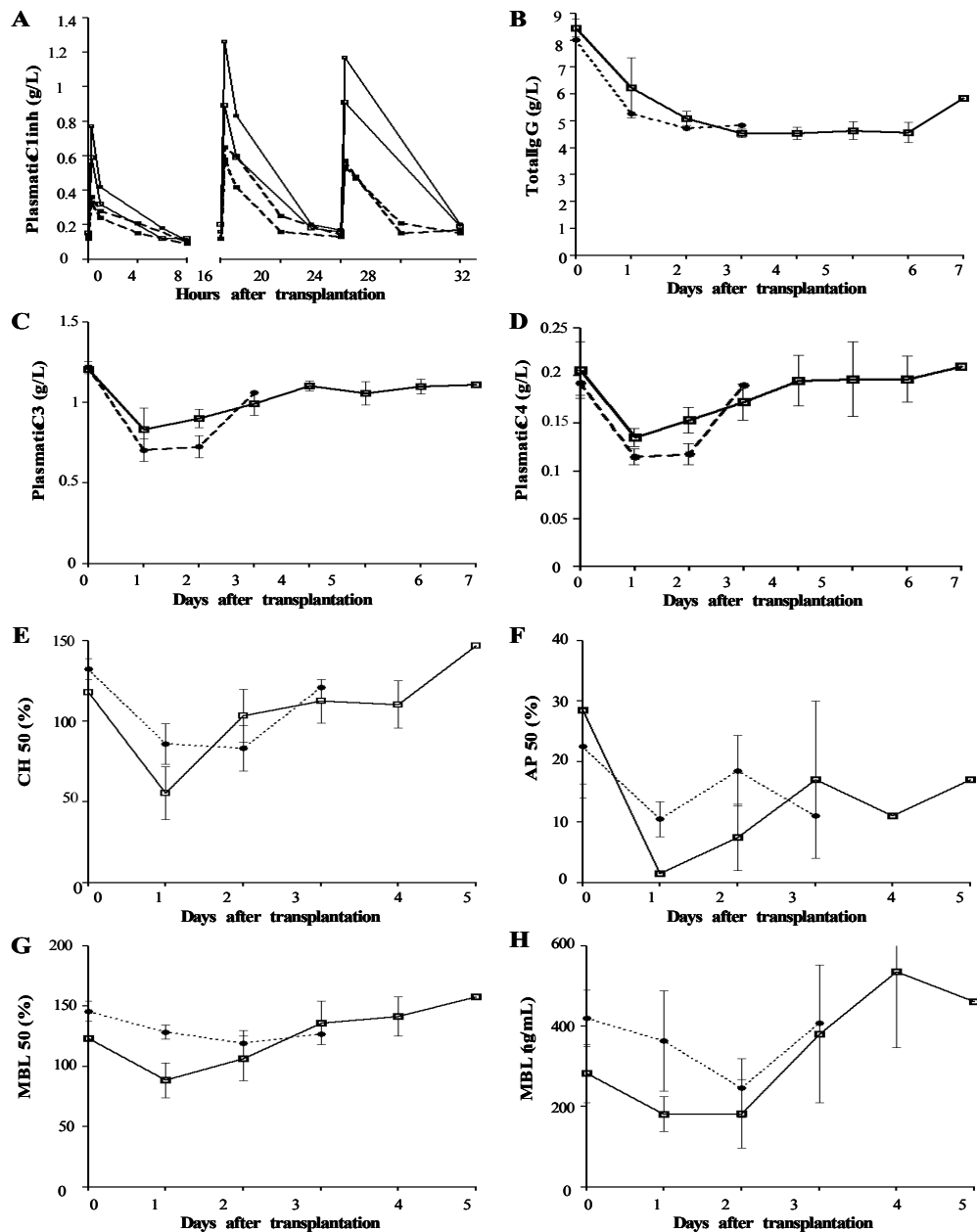
Figure 3



Analysis of kidney allograft histology.

Histology (H&E) and immunostaining of infiltrating cells (CD3 and CD20) and complement deposition (C5b-9, C4d and C3c) in kidney allografts explanted from untreated non-immunized recipients (A), untreated immunized recipients (B) and rhC1INH treated immunized recipients (C).

Figure 4



Complement monitoring.

A. C1 inhibitor levels in immunized transplant recipients treated with rhC1INH at 100 Units/Kg (n=2; dashed line) or 200 Units/Kg (n=2; solid line). **B.** Total Immunoglobulin G, **(C)** C3 and **(D)** C4 plasmatic level measurement after transplantation in immunized recipients without therapy (n=4; dotted line) or treated with rhC1INH (n=4; solid line). **E.** 50 % Complement Hemolysis (CH50), **(F)** 50% Alternate Pathway (AP50), **(G)** 50 % Mannose Binding Lectin pathway (MBL50) and **(H)** MBL plasmatic level measurement after transplantation in immunized recipients without therapy (n=4; dotted line) or treated with 100U/Kg of rhC1INH (n=2; solid line).

II.4- Discussion

Le rejet aigu à médiation humorale demeurant un problème mal contrôlé en transplantation, avec une perte précoce de greffon chez quasiment 50% des patients la première année après transplantation ainsi qu'une réversibilité partielle avec les traitements actuels, notre intérêt s'est porté à développer un modèle préclinique pour étudier cette physiopathologie et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans un premier temps, nous avons développé ce modèle préclinique chez le porc pour des raisons diverses notamment de facilité et de coût. Ainsi, nous montrons que deux injections *i.d.* de PBMC du donneur, espacées de deux semaines, est une méthode efficace (à 85%) menant à l'immunisation des receveurs contre leurs donneurs (**Article II, Figure 2**). Dans une étude préliminaire, l'injection de PBMC s'était avérée aussi efficace qu'une greffe de peau, plus compliquée et dont les aspects rejet ou nécrose sont toujours difficiles à discriminer (résultats non présentés). Puisque la voie d'administration dicte la localisation du contact de l'antigène avec les cellules immunocompétentes, une immunisation par voie *i.d.* (mais également en *s.c.* ou *i.m.*) mène l'antigène vers les ganglions lymphatiques de drainage régionaux, à l'inverse d'une immunisation par voie *i.v.* ou *i.p.*, où l'organe lymphoïde sollicité est surtout la rate avec une immunogénicité moindre. En effet, *en i.d.*, la présence de CPA (cellules de Langerhans) dans l'épiderme conduit à une immunisation par les voies directes et indirectes (Delves et Roitt 2000). L'immunisation dans notre modèle est spécifique du donneur puisque les IgG présents dans le sérum des animaux immunisés ne reconnaissent pas les cellules autologues ou d'un animal tiers (**Article II, Figure 1**). Les animaux immunisés développent des anticorps (IgG) anti-donneur à partir du 14^{ième} jour après immunisation et atteignent un plateau maximal vers le 28^{ième} jour (**Article II, Figure 2**). Bien que des données suggèrent que des anticorps dirigés contre des antigènes autres que le CMH puissent être impliqués dans la physiopathologie du rejet aigu à médiation humorale (Dragun et al. 2005), il est communément acquis que ce type de rejet est principalement dû à des anticorps cytotoxiques dirigés contre les molécules du CMH. En démontrant le caractère cytotoxique du sérum des animaux immunisés (**Article II, Figure 5**), du à des anticorps anti-CMH de classe I du donneur (perte de la cytotoxicité par absorption des anticorps anti-classe I sur des plaquettes, exprimant le CMH de classe I seulement (Hosenpud et al. 1993; C J Taylor et al. 1998)), nous avons démontré que notre modèle était similaire à ce qui est décrit en allotransplantation rénale chez l'homme.

La transplantation rénale a donc été effectuée durant ce plateau maximal d'alloimmunisation afin d'étudier une réponse d'immunisation contre le greffon et non une réponse mémoire. La

rapide apparition d'anticorps par injections de PBMC est bien sûr due à l'absence d'immunosuppression pendant cette phase d'immunisation, de façon similaire à ce qui est observé lors de greffes de valves cardiaques cryopréservées où apparaissent aussi des IgG (Welters et al. 2002). Les aspects macroscopiques des greffons permettent aisément d'authentifier un rejet aigu à médiation humorale après transplantation chez ces animaux immunisés. En absence d'immunosuppression, un rejet aigu cellulaire survient aux alentours du 7^{ième} jour chez les animaux non-immunisés, alors qu'un rejet débute au 2^{ième} ou 3^{ième} jour chez les animaux immunisés et le greffon est totalement thrombosé au 4^{ième} jour après transplantation (**Article II, Figure 3**). L'absence d'immunosuppression est responsable des anomalies observées chez nos porcs témoins et la greffe tierce-partie, avec un infiltrat modéré et une capillarite débutante à J3. En revanche, les biopsies à J3 des animaux immunisés ont toutes été qualifiées de rejet aigu à composante humorale (McCarthy et Ian S D Roberts 2002) avec des lésions portant essentiellement sur la microvascularisation, notamment les glomérules et les capillaires péri-tubulaires, ainsi qu'en attestent les suffusions hémorragiques signant le passage trans-endothélial (**Article II, Figure 3**). L'implication des anticorps dans ces rejets devient véritablement avérée par l'étude immunohistochimique, montrant des dépôts d'IgM et surtout d'IgG dans les zones de microvascularisation uniquement chez les animaux immunisés, couplés à des dépôts importants du complexe d'attaque membranaire le C5b-9 (**Article II, Figure 4**), en absence d'anticorps anti-C4d chez le porc.

L'implication du complément dans ce type de rejet est majeure, ainsi que la xénotransplantation nous l'a appris, il nous a semblé particulièrement opportun de mettre à profit ce modèle préclinique en allotransplantation pour tester une stratégie thérapeutique innovante visant à prévenir et/ou traiter le rejet aigu à médiation humorale en bloquant le déclenchement de la voie classique du complément par l'inhibiteur naturel du C1 : le C1-inhibiteur. En effet, la majorité des traitements visent à inhiber une réponse humorale et s'intéressent à bloquer la cellule B (anti-CD20 mAb, Cyclophosphamide) et non le bras effecteur de la réponse qu'est le complément (en dehors de quelques travaux émergents avec les IVIg). Pour la première fois en transplantation, nous avons disposé d'un réactif très efficace dans le blocage de la voie classique du complément puisqu'il s'agit de la molécule recombinante humaine du C1-inhibiteur (rhC1INH), inhibitrice de la C1 estérase et C1r, produite par le laboratoire Pharming (Leiden, Pays-Bas) et déjà en étude de phase III chez l'homme dans l'œdème angioneurotique pour pallier la déficience congénitale en C1-inhibiteur (Cugno et al. 2009). Afin de définir une stratégie thérapeutique *in vivo*, nous avons

alors réalisé une étude préliminaire *in vitro* en utilisant la cytotoxicité de nos sérums de porcs immunisés pour étudier l'efficacité de cette molécule de rhC1INH pour prévenir et/ou reverser une cytotoxicité complément-dépendante. Il nous est apparu au cours de cette étude qu'il est plus efficace de prétraiter avec du rhC1INH (stratégie préventive) afin d'empêcher toute activation du complément, plutôt que d'injecter le rhC1INH après initiation de l'activation de la voie classique du complément (stratégie curative) (**Article III, Figure 1**). Bien que certaines études aient montré qu'une activation partielle de la cascade du complément soit nécessaire pour que s'installent les mécanismes d'accommodation (Josie M Williams et al. 2004), il nous a semblé plus judicieux à partir de ces résultats, dans un premier temps, d'adopter une stratégie préventive *in vivo* pour nos futures expérimentations afin de bloquer totalement le bras effecteur du rejet humoral pour prévenir ce rejet (injection avant le déclampage). En effet, le rhC1INH est capable *in vitro*, à lui seul, d'inhiber totalement une cytotoxicité en allotransplantation, ou en xénotransplantation (anticorps anti-Gal) avec des concentrations plus importantes (**Article III, Figure 2**), lorsque la molécule est présente avant activation du complément.

Afin de tester *in vivo* l'efficacité de la molécule de rhC1INH dans la prévention du rejet aigu à médiation humorale, nous avons adapté notre modèle préclinique chez le babouin ; espèce plus proche de l'homme pour laquelle nous disposons de plus d'outils d'exploration biologique. Comme pour l'étude précédente chez le porc, deux injections consécutives de PBMC du donneur sont suffisantes pour immuniser tous nos animaux avant transplantation (**Article IV, Figure 1A**). Comme dans le modèle porcin, tous les babouins immunisés ont développé des anticorps cytotoxiques spécifiquement dirigés contre les molécules du CMH de classe I du donneur (**Article IV, Figure 1**) ; cytotoxicité qui est également abolie *in vitro* en présence de concentration croissante en rhC1INH (**Article IV, Figure 1E**). Toujours pour étudier une réponse d'immunisation contre le greffon et non une réponse mémoire, ainsi que pour assurer une reproductibilité du modèle, nous avons décidé de transplanter nos animaux immunisés au plateau maximal d'alloimmunisation plutôt qu'avant l'apparition de ces alloanticorps. Toujours de manière équivalente au modèle porcin, alors que les animaux contrôles non-immunisés et non traités développent un rejet aigu cellulaire une semaine après transplantation, les animaux immunisés montrent des signes évidents de rejet aigu (anurie, élévation de la créatininémie et de l'urémie) dès 48 à 72 heures après transplantation (**Article IV, Figure 2**). Ces greffons montrent après transplantectomie d'importants signes d'œdème, de congestion et de suffusions hémorragiques mais sans signe de coagulation intravasculaire

disséminée (DIC), avec une histologie évocatrice de rejet aigu à médiation humorale et un très faible infiltrat cellulaire (**Article IV, Figure 3**), comme chez les patients pré- ou hyperimmunisés. Nous observons également au sein de ces greffons d'importants dépôts de fragments issus de l'activation du complément, tels le C3c, C4d et C5b-9 (**Article IV, Figure 3**), principalement au niveau de la microvascularisation, des glomérules et des tubes. En pratique clinique, le marquage C4d+ dans les capillaires péri-tubulaires (CPT) est devenu le marqueur du diagnostic histologique du rejet humoral (K Solez et al. 2008) et est souvent considéré comme non spécifique en dehors de ces CPT. Dans notre modèle, seul le C3c marque ces CPT, le C4d étant positif uniquement au niveau des glomérules et d'autres vaisseaux, il semble moins spécifique chez le primate dans notre modèle.

La pharmacocinétique du rhC1INH (**Article IV, Figure 4A**) s'étant révélée chez le babouin très faible (demi-vie +/- 6 à 8 heures), nous avons dû adapter notre protocole thérapeutique à 3 injections *i.v.* par jour, nous contraignant à ne traiter les animaux que pendant 5 jours après transplantation par manque de réactif. Un tel protocole ne peut donc être envisagé en pratique clinique que dans le contexte d'un court traitement de la crise de rejet ou durant la phase d'induction après transplantation. En revanche, les concentrations plasmatiques atteintes par ce protocole se sont révélées efficaces pour prévenir l'apparition du rejet humoral durant la phase efficace du traitement, puisqu'en monothérapie rhC1INH, les animaux immunisés développent un rejet après l'arrêt du traitement, à J6 ou J7 après transplantation (**Article IV, Figure 2**). L'histologie des greffons de ces animaux en monothérapie montrant des signes de rejet humoral et cellulaire (**Article IV, Figure 3**), il est évident qu'une stratégie complète nécessite l'association d'une immunosuppression contre les lymphocytes T et B. Enfin, nous n'avons observé aucune activation de la voie classique du complément en périphérie chez les animaux immunisés non traités, mais uniquement localement au sein du greffon. En effet, nous n'observons également aucune modulation significative de cette voie d'activation du complément chez les animaux immunisés traités par le rhC1INH, suggérant également un effet local du rhC1INH au sein du greffon sur la voie classique du complément (**Article IV, Figure 4**). Par ailleurs, la molécule de C1-inhibiteur naturelle a été décrite pour avoir d'autres activités potentiellement intéressantes dans le cadre de la transplantation, comme l'inhibition de l'activation des lymphocytes T et de la génération de lymphocytes cytotoxiques (Eriksson et Sjögren 1995; Nissen et al. 1998), de l'activation endothéliale (Haimou Zhang et al. 2007), de l'adhésion et de la transmigration leucocytaire (S. Cai et al. 2005; S. Cai et Alvin E Davis 2003), des lésions d'ischémie-reperfusion (De Simoni et al. 2003; Arumugam et al. 2006;

Fattouch et al. 2007) et une protection contre le choc septique et endotoxinique (Jansen et al. 1998; Zeerleder et al. 2003; Dongxu Liu et al. 2005) par une inhibition des anaphylatoxines libérées et une augmentation de l'activité bactéricide des neutrophiles et macrophages (Dongxu Liu et al. 2007). Cependant, dans ce modèle nous n'avons observé aucune réduction de l'infiltration T à une semaine chez les animaux traités par rapport aux non-immunisés non-traités (**Article IV, Figure 3**), ni aucun effet *in vitro* sur la prolifération des lymphocytes en MLR en concentration croissante (résultats non présentés). Enfin, cette molécule ayant une activité principalement sur la voie classique, beaucoup moins sur la voie des lectines ou alterne, permet de conserver intactes les précieuses défenses antibactériennes.

II.5- Perspectives

Notre modèle préclinique de rejet aigu à médiation humorale étant maintenant bien établi et la molécule de rhC1INH ayant fait preuve d'efficacité en monothérapie dans ce modèle de très forte réponse, il convient maintenant d'établir un protocole complet d'immunosuppression permettant la survie à long-terme d'individus pré- ou hyperimmunisés. Vraisemblablement, une immunosuppression contre les lymphocytes T, de type inhibiteur de la calcineurine, sera nécessaire pour prévenir le rejet cellulaire, mais de manière plus importante, il faudra bien entendu y associer une immunosuppression spécifique des lymphocytes B. Le Rituximab (anti-CD20), par exemple, permet pour la première fois de dépleter spécifiquement le pool de lymphocytes B en périphérie, mais ne permet pas de dépleter les lymphocytes B mémoires dans la rate et les plasmocytes à courte ou longue demi-vie dans la moelle osseuse (ces types cellulaires n'expriment plus le CD20) (Anolik et al. 2004). Ainsi, il serait très intéressant de pouvoir dépleter les plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines tout en traitant le patient avec du rhC1INH pour prévenir l'activation du complément en attendant une diminution du titre en alloanticorps. Il n'y a pas d'utilisation courante de tels réactifs en transplantation (actuellement), alors qu'en hématologie dans l'indication du myélome, certains réactifs montrent une telle activité. En effet, le Bortezomib (Velcade, inhibiteur du protéasome) (Neubert et al. 2008; D. K. Perry et al. 2009) et le Tocilizumab (RoActemra, anti-IL6 récepteur) induisent une apoptose des plasmocytes. Enfin, l'utilisation du Velcade en transplantation semble être compliquée par la fréquence d'effets secondaires importants et de nouveaux inhibiteurs du protéasome, en particulier de l'immunoprotéasome, sont en cours de développement et vont arriver sur le marché. Il conviendra d'évaluer, en particulier, si ces nouveaux réactifs sont capables d'éliminer ces plasmocytes à longue demi-vie. Par ailleurs,

nous envisageons de faire évoluer ce modèle de rejet aigu à médiation humorale à la phase de pic des anticorps vers, d'une part, un modèle plus proche de la situation clinique à type de réponse mémoire (présence historique d'alloanticorps, disparu le jour de greffe) et, d'autre part, vers un modèle de greffe ABO-incompatible d'actualité clinique aussi. De plus, le rhC1INH est actuellement aussi à l'étude dans notre programme de xénotransplantation à partir d'organes porcins Gal-KO où d'autres antigènes xénogéniques sont responsables de la formation de xénoanticorps faiblement préformés mais fortement induits après transplantation (Byrne et al. 2008). Enfin, un essai clinique devrait débuter prochainement en transplantation rénale pour traiter la crise de rejet aigu à médiation humorale.

Conclusion

Conclusion

La possibilité d'induire une régulation immunologique spécifique via une immunointervention innovante dans le but de protéger le greffon peut être une avancée considérable dans le domaine de la transplantation, mais qui reste pour l'essentiel au stade expérimental. Nous avons abordé ce concept au cours de ce travail de thèse en étudiant deux nouvelles stratégies thérapeutiques, autour de deux problématiques différentes, dans nos modèles précliniques chez le primate non-humain.

La première partie de ce travail a consisté en l'évaluation préclinique d'un antagoniste sélectif de la molécule de costimulation CD28 (**Article I**), sc28AT, développé par notre équipe de recherche quelques années auparavant, dans le but de bloquer sélectivement les interactions activatrices CD28/B7 tout en laissant intactes les interactions inhibitrices CTLA-4/B7 nécessaires à l'induction de tolérance en transplantation et du soi (rongeurs). Compte tenu du dramatique essai clinique (TeGenero) survenu au début de ce travail de thèse avec l'anti-CD28 superagoniste, une partie du travail a consisté à démontrer que les anticorps monovalents anti-CD28 n'induisent pas d'activation de type superagoniste, *in vitro* et *in vivo*, du système immunitaire. Par ailleurs, nous avons montré que seul le blocage sélectif de CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable par à un mécanisme CTLA-4-dépendant conduisant à l'augmentation de la motilité des lymphocytes T. Comme pour beaucoup de bioréactifs, la monothérapie ne s'est pas révélée efficace dans la prévention du rejet aigu en transplantation rénale ou cardiaque chez le primate. En revanche, cette stratégie se révèle synergistique avec un inhibiteur de la calcineurine (CsA ou FK506) et inhibe le rejet aigu ou chronique dans nos modèles précliniques, y compris après plusieurs mois sans traitement. Nous avons notamment observé chez ces animaux une surrégulation des lymphocytes T régulateurs en périphérie, une non-réactivité cellulaire *ex vivo* spécifiquement contre le donneur et l'accumulation de ces Tregs au sein des greffons accompagnée d'une inhibition importante de l'infiltration de lymphocytes B. Bien que la molécule CD28 semble être importante dans le développement et l'homéostasie de ces cellules T régulatrices, nous montrons que le blocage sélectif de CD28 est compatible avec leur régulation, contrairement aux stratégies bloquant l'entièreté de la voie CD28/B7/CTLA-4. Enfin, nous observons également au sein de ces greffons la surexpression de transcrits de molécules aux propriétés immunorégulatrices (IDO, HO-1, TGF- β , ...), aussi retrouvées dans les modèles de tolérance

chez le rongeur. Pourtant, nous ne pouvons affirmer l'induction de tolérance dans cette étude compte-tenu des pertes précoce ou tardive des animaux (même si une toxicité du Tacrolimus était probablement en cause). La molécule actuelle n'étant pas adaptée à des études cliniques, une nouvelle version humanisée est en cours de développement et fera l'objet d'une nouvelle étude dans ces mêmes modèles. Il reste par ailleurs à élucider le(s) mécanisme(s) induisant la surrégulation des Tregs *in vivo* dans le contexte du blocage sélectif de CD28 puisque toutes activités agonistes ou superagonistes sont exclues et que les mécanismes d'induction *in vitro* de Treg chez l'homme ne sont toujours pas élucidés.

La deuxième partie de ce travail a consisté à développer un modèle préclinique du rejet aigu à médiation humorale en allotransplantation, afin de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, un tel modèle n'existait pas, alors que cette physiopathologie demeure toujours mal comprise en pratique clinique, avec en particulier un arsenal thérapeutique disponible qui n'est que partiellement efficace. Nous avons tout d'abord développé ce modèle chez le porc (**Article II**) en immunisant les receveurs par deux injections consécutives de PBMC du donneur avant transplantation. Les animaux immunisés développent ainsi des anticorps cytotoxiques IgG, dirigés spécifiquement contre les molécules du CMH de classe I du donneur, avec une cinétique caractéristique. Ces animaux immunisés, après transplantation rénale, développent un rejet violent très rapidement, avec une histologie évocatrice de rejet humoral, comprenant des dépôts d'Ig et de complément dans la microvascularisation. Bien que le complément semble être le bras effecteur de ce type de rejet, aucune thérapeutique actuelle de transplantation ne permet de le bloquer spécifiquement. Nous nous sommes donc intéressés à la molécule recombinante humaine du C1-inhibiteur (rhC1INH) qui permet de bloquer, dès les premières étapes, l'activation de la voie classique du complément tout en laissant indemne les voies alternes et des lectines notamment pour les défenses anti-microbiennes. Afin de définir une stratégie thérapeutique *in vivo* et d'étudier l'efficacité du rhC1INH, nous avons réalisé une étude préliminaire (**Article III**) *in vitro* et montré que cette molécule était capable d'inhiber totalement et de façon dose-dépendante une cytotoxicité induite par des allo- ou xénoanticorps lorsqu'elle est employée de manière préventive. Afin d'évaluer l'efficacité du rhC1INH dans la prévention du rejet aigu à médiation humorale (**Article IV**), nous avons adapté notre modèle préclinique chez le babouin et montré qu'un même protocole de sensibilisation induit également le développement d'anticorps, IgM puis IgG, cytotoxiques dirigés spécifiquement contre les molécules du CMH de classe I du donneur. Une transplantation rénale chez ces animaux

résulte également en un rejet violent très rapide, également avec une histologie évocatrice de rejet humoral avec dépôts de différents fragments du complément au sein de ces greffons. Une simple monothérapie avec du rhC1INH dans ce modèle, de transplantation à « cross-match » positif, permet de prévenir efficacement le rejet aigu à médiation humorale au moins pendant le temps du traitement. Il convient maintenant d'associer cette molécule à une immunosuppression du lymphocyte T pour prévenir aussi la part de rejet aigu cellulaire. Par ailleurs, la faible demi-vie de cette molécule en fait un traitement de la crise de rejet ou d'induction après transplantation mais en aucun cas un traitement d'entretien. Il sera également très intéressant de l'associer à une stratégie permettant une déplétion efficace des lymphocytes B et, surtout, des plasmocytes de la moelle pour faire chuter le titre en alloanticorps. Certains réactifs employés en oncologie pourraient présenter ces propriétés et seront étudiés prochainement à travers ce modèle préclinique établi.

Nous apportons donc par ce travail de thèse des éléments nouveaux quant aux rôles et mécanismes de nouvelles stratégies thérapeutiques immunorégulatrices en transplantation. Ces données s'insèrent dans un contexte scientifique très actuel, où les nouveaux bioréactifs devraient venir suppléer/remplacer l'immunosuppression chimique chronique actuelle, pour offrir de nouveaux traitements plus spécifiques et moins toxiques pour les patients. Nous espérons que le rhC1INH permettra de mieux traiter la crise de rejet humoral en clinique, voir de permettre la transplantation de patients pré- ou hyperimmunisés. Enfin, avec la molécule sc28AT, nous abordons la modulation de la réponse immune via des régulations du système immunitaire lui-même, qui permettent l'induction de tolérance dans de nombreux modèles rongeurs, mais qui sont encore faiblement décrits et employés en tant que stratégies thérapeutiques aux stades préclinique ou clinique. Cette molécule ne permettra peut-être pas l'induction de tolérance chez l'homme, mais nous espérons qu'elle offrira grâce à ses propriétés immunomodulatrices un traitement de choix et de qualité pour les patients en transplantation.

Bibliographie

Bibliographie

- Acuto,O. et Michel,F. (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol*, 3, 939-951.
- Acuto,O. et al. (2003) Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor. *Immunol. Rev*, 192, 21-31.
- Adams,A.B. et al. (2003) Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol. Rev*, 196, 147-160.
- Adams,A.B. et al. (2002) Calcineurin inhibitor-free CD28 blockade-based protocol protects allogeneic islets in nonhuman primates. *Diabetes*, 51, 265-270.
- Akalin,E. et al. (1996) CD28-B7 T cell costimulatory blockade by CTLA4Ig in the rat renal allograft model: inhibition of cell-mediated and humoral immune responses in vivo. *Transplantation*, 62, 1942-1945.
- Akiyama,Y. et al. (2002) B7/CTLA4 pathway is essential for generating regulatory cells after intratracheal delivery of alloantigen in mice. *Transplantation*, 74, 732-738.
- Albert,M.L. et al. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med*, 188, 1359-1368.
- Alegre,M.L. et al. (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol*, 1, 220-228.
- Alegre,M.L. et al. (1996) Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J. Immunol*, 157, 4762-4770.
- Alexander-Miller,M.A. et al. (1996) Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J. Exp. Med*, 184, 485-492.
- Aluvihare,V.R. et al. (2004) Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol*, 5, 266-271.
- Anderson,G. et al. (1998) Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *J. Immunol*, 161, 6599-6603.
- Andrews,P.A. et al. (1995) Expression and tissue localization of donor-specific complement C3 synthesized in human renal allografts. *Eur. J. Immunol*, 25, 1087-1093.
- Anolik,J.H. et al. (2004) Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 50, 3580-3590.
- Ansari,M.J.I. et Sayegh,M.H. (2004) Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. *Kidney Int*, 65, 1560-1563.
- Arumugam,T.V. et al. (2006) Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin. Chim. Acta*, 374, 33-45.
- Aschenbrenner,K. et al. (2007) Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol*, 8, 351-358.
- Ashton-Chess,J. et al. (2006) Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl. Int*, 19, 539-548.
- Auchincloss,H. et al. (1993) The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90, 3373-3377.

- Austyn,J.M. et Larsen,C.P. (1990) Migration patterns of dendritic leukocytes. Implications for transplantation. *Transplantation*, 49, 1-7.
- Azuma,H. et al. (1996) Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 12439-12444.
- Azuma,H. et al. (2008) Superagonistic CD28 antibody induces donor-specific tolerance in rat renal allografts. *Am. J. Transplant*, 8, 2004-2014.
- Baan,C.C. et al. (2005) Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation*, 80, 110-117.
- Baeten,D. et al. (2006) Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J. Am. Soc. Nephrol*, 17, 294-304.
- Baker,R.J. et al. (2001) Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J. Immunol*, 167, 7199-7206.
- Ballet,C. et al. (2006) Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am. J. Transplant*, 6, 2796-2801.
- Baratin,M. et al. (2004) Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition. *Eur. J. Immunol*, 34, 3305-3314.
- Baroja,M.L. et al. (2000) The inhibitory function of CTLA-4 does not require its tyrosine phosphorylation. *J. Immunol*, 164, 49-55.
- Barrington,R. et al. (2001) The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev*, 180, 5-15.
- Bashuda,H. et al. (2005) Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *J. Clin. Invest*, 115, 1896-1902.
- Batchelor,J.R. et al. (1979) Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. I. Retransplantation of (AS X AUG)F1 kidneys into secondary AS recipients. *J. Exp. Med*, 150, 455-464.
- Battaglia,M., Stabilini,A., Draghici,E., et al. (2006) Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes*, 55, 40-49.
- Battaglia,M., Stabilini,A., Migliavacca,B., et al. (2006) Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J. Immunol*, 177, 8338-8347.
- Bauer,T.M. et al. (2005) Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl. Int*, 18, 95-100.
- Becker,Y.T. et al. (2004) Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am. J. Transplant*, 4, 996-1001.
- Belghith,M. et al. (2003) TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat. Med*, 9, 1202-1208.
- Belkaid,Y. et Oldenhove,G. (2008) Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity*, 29, 362-371.
- Benichou,G. (1999) Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front. Biosci*, 4, D476-480.

- Benichou,G. et al. (1999) Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J. Immunol*, 162, 352-358.
- Benson,M.J. et al. (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med*, 204, 1765-1774.
- van Besouw,N.M. et al. (2005) The direct and indirect allogeneic presentation pathway during acute rejection after human cardiac transplantation. *Clin. Exp. Immunol*, 141, 534-540.
- Bestard,O. et al. (2007) Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J. Immunol*, 179, 4901-4909.
- Bevan,M.J. (1977) Killer cells reactive to altered-self antigens can also be alloreactive. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 2094-2098.
- Beverly,B. et al. (1992) Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol*, 4, 661-671.
- Beyersdorf,N. et al. (2008) Protection from graft-versus-host disease with a novel B7 binding site-specific mouse anti-mouse CD28 monoclonal antibody. *Blood*, 112, 4328-4336.
- Beyersdorf,N. et al. (2005) Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med*, 202, 445-455.
- BILLINGHAM,R.E. et al. (1953) Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172, 603-606.
- Birsan,T. et al. (2003) Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 75, 2106-2113.
- Bjorndahl,J.M. et al. (1989) Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol*, 19, 881-887.
- Blair,P.J. et al. (1998) CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J. Immunol*, 160, 12-15.
- Blazar,B.R. et al. (1996) Infusion of anti-B7.1 (CD80) and anti-B7.2 (CD86) monoclonal antibodies inhibits murine graft-versus-host disease lethality in part via direct effects on CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol*, 157, 3250-3259.
- Blazar,B.R. et al. (1994) In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood*, 83, 3815-3825.
- Bloom,D.D. et al. (2008) CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. *Am. J. Transplant*, 8, 793-802.
- Bluestone,J.A. et al. (2008) The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am. J. Transplant*, 8, 2086-2096.
- Bluestone,J.A. et Abbas,A.K. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol*, 3, 253-257.
- Boasso,A. et al. (2005) Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood*, 105, 1574-1581.
- Boise,L.H. et al. (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*, 3, 87-98.
- Boonen,G.J. et al. (1999) CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur. J. Immunol*, 29, 789-798.

- Borsellino,G. et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110, 1225-1232.
- Bos,E.M. et al. (2007) Kidney grafts from brain dead donors: Inferior quality or opportunity for improvement? *Kidney Int*, 72, 797-805.
- Bos,I.G.A. et al. (2002) Structural and functional aspects of C1-inhibitor. *Immunobiology*, 205, 518-533.
- Boulday,G. et al. (2004) Association of rapamycin and co-stimulation blockade using anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Nephrol. Dial. Transplant*, 19, 1752-1760.
- Bour-Jordan,H. et Blueston,J.A. (2002) CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J. Clin. Immunol*, 22, 1-7.
- Bousoo,P. (2008) T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat. Rev. Immunol*, 8, 675-684.
- Braudeau,C. et al. (2007) Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl. Int*, 20, 845-855.
- Brent,L. et Medawar,P.B. (1967) Cellular immunity and the homograft reaction. *Br. Med. Bull*, 23, 55-60.
- Bretscher,P. et Cohn,M. (1970) A theory of self-nonself discrimination. *Science*, 169, 1042-1049.
- Bromley,S.K. et al. (2001) The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol*, 2, 1159-1166.
- Brouard,S. et al. (2005) Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am. J. Transplant*, 5, 330-340.
- Brouard,S. et al. (2007) Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 15448-15453.
- Brown,K.M. et al. (2006) Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome. *N. Engl. J. Med*, 354, 2014-2023.
- Bruder,D. et al. (2004) Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol*, 34, 623-630.
- Brusko,T.M. et al. (2008) Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev*, 223, 371-390.
- Bühler,L.H. et al. (2002) Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation*, 74, 1405-1409.
- Butte,M.J. et al. (2007) Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27, 111-122.
- Butte,M.J. et al. (2008) Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol. Immunol*, 45, 3567-3572.
- Byrne,G.W. et al. (2008) Proteomic identification of non-Gal antibody targets after pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 15, 268-276.
- Cai,S. et Davis,A.E. (2003) Complement regulatory protein C1 inhibitor binds to selectins and interferes with endothelial-leukocyte adhesion. *J. Immunol*, 171, 4786-4791.
- Cai,S. et al. (2005) A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion. *J. Immunol*, 174, 6462-6466.
- Calne,R.Y. (1970) Organ transplantation between widely disparate species. *Transplant. Proc*, 2, 550-556.

- Candinas,D. et al. (1996) Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation*, 62, 336-342.
- Carreno,B.M. et al. (2000) CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol*, 165, 1352-1356.
- Carreno,B.M. et Collins,M. (2002) The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*, 20, 29-53.
- Carroll,R.G. et al. (1997) Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells. *Science*, 276, 273-276.
- Celli,S. et al. (2007) Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity*, 27, 625-634.
- Chai,J.G. et al. (1999) Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol*, 29, 686-692.
- Chambers,C.A. et al. (2001) CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol*, 19, 565-594.
- Chambers,C.A. et al. (1997) Lymphoproliferation in CTLA-4-deficient mice is mediated by costimulation-dependent activation of CD4+ T cells. *Immunity*, 7, 885-895.
- Chandraker,A. et al. (1998) Late blockade of T cell costimulation interrupts progression of experimental chronic allograft rejection. *J. Clin. Invest*, 101, 2309-2318.
- Chavez,H. et al. (2007) Absence of CD4CD25 regulatory T cell expansion in renal transplanted patients treated in vivo with Belatacept mediated CD28-CD80/86 blockade. *Transpl. Immunol*, 17, 243-248.
- Chen,G. et al. (2001) Prevention of hyperacute rejection of pig-to-monkey cardiac xenografts by Chinese cobra venom factor. *Transplant. Proc*, 33, 3857-3858.
- Chen,G. et al. (2004) Improved suppression of circulating complement does not block acute vascular rejection of pig-to-rhesus monkey cardiac transplants. *Xenotransplantation*, 11, 123-132.
- Chen,W. et al. (1998) Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J. Exp. Med*, 188, 1849-1857.
- Chen,W. et al. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med*, 198, 1875-1886.
- Chen,W. et al. (2008) The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J. Immunol*, 181, 5396-5404.
- Chen,X. et al. (2006) Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur. J. Immunol*, 36, 2139-2149.
- Chen,Y. et al. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265, 1237-1240.
- Chitnis,T. et al. (2001) CD28-independent induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest*, 107, 575-583.
- Chuang,E. et al. (1999) Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases. *J. Immunol*, 162, 1270-1277.
- Cilio,C.M. et al. (1998) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 is induced in the thymus upon in vivo activation and its blockade prevents anti-CD3-mediated depletion of thymocytes. *J. Exp. Med*, 188, 1239-1246.

- Clipstone, N.A. et Crabtree, G.R. (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357, 695-697.
- Coenen, J.J.A. et al. (2007) Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ T cells. *Bone Marrow Transplant*, 39, 537-545.
- Coenen, J.J.A. et al. (2006) Rapamycin, and not cyclosporin A, preserves the highly suppressive CD27⁺ subset of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Blood*, 107, 1018-1023.
- Collins, A.V. et al. (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, 17, 201-210.
- Collins, T. et al. (1984) 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.*, 81, 4917-4921.
- Collison, L.W. et al. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-569.
- Colson, Y.L. et al. (1999) Positive and negative selection of alpha beta TCR⁺ T cells in thymectomized adult radiation bone marrow chimeras. *Transplantation*, 68, 403-410.
- Couper, K.N. et al. (2007) Incomplete depletion and rapid regeneration of Foxp3⁺ regulatory T cells following anti-CD25 treatment in malaria-infected mice. *J. Immunol*, 178, 4136-4146.
- Crespo, M. et al. (2001) Acute humoral rejection in renal allograft recipients: I. Incidence, serology and clinical characteristics. *Transplantation*, 71, 652-658.
- Cross, A.H. et al. (1995) Long-term inhibition of murine experimental autoimmune encephalomyelitis using CTLA-4-Fc supports a key role for CD28 costimulation. *J. Clin. Invest.*, 95, 2783-2789.
- Cugno, M. et al. (2009) C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends Mol Med*, 15, 69-78.
- Curotto de Lafaille, M.A. et Lafaille, J.J. (2002) CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr. Opin. Immunol*, 14, 771-778.
- Curotto de Lafaille, M.A. et Lafaille, J.J. (2009) Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30, 626-635.
- Daniel, C. et al. (1998) A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity*, 8, 543-552.
- Dao Nguyen, X. et Robinson, D.S. (2004) Fluticasone propionate increases CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell suppression of allergen-stimulated CD4⁺CD25⁺ T cells by an IL-10-dependent mechanism. *J. Allergy Clin. Immunol*, 114, 296-301.
- Darrasse-Jèze, G. et al. (2006) CD4⁺CD25⁺ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol. Lett*, 102, 106-109.
- DAUSSET, J. (1958) [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol*, 20, 156-166.
- Davis, P.M. et al. (2008) Abatacept modulates human dendritic cell-stimulated T-cell proliferation and effector function independent of IDO induction. *Clin. Immunol*, 126, 38-47.
- De Simoni, M.G. et al. (2003) Neuroprotection by complement (C1) inhibitor in mouse transient brain ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 23, 232-239.
- Delves, P.J. et Roitt, I.M. (2000) The immune system. First of two parts. *N. Engl. J. Med*, 343, 37-49.

- Demirkiran,A. et al. (2008) Impact of immunosuppressive drugs on CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells: does in vitro evidence translate to the clinical setting? *Transplantation*, 85, 783-789.
- Dengler,T.J. et al. (1999) Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation*, 67, 392-398.
- Denton,M.D. et al. (1999) Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4(+) T cell alloactivation. *J. Exp. Med*, 190, 555-566.
- Dhein,J. et al. (1995) Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, 373, 438-441.
- Diehn,M. et al. (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 99, 11796-11801.
- Dodge,I.L. et al. (2000) Rapamycin induces transforming growth factor-beta production by lymphocytes. *Transplantation*, 70, 1104-1106.
- Dong,V.M. et al. (2002) Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*, 73, 1310-1317.
- Dragun,D. et al. (2005) Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med*, 352, 558-569.
- Dufrane,D. et al. (2006) Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation*, 81, 1345-1353.
- Dugast,A. et al. (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J. Immunol*, 180, 7898-7906.
- Dustin,M.L. et al. (1997) Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94, 3909-3913.
- Egen,J.G. et Allison,J.P. (2002) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*, 16, 23-35.
- Egen,J.G. et al. (2002) CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol*, 3, 611-618.
- Epperson,D.E. et Pober,J.S. (1994) Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J. Immunol*, 153, 5402-5412.
- Eriksson,H. et Sjögren,H.O. (1995) Inhibition of activation of human T lymphocytes by the complement C1 esterase inhibitor. *Immunology*, 86, 304-310.
- Fallarino,F. et al. (1998) B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J. Exp. Med*, 188, 205-210.
- Fallarino,F. et al. (2003) Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol*, 4, 1206-1212.
- Fallarino,F. et al. (2006) The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol*, 176, 6752-6761.
- Fan,K. et al. (2007) Blockade of LIGHT/HVEM and B7/CD28 signaling facilitates long-term islet graft survival with development of allospecific tolerance. *Transplantation*, 84, 746-754.
- Fangmann,J. et al. (1992) Rejection of skin allografts by indirect allrecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J. Exp. Med*, 175, 1521-1529.

- Fattouch,K. et al. (2007) Beneficial effects of C1 esterase inhibitor in ST-elevation myocardial infarction in patients who underwent surgical reperfusion: a randomised double-blind study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 32, 326-332.
- Ferber,I. et al. (1994) Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science*, 263, 674-676.
- Ferrant,J.L. et al. (2004) The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge. *Int. Immunol*, 16, 1583-1594.
- Fiane,A.E. et al. (1999) C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. *Immunopharmacology*, 42, 231-243.
- Fiebig,E. et al. (1991) Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp*, 10, 127-144.
- Fife,B.T. et Bluestone,J.A. (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev*, 224, 166-182.
- Finck,B.K. et al. (1994) Treatment of murine lupus with CTLA4Ig. *Science*, 265, 1225-1227.
- Fluck,N. et al. (1999) Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection. *Transplant. Proc*, 31, 842-843.
- Ford,M.L. et al. (2007) Antigen-specific precursor frequency impacts T cell proliferation, differentiation, and requirement for costimulation. *J. Exp. Med*, 204, 299-309.
- Förster,I. et al. (1995) Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity*, 2, 573-585.
- Frasca,L. et al. (2002) Human anergic CD4+ T cells can act as suppressor cells by affecting autologous dendritic cell conditioning and survival. *J. Immunol*, 168, 1060-1068.
- Freedman,A.S. et al. (1987) B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells. *J. Immunol*, 139, 3260-3267.
- Freeman,G.J. et al. (1993) Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 262, 909-911.
- Friedline,R.H. et al. (2009) CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J. Exp. Med*, 206, 421-434.
- Fu,S. et al. (2004) TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J. Transplant*, 4, 1614-1627.
- Gallegos,A.M. et Bevan,M.J. (2006) Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev*, 209, 290-296.
- Game,D.S. et al. (2005) Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. *Am. J. Transplant*, 5, 454-464.
- Gao,W. et al. (2007) Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am. J. Transplant*, 7, 1722-1732.
- Garín,M.I. et al. (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 109, 2058-2065.
- Gershon,R.K. (1975) A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev*, 26, 170-185.

- Gershon,R.K. et Kondo,K. (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18, 723-737.
- Gershon,R.K. et Kondo,K. (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21, 903-914.
- Gimmi,C.D. et al. (1993) Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 90, 6586-6590.
- Girvin,A.M. et al. (2000) A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J. Immunol*, 164, 136-143.
- Gloor,J. et al. (2008) The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am. J. Transplant*, 8, 1367-1373.
- Gogishvili,T. et al. (2009) Rapid regulatory T-cell response prevents cytokine storm in CD28 superagonist treated mice. *PLoS ONE*, 4, e4643.
- Goldrath,A.W. et Bevan,M.J. (1999) Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402, 255-262.
- Gomes,N.A. et al. (2000) TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J. Immunol*, 164, 2001-2008.
- Gondek,D.C. et al. (2008) Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells. *J. Immunol*, 181, 4752-4760.
- Gowans,J.L. (1977) Cellular mediators of allograft immunity. *Transplant. Proc*, 9, 685-690.
- Grakoui,A. et al. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285, 221-227.
- Gray Parkin,K. et al. (2002) Expression of CD28 by bone marrow stromal cells and its involvement in B lymphopoiesis. *J. Immunol*, 169, 2292-2302.
- Gray,D.H.D. et al. (2006) Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*, 108, 3777-3785.
- Greenfield,E.A. et al. (1998) CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol*, 18, 389-418.
- Greenwald,R.J. et al. (2001) CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14, 145-155.
- Greenwald,R.J. et al. (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol*, 23, 515-548.
- Grohmann,U. et al. (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol*, 3, 1097-1101.
- Gross,J.A. et al. (1992) Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol*, 149, 380-388.
- Grossman,W.J. et al. (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21, 589-601.
- Groux,H. et al. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389, 737-742.
- Gueler,F. et al. (2008) Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival. *J. Am. Soc. Nephrol*, 19, 2302-2312.
- Guillonneau,C. et al. (2005) Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation*, 80, 546-554.

- Guillonneau,C., Hill,M., et al. (2007) CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest*, 117, 1096-1106.
- Guillonneau,C., Séveno,C., et al. (2007) Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J. Immunol*, 179, 8164-8171.
- Guillot,C. et al. (2003) Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood*, 101, 3325-3333.
- Guo,F. et al. (2008) CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J. Immunol*, 181, 2285-2291.
- Haanstra,K.G. et al. (2007) Expression patterns of regulatory T-cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts. *Am. J. Transplant*, 7, 2236-2246.
- Haanstra,K.G. et al. (2003) Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation*, 75, 637-643.
- Habicht,A. et al. (2007) New insights in CD28-independent allograft rejection. *Am. J. Transplant*, 7, 1917-1926.
- Hale,D.A. et al. (2005) Induction of transplantation tolerance in non-human primate preclinical models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci*, 360, 1723-1737.
- Harding,F.A. et al. (1992) CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, 356, 607-609.
- Haspot,F. et al. (2005) Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant*, 5, 2339-2348.
- Haspot,F. et al. (2002) Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood*, 99, 2228-2234.
- Hathcock,K.S. et al. (1994) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med*, 180, 631-640.
- Hausen,B. et al. (2001) Coadministration of either cyclosporine or steroids with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 successfully prolong allograft survival after life supporting renal transplantation in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 72, 1128-1137.
- Hecker,J.M. et al. (2002) C1-inhibitor for therapy and prophylaxis of acute vascular rejection of porcine kidneys in cynomolgus monkeys. *Transplant. Proc*, 34, 2382.
- Hecker,J.M. et al. (2002) C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation*, 73, 688-694.
- Heeger,P.S. (2003) T-cell allorecognition and transplant rejection: a summary and update. *Am. J. Transplant*, 3, 525-533.
- Heeger,P.S. et al. (2005) Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J. Exp. Med*, 201, 1523-1530.
- Herold,K.C. et al. (1997) Regulation of C-C chemokine production by murine T cells by CD28/B7 costimulation. *J. Immunol*, 159, 4150-4153.
- Hogquist,K.A. et Bevan,M.J. (1996) The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Semin. Immunol*, 8, 63-68.
- Holzknacht,Z.E. et al. (2002) Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection. *Circ. Res*, 91, 1135-1141.

- Hombach,A.A. et al. (2007) Effective proliferation of human regulatory T cells requires a strong costimulatory CD28 signal that cannot be substituted by IL-2. *J. Immunol*, 179, 7924-7931.
- Hornick,P.I. et al. (2000) Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. *Circulation*, 101, 2405-2410.
- Hosenpud,J.D. et al. (1993) The modulation of human aortic endothelial cell ICAM-1 (CD-54) expression by serum containing high titers of anti-HLA antibodies. *Transplantation*, 55, 405-411.
- Hsieh,C. et al. (2004) Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity*, 21, 267-277.
- Huang,C. et al. (2004) Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21, 503-513.
- Huang,J.F. et al. (1999) TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*, 286, 952-954.
- Hugues,S. et al. (2004) Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat. Immunol*, 5, 1235-1242.
- Hünig,T. (2007) Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies. *Adv. Immunol*, 95, 111-148.
- Iida,T. et al. (2000) Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells. *J. Immunol*, 165, 5062-5068.
- Ikemizu,S. et al. (2000) Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity*, 12, 51-60.
- Imai,A. et al. (2007) A novel fully human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 84, 1020-1028.
- Inaba,K. et al. (1998) Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med*, 188, 2163-2173.
- Inaba,K. et al. (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J. Exp. Med*, 180, 1849-1860.
- Ito,T. et al. (2008) Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*, 28, 870-880.
- Itoh,M. et al. (1999) Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol*, 162, 5317-5326.
- Itoh,Y. et Germain,R.N. (1997) Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells. *J. Exp. Med*, 186, 757-766.
- Iwashima,M. et al. (1994) Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science*, 263, 1136-1139.
- Jang,M. et al. (2008) A blocking anti-CD28-specific antibody induces long-term heart allograft survival by suppression of the PKC theta-JNK signal pathway. *Transplantation*, 85, 1051-1055.
- Jansen,P.M. et al. (1998) Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. *J. Immunol*, 160, 475-484.
- Jenkins,M.K. et Schwartz,R.H. (1987) Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med*, 165, 302-319.

- Jiang,H. et al. (2001) Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J. Exp. Med*, 194, 1609-1616.
- Jiang,H. et Chess,L. (2008) Qa-1/HLA-E-restricted regulatory CD8⁺ T cells and self-nonsel self discrimination: an essay on peripheral T-cell regulation. *Hum. Immunol*, 69, 721-727.
- Jiang,S. et al. (1998) Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol*, 59, 690-699.
- Joffre,O. et al. (2008) Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med*, 14, 88-92.
- Kägi,D. et al. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369, 31-37.
- Kägi,D. et al. (1996) Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol*, 14, 207-232.
- Kägi,D. et al. (1994) Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 265, 528-530.
- Kamradt,T. et Mitchison,N.A. (2001) Tolerance and autoimmunity. *N. Engl. J. Med*, 344, 655-664.
- Kane,L.P. et al. (2001) Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat. Immunol*, 2, 37-44.
- Kang,J. et al. (2008) De novo induction of antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in vivo following systemic antigen administration accompanied by blockade of mTOR. *J. Leukoc. Biol*, 83, 1230-1239.
- Karagiannidis,C. et al. (2004) Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol*, 114, 1425-1433.
- Karandikar,N.J. et al. (1998) Targeting the B7/CD28:CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J. Neuroimmunol*, 89, 10-18.
- Kawai,K. et al. (1996) Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation*, 61, 352-355.
- Kawai,T. et al. (1995) Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 59, 256-262.
- Kawai,T. et al. (2008) HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N. Engl. J. Med*, 358, 353-361.
- Keever-Taylor,C.A. et al. (2007) Rapamycin enriches for CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ CD27⁽⁺⁾ Foxp3⁽⁺⁾ regulatory T cells in ex vivo-expanded CD25-enriched products from healthy donors and patients with multiple sclerosis. *Cytotherapy*, 9, 144-157.
- Kemper,C. et Atkinson,J.P. (2007) T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat. Rev. Immunol*, 7, 9-18.
- Kemper,C. et al. (2003) Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature*, 421, 388-392.
- Kenyon,N.S. et al. (1999) Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154. *Diabetes*, 48, 1473-1481.
- Khattari,R. et al. (1999) Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J. Immunol*, 162, 5784-5791.

- Kim,K.S. et al. (2001) CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. *Am. J. Pathol*, 158, 977-986.
- Kirk,A.D. et al. (1999) Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat. Med*, 5, 686-693.
- Kirk,A.D. et al. (1997) CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94, 8789-8794.
- Kirk,A.D. et al. (2001) Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation*, 72, 377-384.
- Kishimoto,H. et Sprent,J. (1999) Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells. *J. Immunol*, 163, 1817-1826.
- Kissmeyer-Nielsen,F. et al. (1966) Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 2, 662-665.
- Kitazawa,Y. et al. (2008) Foxp3-expressing regulatory T cells expanded with CD28 superagonist antibody can prevent rat cardiac allograft rejection. *J. Heart Lung Transplant*, 27, 362-371.
- Klingenberg,R. et al. (2005) Endothelial inducible costimulator ligand expression is increased during human cardiac allograft rejection and regulates endothelial cell-dependent allo-activation of CD8+ T cells in vitro. *Eur. J. Immunol*, 35, 1712-1721.
- Knechtle,S.J. et al. (2001) Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol. Rev*, 183, 205-213.
- Kobayashi,K. et al. (2001) Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech*, 53, 241-245.
- Kohm,A.P. et al. (2006) Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol*, 176, 3301-3305.
- Korty,P.E. et al. (1991) CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation. *J. Immunol*, 146, 4092-4098.
- Kosieradzki,M. et Rowiński,W. (2008) Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc*, 40, 3279-3288.
- Kreijveld,E. et al. (2007) Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. *Am. J. Transplant*, 7, 249-255.
- Kreisel,D., Krupnick,A.S., Balsara,K.R., et al. (2002) Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J. Immunol*, 169, 6154-6161.
- Kreisel,D., Krupnick,A.S., Gelman,A.E., et al. (2002) Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat. Med*, 8, 233-239.
- Kremer,J.M. et al. (2003) Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med*, 349, 1907-1915.
- Kretschmer,K. et al. (2005) Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol*, 6, 1219-1227.
- Krieger,N.R. et al. (1996) CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition. *J. Exp. Med*, 184, 2013-2018.
- Krummel,M.F. et Allison,J.P. (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med*, 183, 2533-2540.

- Kuchroo,V.K. et al. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80, 707-718.
- Kyewski,B. et Derbinski,J. (2004) Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat. Rev. Immunol*, 4, 688-698.
- Kyewski,B. et Klein,L. (2006) A central role for central tolerance. *Annu. Rev. Immunol*, 24, 571-606.
- Lafferty,K.J. et Cunningham,A.J. (1975) A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 53, 27-42.
- Lakkis,F.G. et al. (2000) Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat. Med*, 6, 686-688.
- Lalli,P.N. et al. (2007) Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN-gamma-producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production. *J. Immunol*, 179, 5793-5802.
- Lambrigts,D. et al. (1998) Discordant organ xenotransplantation in primates: world experience and current status. *Transplantation*, 66, 547-561.
- Lanzavecchia,A. et al. (1999) From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell*, 96, 1-4.
- Lanzavecchia,A. et Sallusto,F. (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science*, 290, 92-97.
- Larsen,C.P. et al. (1996) Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*, 381, 434-438.
- Larsen,C.P. et al. (2005) Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am. J. Transplant*, 5, 443-453.
- Laskowski,I.A. et al. (2002) Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J. Am. Soc. Nephrol*, 13, 519-527.
- Le Bas-Bernardet,S. et al. (2008) Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther*, 15, 1247-1256.
- Le Moine,A. et al. (2002) Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*, 73, 1373-1381.
- Lechler,R.I. et Batchelor,J.R. (1982) Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J. Exp. Med*, 155, 31-41.
- Lee,K.M. et al. (1998) Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 282, 2263-2266.
- Lenschow,D.J. et al. (1995) Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J. Exp. Med*, 181, 1145-1155.
- Lenschow,D.J. et al. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol*, 14, 233-258.
- Leventhal,J.R., Dalmaso,A.P., et al. (1993) Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation*, 55, 857-865; discussion 865-866.
- Leventhal,J.R., Matas,A.J., et al. (1993) The immunopathology of cardiac xenograft rejection in the guinea pig-to-rat model. *Transplantation*, 56, 1-8.
- Lewis,A.G. et al. (2008) Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival. *Clin. Exp. Immunol*, 153, 117-126.

- Li,R. et al. (2007) Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁻ TGF-beta 1⁺ adaptive regulatory T cells. *J. Immunol*, 179, 5191-5203.
- Li,X.C. et al. (1999) Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol*, 163, 2500-2507.
- Li,Y. et al. (2008) The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*, 86, 1837-1843.
- Liang,B. et al. (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol*, 180, 5916-5926.
- Liang,S. et al. (2005) Conversion of CD4⁺ CD25⁻ cells into CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med*, 201, 127-137.
- Liblau,R.S. et al. (1994) High-dose soluble antigen: peripheral T-cell proliferation or apoptosis. *Immunol. Rev*, 142, 193-208.
- Lin,C. et Hünig,T. (2003) Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur. J. Immunol*, 33, 626-638.
- Lin,E. et al. (2000) Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127, 117-126.
- Lin,H. et al. (1993) Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J. Exp. Med*, 178, 1801-1806.
- Lin,H. et al. (1998) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4) blockade accelerates the acute rejection of cardiac allografts in CD28-deficient mice: CTLA4 can function independently of CD28. *J. Exp. Med*, 188, 199-204.
- Lindahl,K.F. et Wilson,D.B. (1977) Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J. Exp. Med*, 145, 508-522.
- Linsley,P.S. et al. (1996) Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 4, 535-543.
- Linsley,P.S. et al. (1991) CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med*, 174, 561-569.
- Linsley,P.S. et al. (1990) T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 87, 5031-5035.
- Linsley,P.S. et al. (1992) Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science*, 257, 792-795.
- Liu,D. et al. (2007) C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J. Immunol*, 179, 3966-3972.
- Liu,D. et al. (2005) C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. *Blood*, 105, 2350-2355.
- Liu,W. et al. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med*, 203, 1701-1711.
- Liu,Y. et al. (2006) Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF-beta converted CD4⁺CD25⁺ Tregs from thymic CD4⁺CD25⁻ single positive T cells. *Transplantation*, 82, 953-964.
- Liu,Z. et al. (1996) Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J. Clin. Invest*, 98, 1150-1157.

- Locke, J.E. et al. (2009) The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am. J. Transplant*, 9, 231-235.
- Locke, J.E. et al. (2007) The utility of splenectomy as rescue treatment for severe acute antibody mediated rejection. *Am. J. Transplant*, 7, 842-846.
- Lodge, P.A. et Haisch, C.E. (1993) T cell subset responses to allogeneic endothelium. Proliferation of CD8+ but not CD4+ lymphocytes. *Transplantation*, 56, 656-661.
- Lohr, J. et al. (2003) The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat. Immunol*, 4, 664-669.
- Long, S.A. et Buckner, J.H. (2008) Combination of rapamycin and IL-2 increases de novo induction of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T cells. *J. Autoimmun*, 30, 293-302.
- Lopez, M. et al. (2006) A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Am. Soc. Nephrol*, 17, 2844-2853.
- Louis, S. et al. (2006) Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 81, 398-407.
- Lu, L. et Cantor, H. (2008) Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell. Mol. Immunol*, 5, 401-406.
- Ludwig-Portugall, I. et al. (2008) Cutting edge: CD25+ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens. *J. Immunol*, 181, 4447-4451.
- Lühder, F. et al. (2003) Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med*, 197, 955-966.
- Luo, Z. et al. (2000) Anergic T cells generated in vitro suppress rejection response to islet allografts. *Transplantation*, 69, 2144-2148.
- Lyddane, C. et al. (2006) Cutting Edge: CD28 controls dominant regulatory T cell activity during active immunization. *J. Immunol*, 176, 3306-3310.
- Maier, S. et al. (2001) Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28-/- mice. *Nat. Med*, 7, 557-562.
- Makrigiannakis, A. et al. (2001) Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat. Immunol*, 2, 1018-1024.
- Mandelbrot, D.A., Furukawa, Y., et al. (1999) Expression of B7 molecules in recipient, not donor, mice determines the survival of cardiac allografts. *J. Immunol*, 163, 3753-3757.
- Mandelbrot, D.A., McAdam, A.J., et al. (1999) B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). *J. Exp. Med*, 189, 435-440.
- Mandelbrot, D.A. et al. (2001) B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4. *J. Clin. Invest*, 107, 881-887.
- Marengère, L.E. et al. (1996) Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science*, 272, 1170-1173.
- Martin, M. et al. (2001) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med*, 194, 1675-1681.
- Martínez-Llordella, M. et al. (2007) Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am. J. Transplant*, 7, 309-319.

- Masteller,E.L. et al. (2000) Structural analysis of CTLA-4 function in vivo. *J. Immunol*, 164, 5319-5327.
- Matzinger,P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol*, 12, 991-1045.
- Mauiyyedi,S. et Colvin,R.B. (2002) Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*, 11, 609-618.
- Mauiyyedi,S. et al. (2002) Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J. Am. Soc. Nephrol*, 13, 779-787.
- McCarthy,G.P. et Roberts,I.S.D. (2002) Diagnosis of acute renal allograft rejection: evaluation of the Banff 97 Guidelines for Slide Preparation. *Transplantation*, 73, 1518-1521.
- McGeachy,M.J. et al. (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol*, 175, 3025-3032.
- MEDAWAR,P.B. (1961) Immunological tolerance. *Science*, 133, 303-306.
- Mellor,A.L. et Munn,D.H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol*, 4, 762-774.
- Mempel,T.R. et al. (2004) T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427, 154-159.
- MERRILL,J.P. et al. (1956) Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc*, 160, 277-282.
- van der Merwe,P.A. et al. (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med*, 185, 393-403.
- MICHON,L. et al. (1953) [An attempted kidney transplantation in man: medical and biological aspects.]. *Presse Med*, 61, 1419-1423.
- MILLER,J.F. (1961) Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2, 748-749.
- Miller,S.D. et al. (1995) Blockade of CD28/B7-1 interaction prevents epitope spreading and clinical relapses of murine EAE. *Immunity*, 3, 739-745.
- Minamimura,K. et al. (2006) CD4+ regulatory T cells are spared from deletion by antilymphocyte serum, a polyclonal anti-T cell antibody. *J. Immunol*, 176, 4125-4132.
- Mirenda,V. et al. (2007) Physiologic and aberrant regulation of memory T-cell trafficking by the costimulatory molecule CD28. *Blood*, 109, 2968-2977.
- Mold,J.E. et al. (2008) Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*, 322, 1562-1565.
- Moll,S. et Pascual,M. (2005) Humoral rejection of organ allografts. *Am. J. Transplant*, 5, 2611-2618.
- Mombaerts,P. et al. (1993) Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*, 365, 53-56.
- Monk,N.J. et al. (2003) Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat. Med*, 9, 1275-1280.
- Monks,C.R. et al. (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*, 395, 82-86.

- Montgomery,S.P. et al. (2002) Combination induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80, CD86, and CD154 in nonhuman primate renal transplantation. *Transplantation*, 74, 1365-1369.
- Moreau,P. et al. (1998) Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft. *Am. J. Reprod. Immunol*, 40, 136-144.
- Morón,G. et al. (2004) New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol*, 25, 92-97.
- Moseman,E.A. et al. (2004) Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol*, 173, 4433-4442.
- Mosmann,T.R. et Sad,S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*, 17, 138-146.
- Müller,N. et al. (2008) A CD28 superagonistic antibody elicits 2 functionally distinct waves of T cell activation in rats. *J. Clin. Invest*, 118, 1405-1416.
- Nakaseko,C. et al. (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med*, 190, 765-774.
- Ndejemi,M.P. et al. (2006) Control of memory CD4 T cell recall by the CD28/B7 costimulatory pathway. *J. Immunol*, 177, 7698-7706.
- Negulescu,P.A. et al. (1996) Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*, 4, 421-430.
- Neubert,K. et al. (2008) The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat. Med*, 14, 748-755.
- Nguyen,D.H. et al. (2006) Loss of Siglec expression on T lymphocytes during human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 103, 7765-7770.
- Ni Choileain,N. et Redmond,H.P. (2006) Cell response to surgery. *Arch Surg*, 141, 1132-1140.
- Nielsen,E.W. et al. (2007) Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement. *Mol. Immunol*, 44, 1819-1826.
- Nishizuka,Y. et Sakakura,T. (1969) Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166, 753-755.
- Nissen,M.H. et al. (1998) C1-esterase inhibitor blocks T lymphocyte proliferation and cytotoxic T lymphocyte generation in vitro. *Int. Immunol*, 10, 167-173.
- Noel,P.J. et al. (1996) CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J. Immunol*, 157, 636-642.
- Nunès,J. et al. (1993) CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events. *Int. Immunol*, 5, 311-315.
- Ohresser,M. et al. (2006) Risk in drug trials. *Lancet*, 368, 2205-2206.
- Olsson,C. et al. (1999) CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts. *J. Biol. Chem*, 274, 14400-14405.
- Onishi,Y. et al. (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 105, 10113-10118.
- Oosterwegel,M.A. et al. (1999) The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation. *J. Immunol*, 163, 2634-2639.

- Orabona,C. et al. (2004) CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. *Nat. Immunol*, 5, 1134-1142.
- Ossevoort,M.A. et al. (1999) Prevention of renal allograft rejection in primates by blocking the B7/CD28 pathway. *Transplantation*, 68, 1010-1018.
- Pandiyani,P. et al. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol*, 8, 1353-1362.
- Paust,S. et al. (2004) Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 101, 10398-10403.
- PAYNE,R. et ROLFS,M.R. (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J. Clin. Invest*, 37, 1756-1763.
- Perrin,P.J. et al. (1999) Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*, 163, 1704-1710.
- Perrin,P.J. et al. (1996) CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol*, 157, 1333-1336.
- Perry,D.K. et al. (2009) Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am. J. Transplant*, 9, 201-209.
- Pietra,B.A. et al. (2000) CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J. Clin. Invest*, 106, 1003-1010.
- Pistillo,M.P. et al. (2003) CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood*, 101, 202-209.
- Pitcher,C.J. et al. (2002) Development and homeostasis of T cell memory in rhesus macaque. *J. Immunol*, 168, 29-43.
- Pober,J.S. et Cotran,R.S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50, 537-544.
- Polanczyk,M.J. et al. (2004) Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J. Immunol*, 173, 2227-2230.
- Pöling,J. et al. (2006) Hyperacute rejection in ex vivo-perfused porcine lungs transgenic for human complement regulatory proteins. *Transpl. Int*, 19, 225-232.
- PORTER,K.A. (1965) MORPHOLOGICAL ASPECTS OF RENAL HOMOGRAFT REJECTION. *Br. Med. Bull*, 21, 171-175.
- Prasad,K.V. et al. (1994) T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 91, 2834-2838.
- Pratschke,J. et al. (2005) What can be learned from brain-death models? *Transpl. Int*, 18, 15-21.
- Pratschke,J. et al. (2008) Review of nonimmunological causes for deteriorated graft function and graft loss after transplantation. *Transpl. Int*, 21, 512-522.
- Pratt,J.R. et al. (1996a) Allograft immune response with sCR1 intervention. *Transpl. Immunol*, 4, 72-75.
- Pratt,J.R. et al. (1996b) Effects of complement inhibition with soluble complement receptor-1 on vascular injury and inflammation during renal allograft rejection in the rat. *Am. J. Pathol*, 149, 2055-2066.
- Pratt,J.R. et al. (2002) Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat. Med*, 8, 582-587.

- Pree,I. et al. (2007) CTLA4Ig promotes the induction of hematopoietic chimerism and tolerance independently of Indoleamine-2,3-dioxygenase. *Transplantation*, 83, 663-667.
- Pruitt,S.K. et al. (1997) Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation*, 63, 900-902.
- Qin,S. et al. (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science*, 259, 974-977.
- Racusen,L.C. et al. (2003) Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am. J. Transplant*, 3, 708-714.
- Raychaudhuri,S.P. et al. (2008) FR255734, a humanized, Fc-Silent, Anti-CD28 antibody, improves psoriasis in the SCID mouse-psoriasis xenograft model. *J. Invest. Dermatol*, 128, 1969-1976.
- Read,S. et al. (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med*, 192, 295-302.
- Robillard,N. et al. (1998) CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res*, 4, 1521-1526.
- Rosengard,B.R. et al. (1992) Induction of specific tolerance to class I-disparate renal allografts in miniature swine with cyclosporine. *Transplantation*, 54, 490-497.
- Rother,R.P. et al. (2008) C5 blockade with conventional immunosuppression induces long-term graft survival in presensitized recipients. *Am. J. Transplant*, 8, 1129-1142.
- Rouvier,E. et al. (1993) Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med*, 177, 195-200.
- Rudd,C.E. (2008) The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat. Rev. Immunol*, 8, 153-160.
- Rulifson,I.C. et al. (1997) CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J. Immunol*, 158, 658-665.
- Russell,M.E. et al. (1996) Chronic cardiac rejection in the LEW to F344 rat model. Blockade of CD28-B7 costimulation by CTLA4Ig modulates T cell and macrophage activation and attenuates arteriosclerosis. *J. Clin. Invest*, 97, 833-838.
- Saadi,S. et al. (2004) Pathways to acute humoral rejection. *Am. J. Pathol*, 164, 1073-1080.
- Sachs,D.H. (2003) Tolerance: of mice and men. *J. Clin. Invest*, 111, 1819-1821.
- Sakaguchi,S. et al. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol*, 155, 1151-1164.
- Sakaguchi,S. et al. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev*, 182, 18-32.
- Sakaguchi,S. (2004) Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*, 22, 531-562.
- Sakaguchi,S. (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol*, 6, 345-352.
- Sakaguchi,S. et al. (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev*, 212, 8-27.
- Sakaguchi,S. et al. (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-787.

- Salomon,B. et Bluestone,J.A. (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol*, 19, 225-252.
- Salomon,B. et al. (2000) B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12, 431-440.
- Sansom,D.M. et al. (2003) What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24, 314-319.
- Sansom,D.M. et Walker,L.S.K. (2006) The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol. Rev*, 212, 131-148.
- Sarris,M. et al. (2008) Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*, 28, 402-413.
- Sarwal,M. et al. (2003) Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N. Engl. J. Med*, 349, 125-138.
- Sayegh,M.H. et Colvin,R.B. (2003) Case record of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 8-2003. A 35-year-old man with early dysfunction of a second renal transplant. *N. Engl. J. Med*, 348, 1033-1044.
- Scheipers,P. et Reiser,H. (1998) Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 95, 10083-10088.
- Schmidt,J. et al. (2003) Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies. *J. Neuroimmunol*, 140, 143-152.
- Schneider,H. et al. (1995) CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J. Exp. Med*, 181, 351-355.
- Schneider,H. et al. (2006) Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*, 313, 1972-1975.
- Schneider,H. et al. (2008) CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur. J. Immunol*, 38, 40-47.
- Schraven,B. et Kalinke,U. (2008) CD28 superagonists: what makes the difference in humans? *Immunity*, 28, 591-595.
- Schreiber,C. et al. (2006) C1-INH and its effect on infarct size and ventricular function in an acute pig model of infarction, cardiopulmonary bypass, and reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg*, 54, 227-232.
- Schwartz,J.C. et al. (2001) Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature*, 410, 604-608.
- Schwartz,R.H. (1990) A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, 248, 1349-1356.
- Schwartz,R.H. (2003) T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol*, 21, 305-334.
- Schweitzer,A.N. et Sharpe,A.H. (1998) Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J. Immunol*, 161, 2762-2771.
- Scottà,C. et al. (2008) FOXP3 induced by CD28/B7 interaction regulates CD25 and anergic phenotype in human CD4+CD25- T lymphocytes. *J. Immunol*, 181, 1025-1033.
- Séveno,C. et al. (2007) Induction of regulatory cells and control of cellular but not vascular rejection by costimulation blockade in hamster-to-rat heart xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 14, 25-33.

- Shahinian,A. et al. (1993) Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*, 261, 609-612.
- Sharma,M.D. et al. (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest*, 117, 2570-2582.
- Sharpe,A.H. et Freeman,G.J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol*, 2, 116-126.
- Sherman,L.A. et Chattopadhyay,S. (1993) The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol*, 11, 385-402.
- Shevach,E.M. (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30, 636-645.
- Shevach,E.M. et al. (2008) The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol*, 38, 915-917.
- Shiao,S.L. et al. (2007) Immunomodulatory properties of FK734, a humanized anti-CD28 monoclonal antibody with agonistic and antagonistic activities. *Transplantation*, 83, 304-313.
- Silver,P.B. et al. (2000) Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J. Immunol*, 165, 5041-5047.
- Sivasankar,B. et al. (2009) CD59 blockade enhances antigen-specific CD4+ T cell responses in humans: a new target for cancer immunotherapy? *J. Immunol*, 182, 5203-5207.
- Sloan-Lancaster,J. et al. (1996) Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J. Exp. Med*, 184, 1525-1530.
- Sojka,D.K. et al. (2008) Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*, 124, 13-22.
- Solez,K. et al. (2008) Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am. J. Transplant*, 8, 753-760.
- Stamper,C.C. et al. (2001) Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*, 410, 608-611.
- Stephens,L.A. et Mason,D. (2000) CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J. Immunol*, 165, 3105-3110.
- Strainic,M.G. et al. (2008) Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity*, 28, 425-435.
- Strauss,L. et al. (2007) Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. *J. Immunol*, 178, 320-329.
- Sullivan,T.J. et al. (2001) Lack of a role for transforming growth factor-beta in cytotoxic T lymphocyte antigen-4-mediated inhibition of T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 2587-2592.
- Sumitran,S. (2000) Clinical importance of HLA-specific and non-HLA-specific antibodies in allogeneic kidney transplantation. *Adv. Nephrol. Necker Hosp*, 30, 29-39.
- Suntharalingam,G. et al. (2006) Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med*, 355, 1018-1028.
- Suresh,M. et al. (2001) Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J. Immunol*, 167, 5565-5573.

- Sykes, M. et Sachs, D.H. (1988) Mechanisms of suppression in mixed allogeneic chimeras. *Transplantation*, 46, 135S-142S.
- Szanya, V. et al. (2002) The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol*, 169, 2461-2465.
- Szot, G.L. et al. (2000) Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. *Transplantation*, 69, 904-909.
- Tacke, M. et al. (1997) CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur. J. Immunol*, 27, 239-247.
- Tai, X. et al. (2005) CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol*, 6, 152-162.
- Takada, M. et al. (1997) The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest*, 100, 1199-1203.
- Takahashi, S. et al. (2005) In vivo overexpression of CTLA-4 suppresses lymphoproliferative diseases and thymic negative selection. *Eur. J. Immunol*, 35, 399-407.
- Takahashi, T. et al. (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol*, 10, 1969-1980.
- Takahashi, T. et al. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med*, 192, 303-310.
- Talmage, D.W. et al. (1976) Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science*, 191, 385-388.
- Tan, P. et al. (1993) Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J. Exp. Med*, 177, 165-173.
- Tang, Q. et Bluestone, J.A. (2008) The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol*, 9, 239-244.
- Tang, Q. et al. (2004) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol*, 34, 2996-3005.
- Tang, Q. et al. (2003) Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol*, 171, 3348-3352.
- Tang, Q. et Krummel, M.F. (2006) Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol*, 18, 496-502.
- Taylor, C.J. et al. (1998) HLA-specific antibodies in highly sensitized patients can cause a positive crossmatch against pig lymphocytes. *Transplantation*, 65, 1634-1641.
- Taylor, P.A. et al. (2001) CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J. Exp. Med*, 193, 1311-1318.
- Terasaki, P.I. et al. (1995) High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N. Engl. J. Med*, 333, 333-336.
- Thebault, P. et al. (2007) Role of IFN-gamma in allograft tolerance mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells by induction of IDO in endothelial cells. *Am. J. Transplant*, 7, 2472-2482.

- Thielmann,M. et al. (2006) Administration of C1-esterase inhibitor during emergency coronary artery bypass surgery in acute ST-elevation myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30, 285-293.
- Thompson,C.B. et al. (1989) CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 1333-1337.
- Tischner,D. et al. (2006) Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis. *Brain*, 129, 2635-2647.
- Tivol,E.A. et al. (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3, 541-547.
- Torrealba,J.R. et al. (2004) Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates. *J. Immunol*, 172, 5753-5764.
- Tsang,J.Y.S. et al. (2003) Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood*, 101, 2704-2710.
- Turka,L.A. et al. (1992) T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 11102-11105.
- Turnquist,H.R. et al. (2007) Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J. Immunol*, 178, 7018-7031.
- Tzachanis,D. et al. (2002) Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood*, 99, 1465-1473.
- Ubaldi,V. et al. (2003) CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarisation. *Clin. Dev. Immunol*, 10, 13-17.
- Ueda,Y. et al. (1995) Both CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) activate phosphatidylinositol 3-kinase, and wortmannin reveals heterogeneity in the regulation of T cell IL-2 secretion. *Int. Immunol*, 7, 957-966.
- Urakami,H. et al. (2006) Combination of donor-specific blood transfusion with anti-CD28 antibody synergizes to prolong graft survival in rat liver transplantation. *Transplant. Proc*, 38, 3244-3246.
- Valmori,D. et al. (2006) Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *J. Immunol*, 177, 944-949.
- VAN ROOD,J.J. et al. (1958) Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature*, 181, 1735-1736.
- Vanasek,T.L. et al. (2006) CD25+Foxp3+ regulatory T cells facilitate CD4+ T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia. *J. Immunol*, 176, 5880-5889.
- Vandenberghe,P. et al. (1993) In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study. *Int. Immunol*, 5, 317-321.
- Vangerow,B. et al. (2001) C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys. *Xenotransplantation*, 8, 266-272.
- Vanhove,B. et al. (2003) Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha 1-antitrypsin fusion antibody. *Blood*, 102, 564-570.
- Varaganam,M. et al. (2009) C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation. *N. Engl. J. Med*, 360, 874-880.

- Vasu,C. et al. (2004) Targeted CTLA-4 engagement induces CD4+CD25+CTLA-4high T regulatory cells with target (allo)antigen specificity. *J. Immunol*, 173, 2866-2876.
- Vella,J.P. et al. (1997) Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*, 64, 795-800.
- Vendetti,S. et al. (2000) Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J. Immunol*, 165, 1175-1181.
- Venuprasad,K. et al. (2001) Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression. *Eur. J. Immunol*, 31, 1536-1543.
- Vignali,D.A.A. et al. (2008) How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol*, 8, 523-532.
- Vincenti,F. et al. (2005) Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med*, 353, 770-781.
- Viola,A. et Lanzavecchia,A. (1996) T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 273, 104-106.
- Waibler,Z. et al. (2008) Signaling signatures and functional properties of anti-human CD28 superagonistic antibodies. *PLoS ONE*, 3, e1708.
- Waldmann,H. et Cobbold,S. (2009) Regulatory T cells: context matters. *Immunity*, 30, 613-615.
- Walport,M.J. (2001) Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med*, 344, 1058-1066.
- Walunas,T.L. et al. (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1, 405-413.
- Wang,H. et al. (1999) Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents hyperacute rejection in a xenograft heart transplantation model. *Transplantation*, 68, 1643-1651.
- Wang,H. et al. (2005) Prevention of acute vascular rejection by a functionally blocking anti-C5 monoclonal antibody combined with cyclosporine. *Transplantation*, 79, 1121-1127.
- Ward,S.G. et al. (1993) Ligation of CD28 receptor by B7 induces formation of D-3 phosphoinositides in T lymphocytes independently of T cell receptor/CD3 activation. *Eur. J. Immunol*, 23, 2572-2577.
- Watanabe,J. et Scornik,J.C. (2005) IVIG and HLA antibodies. Evidence for inhibition of complement activation but not for anti-idiotypic activity. *Am. J. Transplant*, 5, 2786-2790.
- Watanabe,N. et al. (2005) Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436, 1181-1185.
- Waterhouse,P. et al. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science*, 270, 985-988.
- Weiss,A. et Littman,D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, 76, 263-274.
- Welsh,R.M. et Selin,L.K. (2002) No one is naive: the significance of heterologous T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol*, 2, 417-426.
- Welters,M.J.P. et al. (2002) A broad and strong humoral immune response to donor HLA after implantation of cryopreserved human heart valve allografts. *Hum. Immunol*, 63, 1019-1025.
- Williams,G.M. et al. (1968) "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. *N. Engl. J. Med*, 279, 611-618.
- Williams,J.M. et al. (2004) Acute vascular rejection and accommodation: divergent outcomes of the humoral response to organ transplantation. *Transplantation*, 78, 1471-1478.

- Williams, M.A. et al. (2002) Cutting edge: persistent viral infection prevents tolerance induction and escapes immune control following CD28/CD40 blockade-based regimen. *J. Immunol*, 169, 5387-5391.
- Wing, K. et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322, 271-275.
- Woerly, G. et al. (1999) Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J. Exp. Med*, 190, 487-495.
- Woodward, J.E. et al. (1998) T-cell alterations in cardiac allograft recipients after B7 (CD80 and CD86) blockade. *Transplantation*, 66, 14-20.
- Wülfing, C. et Davis, M.M. (1998) A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science*, 282, 2266-2269.
- Xystrakis, E. et al. (2004) Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J. Immunol*, 173, 3140-3147.
- Yamada, A. et al. (2001) CD28-independent costimulation of T cells in alloimmune responses. *J. Immunol*, 167, 140-146.
- Yin, D. et Fathman, C.G. (1995) Induction of tolerance to heart allografts in high responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4Ig. *J. Immunol*, 155, 1655-1659.
- Yokosuka, T. et Saito, T. (2009) Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunol. Rev*, 229, 27-40.
- Yokosuka, T. et al. (2005) Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol*, 6, 1253-1262.
- Yu, X. et al. (2004) CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J. Clin. Invest*, 113, 1624-1630.
- Zeerleder, S. et al. (2003) Administration of C1 inhibitor reduces neutrophil activation in patients with sepsis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*, 10, 529-535.
- Zeiser, R. et al. (2006) Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*, 108, 390-399.
- Zeng, D. et al. (1999) Bone marrow NK1.1(-) and NK1.1(+) T cells reciprocally regulate acute graft versus host disease. *J. Exp. Med*, 189, 1073-1081.
- Zhang, H. et al. (2007) Suppression of complement regulatory protein C1 inhibitor in vascular endothelial activation by inhibiting vascular cell adhesion molecule-1 action. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 358, 1120-1127.
- Zhang, Z.X. et al. (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med*, 6, 782-789.
- Zheng, S.G. et al. (2006) TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol*, 176, 3321-3329.
- Zheng, X.X. et al. (1999) CTLA4 signals are required to optimally induce allograft tolerance with combined donor-specific transfusion and anti-CD154 monoclonal antibody treatment. *J. Immunol*, 162, 4983-4990.
- Zheng, X.X. et al. (1997) The role of donor and recipient B7-1 (CD80) in allograft rejection. *J. Immunol*, 159, 1169-1173.

- Zheng, Y. et al. (2004) CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J. Immunol*, 172, 2778-2784.
- Zhong, X. et al. (2007) Reciprocal generation of Th1/Th17 and T(reg) cells by B1 and B2 B cells. *Eur. J. Immunol*, 37, 2400-2404.
- Zhu, X. et al. (2005) Blockade of CD86 signaling facilitates a Th2 bias at the maternal-fetal interface and expands peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells to rescue abortion-prone fetuses. *Biol. Reprod*, 72, 338-345.
- Ziegler, S.F. (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu. Rev. Immunol*, 24, 209-226.

Annexes

Annexes

I- Annexe I

Les cellules myéloïdes suppressives s'accumulent dans des greffons de reins tolérants et inhibent spécifiquement l'expansion des lymphocytes T effecteurs.

Anne-Sophie Dugast, Thomas Haudebourg, Flora Coulon, Michèle Heslan, Fabienne Haspot, Nicolas Poirier, Romain Vuillefroy de Silly, Claire Usal, Helga Smit, Bernard Martinet, Pamela Thebault, Karine Renaudin, et Bernard Vanhove.

Article publié dans *Journal of Immunology* 180: 7898–7906 (2008).

Titre original : *Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Kidney Allograft Tolerance and Specifically Suppress Effector T Cell Expansion.*

Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Kidney Allograft Tolerance and Specifically Suppress Effector T Cell Expansion¹

Anne-Sophie Dugast,* Thomas Haudebourg,* Flora Coulon,* Michèle Heslan,* Fabienne Haspot,* Nicolas Poirier,* Romain Vuillefroy de Silly,* Claire Usal,* Helga Smit,* Bernard Martinet,* Pamela Thebault,* Karine Renaudin,[†] and Bernard Vanhove^{2*}

The immune tolerance to rat kidney allografts induced by a perioperative treatment with anti-CD28 Abs is associated with a severe unresponsiveness of peripheral blood cells to donor Ags. In this model, we identified an accumulation in the blood of CD3⁺ class II⁺ CD11b⁺ CD80/86⁺ plastic-adherent cells that additionally expressed CD172a as well as other myeloid markers. These cells were able to inhibit proliferation, but not activation, of effector T cells and to induce apoptosis in a contact-dependent manner. Their suppressive action was found to be under the control of inducible NO synthase, an enzyme also up-regulated in tolerated allografts. Based on these features, these cells can be defined as myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Interestingly, CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory T cells were insensitive in vitro to MDSC-mediated suppression. Although the adoptive transfer of MDSC failed to induce kidney allograft tolerance in recently transplanted recipients, the maintenance of tolerance after administration of anti-CD28 Abs was found to be dependent on the action of inducible NO synthase. These results suggest that increased numbers of MDSC can inhibit alloreactive T cell proliferation in vivo and that these cells may participate in the NO-dependent maintenance phase of tolerance. *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 7898–7906.

Although transplant tolerance in rats has frequently been associated with the action of regulatory T cells (Tregs)³ (1–3), in some cases Tregs are not instrumental. For example, administration of anti-CD28 Abs (4) or anti-donor class II Abs (5) results in tolerance to kidney allografts across a full MHC barrier with an immune suppression that is at least partially dependent on non-T cells. In most cases, non-T cell populations with potential regulatory activity in the transplant setting have been identified as regulatory dendritic cells producing IDO (6) and heme oxygenase-1 (HO-1) (7), alternatively activated macrophages creating a Th2 environment (8), or NKT cells (9). Another type of non-T regulatory cell, so-called myeloid suppressor cells, have been associated with impaired immune reactivity to Ag challenge (mainly tumors but also infections), chronic inflammation, or superantigen-induced tolerance of CD4⁺ T lymphocytes (re-

viewed by Sefarini et al. (10)). Myeloid suppressor cells have also been found to contribute to the immunosuppression accompanying the lethal systemic graft-vs-host reaction in irradiated mice (11). These cells are a heterogeneous mixture of myeloid cells at different stages of differentiation, including precursors of granulocytes, macrophages, dendritic cells, or early myeloid progenitors. To avoid confusion between mesenchymal stem cells and the commonly used term “myeloid suppressor cells”, Gabrilovich et al. proposed the term “myeloid-derived suppressor cells” (MDSC) (12). In mice, these cells share the common functional characteristics of being able to inhibit T cell responses by inducing the apoptosis of activated T cells via up-regulation of NO production (13). NO regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak/STAT5 signaling pathway (14). Additionally, arginase 1 can be induced in MDSC under the action of Th2-type cytokines, which synergize with NO to give rise to peroxynitrites that drive the apoptosis of Ag-primed T lymphocytes by inhibiting protein tyrosine phosphorylation via nitration of tyrosine residues (15). It has also been suggested that MDSC suppressive activity is mediated by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and requires an interaction between CD152 on Tregs with CD80 that is up-regulated on MDSC upon contact with activated T lymphocytes (16). Mouse MDSC are defined phenotypically by their expression of CD11b and Gr1 (Ly-6G). The human equivalents are less well defined; they have been described as granulocyte-macrophage-progenitor cells expressing the CD34 marker (17). The rat counterparts express the CD11b/c and HIS48 myeloid markers (18).

Having previously identified non-T cells with suppressive activity in a rat model of kidney transplant tolerance (4), the aim of the current study was to characterize the phenotype and mechanisms of action of these cells. We report herein on an accumulation of suppressor cells within the peripheral blood and grafts of tolerant kidney graft recipients. These cells are characterized by their expression of CD80/86, signal regulatory protein α (SIRP α ,

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U643, Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes; and [†]Service d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France

Received for publication November 13, 2007. Accepted for publication April 14, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported in part by the Roche Organ Transplant Research Foundation Grant 466230972 (to B.V.) and by the Progreffe Foundation.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Bernard Vanhove, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U643, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. E-mail address: Bernard.Vanhove@univ-nantes.fr

³ Abbreviations used in this paper: Treg, regulatory T cell; HO-1, heme oxygenase-1; iNOS, inducible NO synthase; L-NMMA, N^G-monomethyl-L-arginine; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; 1-MT, 1-methyl-D,L-tryptophan; SIRP α , signal regulatory protein α ; SnPP, tin protoporphyrin.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

CD172a), CD11a/b, and inducible NO synthase (iNOS) and their ability to suppress T cell proliferation in a contact-dependent and iNOS-dependent manner. Additionally, our data demonstrate that these MDSC selectively suppress activated effector T cells, whereas natural CD4⁺CD25^{high} Tregs are largely resistant to this effect.

Materials and Methods

Animals and transplantations

Eight- to 12-wk-old male Lewis.1W (LEW.1W, haplotype RT1^u) and Lewis.1A (LEW.1A, haplotype RT1^a) congenic rats (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) differed in their entire MHC region. Heterotopic LEW.1W kidney transplantation was performed as previously described (19). The kidney (right side) of the recipient (LEW.1A) was replaced by a LEW.1W donor allograft, and a contralateral nephrectomy was performed 7 days later, after which the allograft was life-sustaining. Studies described herein have been performed in accordance with the institutional guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Tolerance induction

The JJ319 (IgG1 anti-rat CD28) mouse hybridoma was a gift from Dr. Thomas Hunig (Wurzburg, Germany). The JJ319 mAb was purified from hybridoma supernatant and administered to LEW.1A allograft recipients by i.p. injection at 1 mg/day for 7 days starting on the day of transplantation. This Ab induces a transient down-modulation of CD28 expression *in vivo*, without depleting target cells (20). Without treatment, the grafts were rejected 11 days posttransplantation. Syngeneic transplants (LEW.1A to LEW.1A) served as controls.

Abs and reagents

Purified anti-B7-1 (clone 3H5) and anti-B7-2 (clone 24F) mouse hybridomas were a gift from Dr. H. Yagita (Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan). FITC-conjugated Pan-T (CD6), anti-CD11a (WT.1), anti-CD11b (WT.5), anti-RT1A (MHC class I), anti-CD40, and purified anti-CD45R (clone HIS24) were purchased from BD Pharmingen. HIS48 Ab was from Serotec. FITC-conjugated anti-CD172a (SIRP α or OX41), anti-CD4 (W3/25), anti-MHC class I (OX18), anti-MHC class II (OX6), anti-CD8 (OX8), anti-CD25 (OX39), anti-CD103 (OX62), anti-CD90 (OX7), and anti-CD62L (OX85) were prepared in our laboratory from the corresponding hybridomas obtained from the European Cell Culture Collection (Salisbury, U.K.). Alexa Fluor 647-conjugated anti-NKRP-1 (3.2.3) was prepared in our laboratory using a conjugation kit (Invitrogen; Molecular Probes). PE-conjugated anti-mouse was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The anti-TCR β R7-3 Ab was stained with a Zenon Alexa Fluor 700 mouse IgG1 labeling kit from Molecular Probes according to the manufacturer's instructions. Rabbit anti-rat iNOS Ab was purchased from Abcam.

Cells and cell sorting

Spleen T cells were prepared by nylon wool adhesion followed by depletion of NK cells, B cells, and monocytes using specific mAbs (clones 3.2.3, HIS24, and OX42, respectively), followed by anti-mouse IgG-coated Dynabeads (Invitrogen). Blood sampling was performed in heparin tubes. Erythrocytes were removed by hypotonic lysis. MDSC were identified by staining 30 min at 4°C with anti-rat CD80/86 mAbs and PE-conjugated anti-mouse IgG secondary Ab (Jackson ImmunoResearch Laboratories). After saturation with an excess of mouse IgG, cells were stained with FITC-conjugated anti-rat CD6 Ab and Alexa 647-conjugated anti-rat NKRP-1 Ab. Cells were then filtered (60 μ m) and sorted using an Aria flow cytometer (BD Biosciences). Cell purity after sorting was routinely >95%. Bone marrow cells were isolated from the femurs and tibiae of tolerant LEW.1A rats.

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system using SYBR Green PCR core reagents. The following oligonucleotides were used: rat iNOS: upper primer 5'-GACCAAAGTGTGTGCTGGA-3' and lower primer 5'-TACTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'; and rat hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): upper primer 5'-CCTTGGTCAAGCAGTA CAGCC-3' and lower primer 5'-TTCGCTGATGACACAAACATGA-3'. HPRT was used as an endogenous control gene to normalize varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a

control sample, used for all experiments, was calculated with the $2(-\Delta\Delta C_t)$ method. All samples were analyzed in duplicate. Expression of genes of interest was compared between tolerant animals and syngeneic controls.

Adoptive cell transfer

Cell transfer was performed by i.v. injection into nonirradiated recipients on the day of kidney transplantation, as previously described (5). Donor cells were unfractionated spleen cells or MDSC purified from blood and bone marrow. In other experiments, CFSE-labeled alloreactive T cells were transferred into irradiated recipients and proliferated *in vivo* in a graft-vs-host disease-like manner, as previously described (21). Briefly, 150×10^6 spleen cells from LEW.1A rats were injected i.v. into allogeneic LEW.1W recipients that received a sublethal (4.5 Gy) total body irradiation on day -1. Eight million MDSC from the blood of LEW.1W rats was coinjected. On day 2.5, spleens were harvested and the number of CFSE⁺ cells was analyzed by flow cytometry.

Cell culture and proliferation assays

MLRs were performed as previously described (21). Spleen dendritic cells, used as APC and stimulators, were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz gradient as previously reported (22). APC (10^5) and responding cells (10^5) were cocultured for 5 days in 96-well round-bottom culture plates in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 10% heat-inactivated FCS, 1% nonessential amino acids, 5 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, and 1 μ M 2-ME. Proliferation was measured by addition of 0.5 μ Ci [³H]thymidine per well. For polyclonal stimulation, T cells were stimulated with 2.6 μ g/ml anti-CD28 Abs in flat-bottom 96-well plates previously coated with anti-CD3 (0.5 μ g/ml; 2 h at 37°C). For transwell assays, 3×10^5 cells were placed in the lower and/or upper chamber of a 24-well Costar Transwell plate (Fisher Scientific) and cultured for 3 days. Proliferation was measured as for MLRs. In suppression assays, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA, Sigma-Aldrich) was used at 5 mM, 1-methyl-D,L-tryptophan (1-MT; Sigma-Aldrich) was used at 200 μ M, and tin protoporphyrin (SnPP; Frontier Scientific) at 50 μ M.

Mixed leukocyte reactions

MLRs were performed as previously described (21), except that 5 mM L-NMMA (Sigma-Aldrich) was added to the medium.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed in a ⁵¹Cr-release assay. Target cells (YAC-1 cells, European Cell Culture Collection) were labeled with ⁵¹Cr for 60 min at 37°C in complete medium. Serial dilutions of effector cells in complete medium were mixed with 3000 ⁵¹Cr-labeled target cells in triplicate in V-bottom 96-well plates and centrifuged for 1 min at 1500 \times g. Plates were then incubated for 4 h at 37°C, 5% CO₂. The supernatants were harvested and ⁵¹Cr release was determined using a scintillation counter (PerkinElmer). Specific cytotoxicity was calculated according to the following formula: (experimental release - spontaneous release) \times 100 / (maximum release - spontaneous release).

Cytokine assays

IFN- γ and IL-2 in the supernatants were measured by ELISA using kits from BD Biosciences and R&D Systems, respectively, according to the manufacturers' instructions.

Immunostaining

Analyses of cell cytopins were performed after acetone fixation and saturation (using PBS, 4% BSA, 10% goat serum) for 30 min at room temperature. Staining with iNOS Abs (Abcam) was performed overnight at 4°C. Cells were washed 3 times and incubated for 1 h at room temperature with FITC-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1/100 and mounted with Dako medium (DakoCytomation). Graft samples were embedded in Tissue Tek OCT compound, snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5- μ m sections, and fixed in acetone. Sections were permeabilized for 30 min at room temperature using 0.5% saponin, 4% BSA, 2% normal goat serum, 10% rat serum in PBS, and stained with the primary Ab rabbit anti-iNOS (Abcam), FITC-conjugated anti-HIS48 mAb, and purified CD11b/c (OX42) mAb overnight at 4°C. After washing, sections were incubated for 1.5 h with the secondary Ab Alexa 350-conjugated anti-rabbit (4 μ g/ml) (Invitrogen) and Alexa 568-conjugated anti-mouse IgG2a (2 μ g/ml; Chemicon International), mounted with Dako medium, and analyzed using a confocal-like immunofluorescence technique (Zeiss Axiovert 200M microscope with an

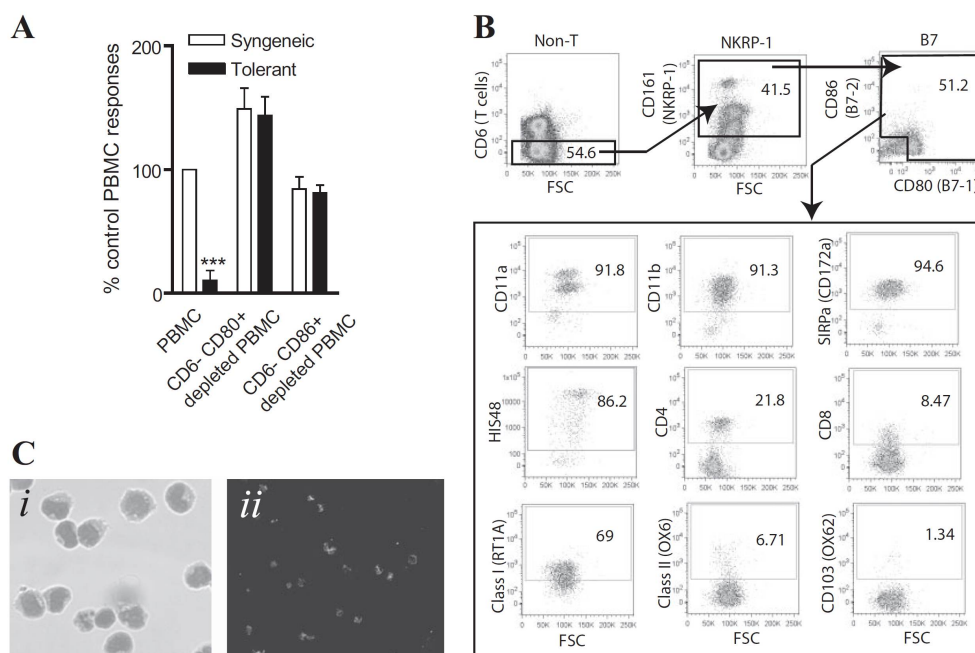


FIGURE 1. Characterization of non-T regulatory cells present in peripheral blood. *A*, Expression of CD80 and CD86. PBMC of the LEW.1A haplotype from syngeneic kidney graft recipients (open bars) or from tolerant kidney allograft recipients (3 mo posttransplantation; filled bars) were depleted of CD6 (pan-T marker)-negative/CD80⁺ cells, CD6-negative/CD86⁺ cells, or unmodified and stimulated with allogeneic LEW.1W APCs. [³H]thymidine incorporation was measured after 5 days. *B*, Phenotype analysis. PBMC from tolerant kidney allograft recipients (3 mo posttransplantation) were analyzed by flow cytometry. Cells were gated on CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells and analyzed for the indicated markers. The percentages of cells expressing each marker are indicated. *Ci*, May-Grünwald Giemsa staining on cytopins of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells sorted from PBMC from tolerant kidney allograft recipients (magnification $\times 63$). *Cii*, Immunofluorescence analysis of iNOS expressed by CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells sorted from PBMC from tolerant kidney allograft recipients (magnification $\times 40$).

Apotome module). Control sections were performed by replacing the primary Abs with dilution buffer. Naive kidneys were used as negative controls.

Western blot analysis

Cells extracts were prepared in RIPA buffer and quantified by BCA protein assay reagent (Pierce). Ten micrograms of total protein was resolved by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (ECL Hybond from GE Healthcare) using a Trans-Blot SD semidry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% skimmed milk for 2 h at room temperature and probed overnight at 4°C with 1 μ g/ml anti-iNOS (Abcam) or 0.1 μ g/ml β -actin (Santa Cruz Biotechnology) Abs and with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit Abs (Jackson Immuno-Research Laboratories) or HRP-conjugated donkey anti-mouse, respectively, diluted 1/2000 in washing buffer. After washing, membranes were revealed using enhanced chemiluminescence (ECL Western blot, GE Healthcare) and exposed to Kodak X-Omat LS x-ray films.

FACS analyses

Cells were incubated with Alexa 647-conjugated 3.2.3 mAb, PE-conjugated CD80 mAb, and biotinylated-conjugated CD86 mAb for 20 min at 4°C. Cells were then washed twice and incubated with streptavidin-PECy7 for 20 min at 4°C. After 15 min saturation, cells were stained for 20 min with FITC-conjugated mAbs directed against rat CD Ags. To finish, cells were stained with Alexa 700-conjugated R7-3 or CD6 mAb for 30 min at room temperature. Analyses were performed using a FACScan II cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software. The negative gates were set using fluorescence-minus-one controls. Apoptosis was assessed by staining with APC-conjugated annexin V (BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions. Evaluation of T cell proliferation by flow cytometry was performed by staining of pure T cells with 5 μ M CFSE (Molecular Probes) for 5 min at room temperature and measuring the FL-1 channel after cell culture.

Statistical analyses

Statistical significance was evaluated using a Mann-Whitney *U* test for the comparison of two groups. Graft survival was evaluated by Kaplan-Meier analysis using the log-rank test.

Results

Regulatory cell phenotype

We have previously demonstrated that administration of anti-CD28 Abs as an induction treatment results in immune tolerance to kidney allografts that is characterized by a hyporesponsiveness of recipient blood cells after challenge with donor alloantigens (4). In our earlier study, we identified a non-T cell population in the recipient blood that showed suppressive activity and was responsible for the inhibition of alloreactive T cells. These cells expressed NKRP-1, CD80, and/or CD86. Herein, we further characterize the phenotype of these cells. We first noticed that depletion of either CD80⁺ or CD86⁺ cells from the blood using magnetic beads totally restored the allogeneic proliferative response of PBMC against donor APC (Fig. 1A), suggesting that the regulatory cells in this model expressed CD80 and CD86. Next, we analyzed the phenotype of these cells after gating on non-T (CD6⁻), CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells and found them to express CD11a, CD11b, CD172a (SIRP α), and HIS48 (a rat marker usually associated with granulocytes (18)). Two subpopulations expressing high and intermediate levels of CD11a were observed. However, this variation in CD11a expression might have been induced by the isolation procedure (23). These cells additionally expressed class I (OX18) but not class II (OX6) or CD103 (OX62). Twenty-two percent of

these cells expressed CD4 and <10% expressed CD8 (Fig. 1*B*). None expressed CD40, CD90, CD25, CD62L, or HIS24 (data not shown). The absence of class II expression was confirmed by the fact that depletion of class II-positive cells using magnetic beads did not restore the alloreactivity of blood cells from the tolerant recipients (data not shown). After sorting by flow cytometry based on the CD6⁻CD80/86⁺NKRP-1⁺ phenotype, the cells were found to adhere to plastic culture plates during overnight culture (data not shown). They presented a homogeneous myeloid-like morphology with a large, irregularly shaped nucleus and a large cytoplasm containing inclusions (Fig. 1*Ci*). These cells were also found to express iNOS (Fig. 1*Cii*).

Suppression assays

Because depletion of non-T CD80/86⁺ cells from the blood of tolerant recipients restored the hyporesponsiveness of PBMC against alloantigens, we measured their suppressive activity after sorting. In mixed lymphocyte reactions these cells showed a robust dose-dependent suppressive activity on the proliferation of T cells stimulated by donor-derived APC (Fig. 2*A*, dotted bars). Moreover, these cells suppressed the proliferation of anti-CD3 + anti-CD28-stimulated T cells (Fig. 2*B*, open bars). As a control, non-T CD80/86-negative cells from the blood of the same animals displayed no suppressive activity (Fig. 2*B*, filled bars). The suppression was maximal 2 and 3 days after initiation of the culture and partial after 4 days (Fig. 2*C*). Cells with similar suppressive activity could also be isolated from the blood of control recipients of syngeneic grafts or of naive animals, although in the latter case fewer cells could be collected (see below for further details). The suppressive cells isolated from control-transplant recipients or from tolerant animals had the same suppressive activity on a per cell basis (Fig. 2*A*, striped and dotted bars, respectively). Cells with a phenotype comparable with the one observed in the blood (i.e., corresponding to the phenotype described in Fig. 1*B*) could also be detected in the spleen, lymph nodes, and bone marrow. These cells isolated from the bone marrow of tolerant recipients dose-dependently inhibited T cell activation down to a 1:10 ratio, as did similar cells from the blood. No such suppressive activity, however, could be measured after sorting from the spleen or lymph nodes (Fig. 2*D*).

Accumulation of MDSC in tolerant kidney graft recipients and function of MDSC in vivo

Given that MDSC from control and tolerant recipients had a similar suppressive activity on a per cell basis in the suppression assay (Fig. 2, *A* and *B*), we hypothesized that they might work in vivo as a result of their accumulation. We therefore compared the number of MDSC in the blood of tolerant allograft recipients to age-matched, syngeneic recipients and found a significant 2-fold accumulation in tolerant recipients (Fig. 2*E*). This increase in blood MDSC was not due to the tolerance induction regimen itself since the administration of anti-CD28 Abs to naive, nontransplant animals failed to result in their accumulation (data not shown).

To challenge the role of MDSC in vivo, we first tried to transfer tolerance with MDSC. However, the transfer of 2×10^6 MDSC isolated from the blood or the bone marrow did not significantly prolong kidney allograft survival (after the transfer of 2×10^6 MDSC in three recipients, kidney grafts survived 12, 14, and 16 days vs 11 days in untreated recipients). Transfers repeated on days 0, 3, and 6 were not more efficient. Additionally, the transfer of unsorted blood cells (25×10^6 cells) or spleen cells (200×10^6 cells) had no effect on allograft survival. However, using a previously described graft-vs-host disease-like system where CFSE-la-

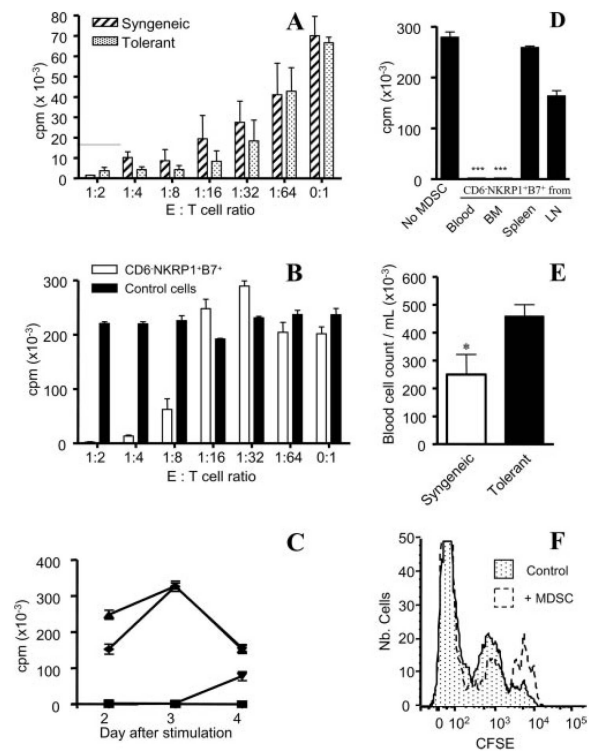


FIGURE 2. Suppressive activity of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ MDSC. *A*, Suppression of mixed lymphocyte reactions. Purified LEW.1A T cells were stimulated with allogeneic LEW.1W APCs in the presence of the indicated ratios of effector ("E") CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells from the blood of tolerant allograft recipients or of recipients of syngeneic grafts. Shown are means \pm SD of triplicate wells from one representative experiment out of six. *B*, Suppression of polyclonal stimulation. Purified LEW.1A T cells (10^5 cells/well) were stimulated with anti-CD3/CD28 in the presence of the indicated ratios of blood CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells or in the presence of control blood CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁻ cells from tolerant allograft recipients. [³H]thymidine incorporation was measured after 3 days. Shown are means \pm SD of triplicate wells from 1 representative experiment out of 10. *C*, Time-course of suppression. Same experiment as in *B*, performed at an E:T ratio of 1:4, where [³H]thymidine incorporation was measured after 2, 3, and 4 days. *D*, Immune compartments containing suppressive cells. Purified T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs in the presence of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ cells ($2 \cdot 10^4$) sorted from blood, bone marrow, spleen, and lymph nodes. [³H]thymidine incorporation was measured after 3 days. *E*, Accumulation of MDSC in the blood of tolerant recipients. Blood samples collected on heparin were cleared of erythrocytes by hypotonic lysis and stained with CD6-FITC, NKRP-1 Alexa Fluor 647, CD80-PE, and CD86-PECy7. Total numbers of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ MDSC were evaluated in tolerant kidney allograft recipients (filled bar, $n = 5$) and in age-matched syngeneic kidney graft recipients (open bar, $n = 5$), 100 days posttransplantation. Results are expressed as mean cell number/ml blood \pm SD. *, $p < 0.05$. Similar results were found in two other evaluations performed up to day 250 posttransplantation. *F*, In vivo inhibition of alloreactive T cell proliferation. CFSE-labeled spleen cells (150×10^6) were injected i.v. into irradiated allogeneic rat recipients. Half of the recipients additionally received 8×10^6 MDSC purified from blood. After 2.5 days, the relative abundance of CFSE^{high} and CFSE^{low} T cells was measured in the spleen by flow cytometry. Dotted histogram, controls; open histogram, coinjection of MDSC (one figure representative of two independent experiments).

beled T cells are infused into irradiated allogeneic recipients (21), we observed that coinjection of MDSC prevented the proliferation of allogeneic T cells in vivo (Fig. 2*F*).

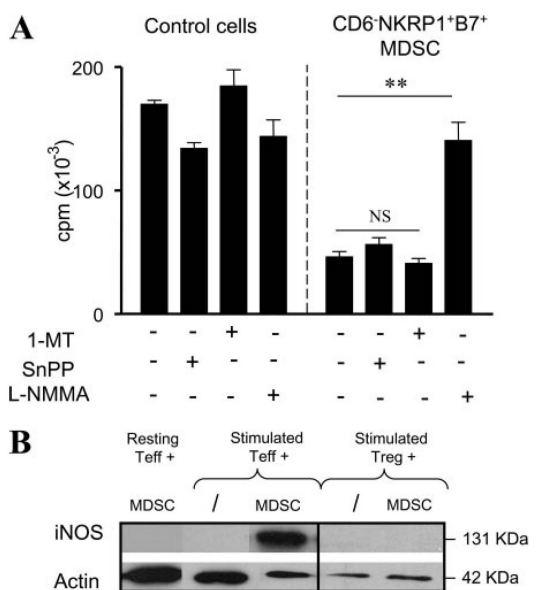


FIGURE 3. Mechanisms of action of CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ MDSC. **A**, Role of iNOS in the suppression. T cells from naive animals were stimulated with anti-CD3/CD28 Abs in the presence of a 1:3 E:T ratio of control CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁻ cells or CD6⁻NKRP-1⁺CD80/86⁺ MDSC extracted from the blood of tolerant kidney graft recipients, added to inhibit proliferation. Enzyme inhibitors were added to the cultures (L-NMMA, iNOS inhibitor; SnPP, HO-1 inhibitor; 1-MT, IDO inhibitor). Proliferation was measured after 3 days by [³H]thymidine incorporation. Data are mean cpm ± SD of one representative experiment out of three. **B**, Western blot analysis of iNOS expression. Cells were cultured as in **A** for 2 days. Whole protein (10 μg) from the indicated cultures were resolved on a 7.5% SDS-PAGE containing 10 mM DTT and blotted onto nitrocellulose filters. Membranes were hybridized with anti-iNOS and actin Abs plus secondary Ab and revealed by chemiluminescence.

Mechanisms of action

In the rat, high levels of NKRP-1 expression are characteristic of NK cells. Because NKRP-1 was expressed on non-T CD80/86⁺ cells, we tested whether direct cytotoxicity could be responsible for their suppressive action. Using target YAC-1 cells, we observed an absence of cytotoxic activity, whereas control cells with the non-T CD80/86-negative NKRP-1⁺ phenotype induced up to 60% cytotoxicity (data not shown), presumably because this cell population contained NKRP-1^{high} NK cells. Therefore, direct NK-like cytotoxicity is not involved in the suppressive mechanism of the non-T CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells. Because NO is known to be involved in several mechanisms of immunosuppression and because we detected iNOS expression by immunohistology (Fig. 1Cii), we next asked whether this enzyme also plays a role here. In suppression assays, a selective inhibitor of iNOS, L-NMMA (used at 5 mM), was able to reverse the suppression mediated by non-T CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells (Fig. 3A). The finding that CD11b/c⁺ cells suppress T cells via NO revealed that these cells had a phenotype and mechanism of action compatible with the definition of MDSC, as defined by Gabrilovitch et al. (12). Therefore, from this point on, the non-T CD80/86⁺NKRP-1⁺ cells are referred to as MDSC. We also noted that 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT, used at 200 μM), an inhibitor of IDO, as well as tin protoporphyrin (SnPP, used at 50 μM), an inhibitor of HO-1, were both unable to block the suppressive activity of MDSC against stimulated T lymphocytes (Fig. 3A). Because iNOS was implicated in the suppression

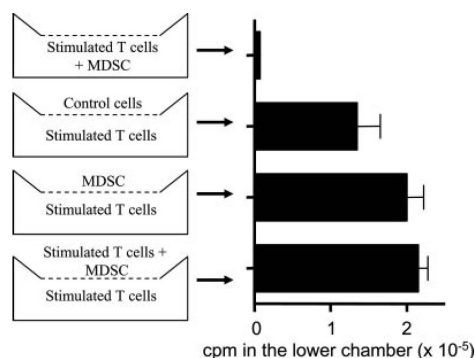


FIGURE 4. MDSC act in a contact-dependent manner. Transwell chambers were used to prevent direct cell contact between anti-CD3/CD28-stimulated T cells (6×10^5 cells from naive animals) and MDSC or control CD6⁻CD80/86⁻ cells (1.5×10^5 cells from the blood of tolerant kidney graft recipients). Proliferation was assessed in the lower chamber by [³H]thymidine incorporation after 3 days of culture. Data are mean cpm ± SD of triplicate wells in two independent experiments.

by MDSC, we further tested the level of iNOS expression by Western blot. iNOS was not expressed by freshly isolated blood MDSC, and resting and activated T cells expressed no or very little iNOS. Moreover, iNOS was not expressed when MDSC were mixed with resting T cells. In contrast, after contact between activated T cells and MDSC, iNOS was strongly up-regulated (Fig. 3B, left section). Similar experiments were performed using MDSC from the spleen and lymph nodes (cells that share a comparable phenotype were isolated from these compartments). In this case, however, no iNOS up-regulation was observed in any of the conditions tested (data not shown).

To determine whether cell contact between MDSC and target T cells was required for suppression, we performed transwell assays. Stimulated LEW.1A T cells were placed in the lower chamber with MDSC isolated from LEW.1A-tolerant kidney graft recipients in the upper chamber of the transwell. The physical separation abrogated the suppression, revealing a contact-dependent inhibition of the proliferative response (Fig. 4). Moreover, the physical separation from MDSC reduced the suppression even when the MDSC were mixed with other activated T cells, suggesting that activated T cells must be in contact with MDSC not only to elicit suppression but also to become sensitive to suppression (Fig. 4, lower bar). With the aim of identifying molecular interactions between MDSC and activated T cells that might be required for suppression, we tested several antagonistic Abs in the suppression assays. However, no modification of suppression could be obtained with Abs against CD80, CD86, CD80 + CD86 (tested at 10 μg/ml and at 50 μg/ml), class I, class II, CD11b/c, IFN-γ, CD172a, CD40, IL-4, or IL-10 (tested at 10 μg/ml; data not shown). To further understand how MDSC and NO blocked T cell proliferation, we analyzed their possible proapoptotic effect. Proliferation and apoptosis were measured using double staining with CFSE and annexin V after 2 days of culture. As shown in Fig. 5Ai, CFSE-labeled T cells proliferated after polyclonal stimulation and 40% of them were apoptotic. In the presence of MDSC, proliferation was minimal and 76.2% of the cells were found to be apoptotic. Thus, MDSC seem to affect the viability of stimulated T cells by blocking their proliferation and by inducing apoptosis in a contact-dependent manner. In similar assays, we also noticed that despite inhibiting T cell proliferation, MDSC only moderately prevented T cell activation after polyclonal stimulation, because ~60% of them

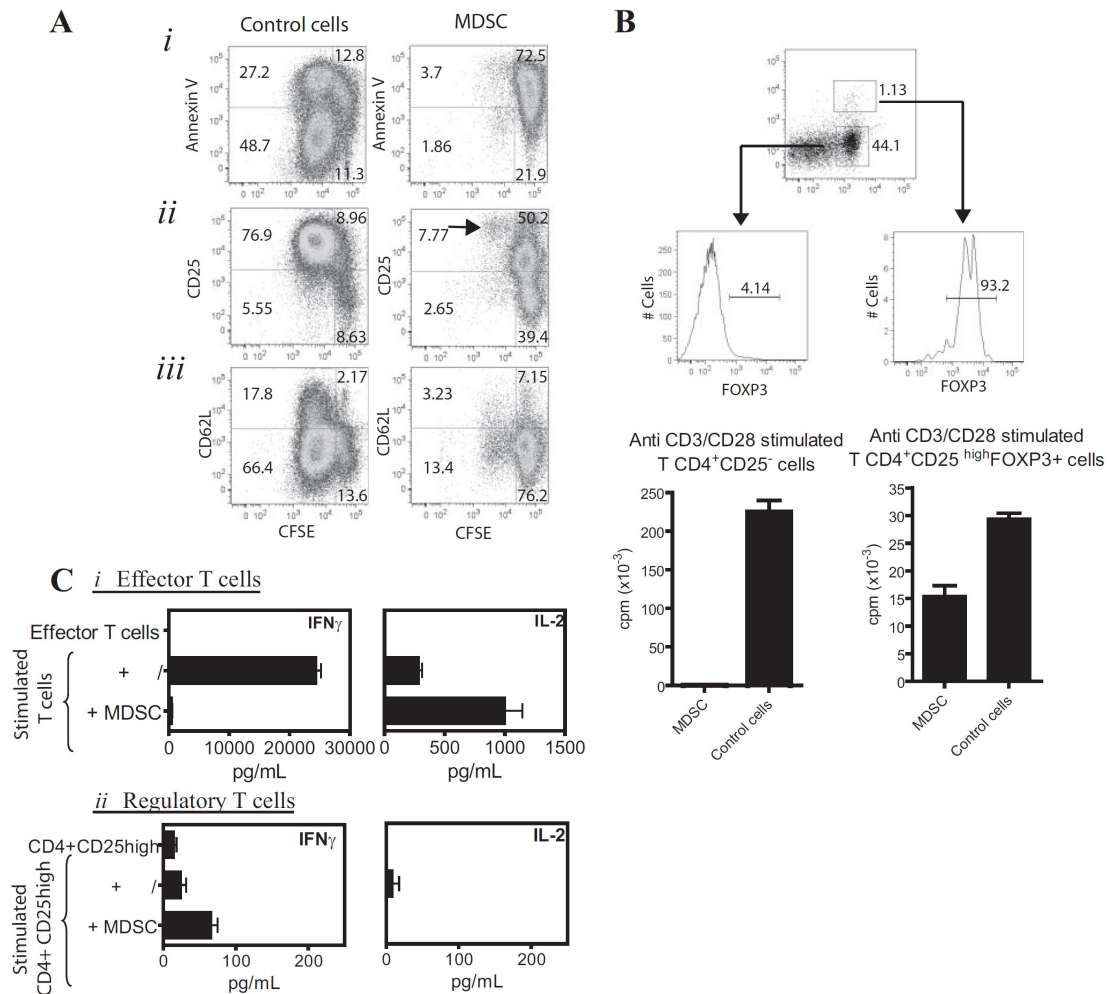


FIGURE 5. Effector function of MDSC. *A*, MDSC block proliferation but only moderately block activation of T lymphocytes. After coculture of anti-CD3/CD28-stimulated CFSE-labeled T cells with blood MDSC or control cells (CD6⁻CD80/86⁻) for 2 days, DAPI-negative cells were stained with annexin V (*i*), APC-conjugated CD25 (*ii*, arrow pointed on CD25^{high} cells), or APC-conjugated CD62L (*iii*) and analyzed by flow cytometry. In these analyses, a threshold for CFSE fluorescence was set at a value of 100 to exclude CFSE-negative cells from the evaluation. *B*, Differential effect of MDSC on regulatory vs effector T cell proliferation. Spleen T cells were sorted into Tregs and effector T cells according to their CD4⁺CD25^{high} (these cells were mostly FoxP3⁺) or CD4⁺CD25⁻ (FoxP3⁻) phenotypes. Each population was stimulated with anti-CD3/CD28 and cultured with or without MDSC (ratio of 5 target cells for 1 MDSC) for 3 days. Proliferation was measured after 3 days by incorporation of [³H]thymidine. Results are means \pm SD of triplicate wells and representative of two experiments. *C*, Differential effect of MDSC on cytokine synthesis by regulatory vs effector T cells. Same experiment as in *B*, where supernatants were collected after 48 h. *i*, CD4⁺CD25⁻ effector T cells. *ii*, CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. IFN- γ and IL-2 production was measured by ELISA. Results are means of triplicate measurements \pm SD from one experiment representative of four.

expressed CD25 and most had lost their expression of CD62L (Fig. 5, *Aii* and *Aiii*).

Differential effect on effector T cells and Tregs

According to the CFSE dilution assays after polyclonal activation, although MDSC blocked the proliferation of most CD25⁺ T cells, a subpopulation of CD25^{high} T cells escaped suppression (Fig. 5*Aii*, arrow), suggesting that CD25⁺ Tregs might not be sensitive to MDSC. To directly measure this effect, we sorted CD4⁺CD25⁻ effector and CD4⁺CD25^{high} regulatory cells (93% of the CD4⁺CD25^{high} cells expressed FoxP3 in this assay) and tested the action of MDSC on the proliferation of these cell subpopulations. Effector T cells proliferated strongly after 3 days, and their proliferation could be fully inhibited by MDSC. In contrast, MDSC

inhibited the proliferation of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Tregs by 50% only (Fig. 5*B*). The cytokines secreted by these two T cell populations were also differentially affected by MDSC: stimulated CD4⁺CD25⁻ effector T cells produced less IFN- γ in the presence of MDSC, an observation compatible with the inhibition of their proliferation. In contrast, IL-2 production by stimulated effector T cells was not abolished by MDSC but rather was enhanced (Fig. 5*Ci*). Again, this is compatible with the idea that T cell proliferation, but not activation, is blocked by MDSC (IL-2 would therefore be released and, since not consumed by T cells, accumulate in the medium). As previously described (24), stimulated CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Tregs produced very low quantities of IL-2 and produced some IFN- γ that was enhanced by the addition of MDSC (Fig. 5*Cii*).

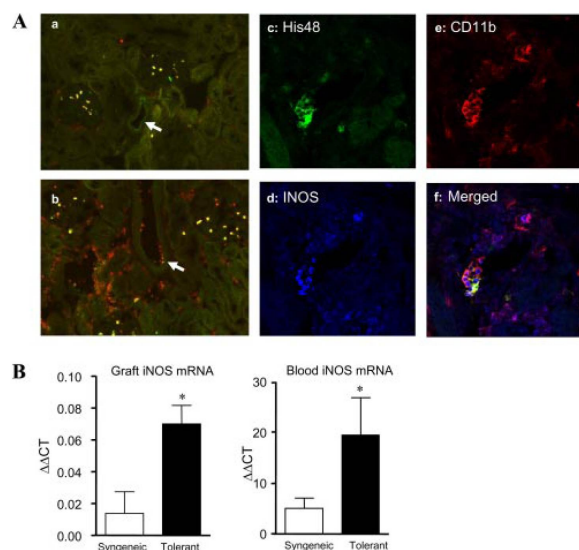


FIGURE 6. Graft infiltration and expression of iNOS. *A*, Immunohistological analysis of kidney grafts. Syngeneic grafts (*a*) and tolerated allografts (*b*) stained with CD11b (red fluorescence) and HIS48 (green fluorescence) Abs. Magnification $\times 10$. The arrows indicate blood vessel sections. *c-f*, tolerated kidney allograft, at a magnification of $\times 40$, focused on a blood vessel section, stained for HIS48 (*c*, green fluorescence), iNOS (*d*, blue fluorescence), CD11b (*e*, red fluorescence), and merged staining (*f*). *B*, Assessment of iNOS mRNA. The level of iNOS mRNA was analyzed by quantitative PCR in kidney grafts and blood from syngeneic or tolerant recipients 100 days after transplantation. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Graft infiltration and expression of iNOS

By immunohistology, we found CD11b⁺ cells in the glomeruli of control and tolerated grafts (Fig. 6, *Aa* and *Ab*). In the parenchyma, CD11b⁺ cells (Fig. 6*Ab*) synthesizing iNOS were found only in tolerated allografts (Fig. 6*Ae-f*). At higher magnification, CD11b⁺HIS48⁺iNOS⁺ cells could be detected in the parenchyma and associated with the blood vessel walls (Fig. 6, *Ab* and *Ac-f*). Moreover, a quantitative analysis of messenger RNA for iNOS revealed a significantly higher expression in tolerated grafts than in syngeneic grafts (Fig. 6*B*). Also, more iNOS mRNA was visible in the blood of tolerant recipients (Fig. 6*B*).

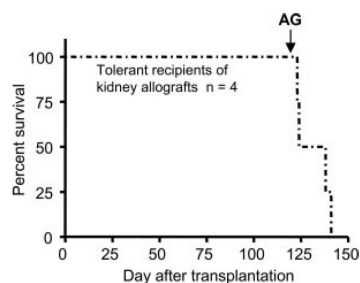


FIGURE 7. iNOS inhibition in vivo brakes tolerance. Four tolerant kidney allograft recipients (>120 days posttransplantation) received i.p. injections of 30 mg/kg of the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) every 12 h. Recipient survival is represented. Control rats also received aminoguanidine, and kidney function was recorded twice a week for 20 days. In these controls, kidney function was unmodified (uremia of 4 mmol/L and creatininemia of 18 μ mol/L).

Role of MDSC in transplant tolerance

Because the tolerated kidney grafts were infiltrated with CD11b cells expressing iNOS (Fig. 6*A*) and accumulated more iNOS mRNA (Fig. 6*B*), it is likely that in tolerant recipients, MDSC accumulate and localize in the graft. To challenge the hypothesis that tolerance was achieved as a result of the activity of the iNOS enzyme, we tested the effect of injection of aminoguanidine, an inhibitor of iNOS, on tolerance 120 days after kidney transplantation. The results showed that tolerant recipients rejected their graft within an average of 10 days after aminoguanidine injection (100 mg/kg i.p. twice daily; Fig. 7). A pathological examination of these grafts revealed that acute, cellular-mediated rejection was the origin of the graft failure. These data demonstrate that the maintenance phase of tolerance in this model requires an active synthesis of NO.

Discussion

Herein, we show that the rat model of anti-CD28 Ab-induced kidney allograft tolerance triggers the accumulation of plastic-adherent CD11b⁺ myeloid cells expressing CD80/86 that can be defined as MDSC. In vitro, these cells induced a contact-dependent apoptosis of activated effector T cells that themselves triggered the expression of iNOS by MDSC. MDSC had a limited effect on the proliferation of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ Tregs that failed to induce iNOS in MDSC. The action of NO production was critical to the immunosuppression mediated by MDSC and in maintaining the tolerant state in vivo.

It has become clear that transplant tolerance uses multiple cellular mechanisms that cooperate to suppress immunity, involving several types of regulatory T cells and tolerogenic DCs. Cooperation between different cell types might even be required to establish infectious tolerance to kidney allografts (5). In these situations, it is thought that CD152 up-regulated on Tregs interacts with CD80 on tolerogenic DCs in an Ag-cognate manner. On the one hand, this interaction results in the maintenance of Treg suppressive activity and, on the other hand, promotes a CD80-dependent (and IFN- γ -dependent) up-regulation of IDO, an enzyme that degrades the essential amino acid tryptophan (6). Tryptophan metabolites then suppress T cell responses as well as T cell clonal expansion. In vivo, CTLA-4/CD80 (and/or CD86) interactions have been shown to be required for tolerance after heart allotransplantation in mice (25), as well as IDO activity after heart allotransplantation in the rat (3). Tumors can also modulate immune responses by triggering an immune tolerance. In the latter case, although IDO induced by the action of local Tregs contributes to tumor-induced tolerance (26), the accumulation of MDSC appears to be a dominant mechanism in rodents as well as in man (10). The mechanism of action of MDSC typically involves the synthesis of NO (13) and/or the action of arginase 1 (27). Additionally, previous studies have suggested that mice Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC express CD80 and suppress immune responses to tumors by promoting IDO up-regulation after engagement of CTLA-4 expressed by infiltrating activated or regulatory T cells (16). Herein, we show that the MDSC that accumulate in kidney allograft tolerance also express CD80. However, in our hands, CD80-CD152 interactions were not essential factors for MDSC function in vitro, because anti-CD80 Abs had no effect on the system. Nevertheless, the removal of CD80⁺ cells as well as CD86⁺ cells from the MLRs restored proliferation, suggesting that MDSC do express both markers. In addition, MDSC-mediated suppression in vitro was IDO independent, because it was not reversed by the IDO inhibitor 1-MT. As a comparison, 1-MT was shown to reverse the suppression driven by tolerogenic DC and by CD11b⁻ monocytes

(4), which are different from the MDSC described here, in the same rat strain combination (5). Instead, *in vitro*, we found that the immunosuppressive activity of rat MDSC was solely controlled by NO. The fact that iNOS was detectable in isolated MDSC as well as in graft-infiltrating cells reinforces this idea. *In vivo*, the fact that injection of the iNOS inhibitor aminoguanidine induced the rejection of otherwise tolerated allografts also showed that the maintenance of the tolerant state was under the control of NO and not of IDO. In other tolerance models with the same rat strain combination, however, inducing rejection of tolerated allografts necessitated the administration of both IDO and iNOS inhibitors (28), indicating the possible coexistence of two mechanisms that cooperate to maintain transplant tolerance. Therefore, our data point toward a functional difference between mouse Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC that mediate suppression via NO and possibly IDO and the rat MDSC described herein that appear not to use the IDO pathway.

In mice, MDSC function is also dependent on IFN- γ (29). In our rat system *in vitro*, we did not find a critical role for this factor, because anti-IFN- γ Abs failed to modify the suppression of MDSC on anti-CD3 + anti-CD28-activated T lymphocytes. Because SIRP α is an inhibitory receptor that modulates macrophage and DC function (30) and because it was expressed by rat MDSC, it was possible that SIRP α -CD47 interactions reinforced the suppressive activity of MDSC. However, the suppression by MDSC was not reduced by anti-SIRP α Abs either. Preventing CD40-CD40L molecular interactions or the action of IL-4 and IL-10 cytokines was also inefficient. Thus, the interactions required for MDSC function in the rat require further exploration.

Our investigations suggest that the MDSC-mediated suppression lacks Ag specificity, because MDSC could regulate the proliferation of third-party APC-stimulated T cells as well as the proliferation of anti-CD3 + anti-CD28-stimulated T cells. Additionally, MHC class II expression was not detected by flow cytometry and depleting MHC class II⁺ cells from the blood did not prevent T cell unresponsiveness in the MLRs. Thus, it appears that MDSC do not interact with CD4⁺ T cells in a cognate manner. Therefore, the capacity of MDSC to generate suppressive signals when encountering activated T cells most likely serves to regulate immune responses during times of heightened immune activity, without Ag specificity. In transplantation, MDSC might have a regulatory function, in cooperation with other, Ag-specific, regulatory cells. Herein, the observation that inhibition of iNOS *in vivo* induced rejection suggests that NO-based suppression mechanisms are not dispensable.

An important issue was the location *in vivo* where a contact could occur between effector T cells and blood MDSC. We detected MDSC in the blood of tolerant recipients of kidney allografts. In the spleen and lymph nodes, cells were identified that had a comparable phenotype but were devoid of *ex vivo* suppressive activity. By immunohistology, infiltrating cells expressing CD11b, HIS48, and iNOS markers could be detected in tolerated allografts, in the parenchyma, as well as being associated with blood vessel walls (CD80 and CD86 could not be detected by immunohistology in the rat species because the Abs do not bind to fixed tissues). Although we were unable to prove that these cells have a suppressive activity *in situ*, this phenotype is compatible with the presence of MDSC within the graft. Additionally, messenger RNA for iNOS was found to be accumulated 4-fold in tolerated kidneys. It is therefore possible that blood MDSC suppress T cells inside the graft. This mechanism of action would then be similar to tumor-infiltrating MDSC. In this kidney transplant model, however, tolerance is clearly associated with the control, and not the elimination, of alloreactive T cells, because they can be detected in the

periphery several months after transplantation. Indeed, the simple removal of MDSC *in vitro* from blood cells collected on day 100 was sufficient to lift the suppression of lymphocyte alloreactivity, indicating that the Ag-specific lymphocytes had not been deleted in tolerant recipients. We have previously reported that donor-specific alloreactive T lymphocytes in the blood of tolerant recipients of kidney allografts expressed high rates of activation and apoptotic markers (4). This suggested that alloreactive T cells were continuously produced, presumably as a result of a thymic output, and kept under control by contact with MDSC, which as a result induced apoptosis not only in the graft but also in the blood. Herein, we confirmed *in vitro* that reactive T cells express activation markers (express CD25 and lose CD62L) and undergo apoptosis at a high rate in the presence of MDSC.

The question remains as to what extent MDSC participate to tolerance induction or maintenance *in vivo*. Although the direct evaluation of their role would be provided by an adoptive transfer of MDSC, correlated with tolerance, none of our trials including transfer of spleen cells, blood cells, blood MDSC, and bone marrow MDSC could induce tolerance. Instead, we found a slight, nonsignificant delay in the occurrence of rejection after transfer of blood or blood-derived MDSC. One reason might be that MDSC lose their suppressive activity after transfer, possibly as a result of differentiation. Another might be that NO could play a role in the maintenance phase but not in the induction phase of the tolerance that might be under the control of other mechanisms such as IDO, as previously shown in transplantation trials in the same rat strain combination (3, 28).

A challenging observation was that MDSC were also present in recipients of isografts as well as in naive animals. MDSC from control animals appeared to have a similar activity to those from tolerant recipients on a per cell basis. Therefore, the only difference was the increase in numbers of these cells in tolerant recipients. These features characterize MDSC as natural modulators of immune reactivity, mobilized by tumors, but also by tolerated allografts, to establish or reinforce tolerance. This view is strengthened by the recent observation that genetic inactivation of CD11b abolishes oral tolerance without compromising APC maturation or Ag-specific immune activation (31), establishing a specific role of CD11b⁺ cells in oral tolerance induction.

A novel finding was that MDSC do express iNOS upon contact with activated T cells, but not upon contact with activated Tregs. Moreover, MDSC block the expansion of effector T cells and, to a lesser extent, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs. The fact that MDSC spare Tregs directly reinforces the suggestion by Yang et al. (16) that MDSC might mediate suppression at least in part via Tregs. However, in our study MDSC suppressed the proliferation of stimulated CD4⁺CD25⁻ T lymphocytes to the same extent as unsorted T cells, clearly showing that the presence of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tregs is not required, at least *in vitro*, for MDSC-mediated suppression.

In summary, our studies show a significant accumulation of MDSC in a rat model of kidney transplant tolerance. These cells have a nonspecific immunosuppressive activity *in vivo* and *in vitro*, involving the action of iNOS, which is up-regulated after contact with activated effector T cells but not with Tregs. These data illustrate a novel immunoregulatory mechanism associated with transplant tolerance.

Acknowledgments

We are grateful to S. Brouard, R. Josien, and J. Ashton-Chess for critically reading the manuscript, and we thank P. Hulin and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale-IFR26 confocal microscopy platform.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Pirenne, J., H. Kitade, M. Kawai, T. Koshiba, B. Van Damme, C. Mathieu, and M. Waer. 2005. Regulatory cells, TH1/TH2 imbalance, and Ab-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 79: S25–S27.
- Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soullillou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2: 745–757.
- Guillonnet, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, et al. 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RC^{low} T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 1096–1106.
- Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Aneon, M. Heslan, R. Josien, et al. 2005. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant.* 5: 2339–2348.
- Degaue, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, et al. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J. Immunol.* 176: 3915–3922.
- Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.
- Chauveau, C., S. Remy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, M. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, et al. 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106: 1694–1702.
- Tzachanis, D., A. Berezovskaya, L. M. Nadler, and V. A. Boussiotis. 2002. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 99: 1465–1473.
- Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, et al. 2001. Requirement for natural killer (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2577–2581.
- Serafini, P., C. De Santo, I. Marigo, S. Cingarlini, L. Dolcetti, G. Gallina, P. Zanovello, and V. Bronte. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 64–72.
- Bohe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard, and R. Huchet. 1999. Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. *Blood* 94: 1028–1037.
- Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67: 425–426.
- Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello, and D. M. Segal. 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J. Immunol.* 168: 689–695.
- Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J. Immunol.* 160: 5729–5734.
- Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A. M. Cayota. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* 162: 3356–3366.
- Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. Yutzy, IV, K. F. Roby, and R. B. Roden. 2006. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1⁺CD11b⁺ myeloid cells. *Cancer Res.* 66: 6807–6815.
- Garrity, T., R. Pandit, M. A. Wright, J. Benefield, S. Keni, and M. R. Young. 1997. Increased presence of CD34⁺ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int. J. Cancer* 73: 663–669.
- Prins, R. M., G. P. Scott, R. E. Merchant, and M. R. Graf. 2002. Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma: II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother.* 51: 190–199.
- Soullillou, J. P., C. B. Carpenter, A. J. d'Apice, and T. B. Strom. 1976. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J. Exp. Med.* 143: 405–421.
- Dengler, T. J., G. Szabo, B. Sido, W. Nottmeyer, R. Zimmerman, C. F. Vahl, T. Hunig, and S. C. Meuer. 1999. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 67: 392–398.
- Haspot, F., F. Villemain, G. Laflamme, F. Coulon, D. Olive, J. Tiollier, J. P. Soullillou, and B. Vanhove. 2002. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 99: 2228–2234.
- Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol.* 169: 2284–2291.
- Stent, G., L. Irving, S. Lewin, and S. M. Crowe. 1995. The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 366–376.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519–6523.
- Tsai, M. K., H. N. Ho, H. F. Chien, P. Ou-Yang, C. J. Lee, and P. H. Lee. 2004. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 77: 48–54.
- Munn, D. H., and A. L. Mellor. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117: 1147–1154.
- Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, et al. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 170: 270–278.
- Guillot, C., S. Menoret, C. Guillonnet, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Aneon. 2003. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4lg. *Blood* 101: 3325–3333.
- Kusmartsev, S. A., Y. Li, and S. H. Chen. 2000. Gr-1⁺ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J. Immunol.* 165: 779–785.
- Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, et al. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein- α : down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J. Immunol.* 167: 2547–2554.
- Ehreichou, D., Y. Xiong, G. Xu, W. Chen, Y. Shi, and L. Zhang. 2007. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J. Exp. Med.* 204: 1519–1524.
- Taylor, S. R., D. R. Alexander, J. C. Cooper, C. F. Higgins, and J. I. Elliott. 2007. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J. Immunol.* 178: 3474–3482.

II- Annexe II

Déplétion des sous-populations de lymphocytes T en transplantation d'organe.

Thomas Haudebourg, Nicolas Poirier, et Bernard Vanhove.

Article publié dans *Transplant International* 22 : 509–518 (2009).

Titre original : *Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation.*

REVIEW

Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation

Thomas Haudebourg, Nicolas Poirier and Bernard Vanhove

INSERM, U643; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Keywords

alloreactivity, homeostasis, T-cell depletion, tolerance, Treg cells.

Correspondence

Dr Bernard Vanhove, ITERT, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France. Tel.: 33 (0) 240 08 74 17; fax: 33 (0) 240 08 74 11; e-mail: bernard.vanhove@univ-nantes.fr

Received: 8 September 2008

Accepted: 30 September 2008

doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00788.x

Summary

T-cell depletion strategies are an efficient therapy for the treatment of acute rejection after organ transplantation and have been successfully used as induction regimens. Although eliminating whole T cells blocks alloreactivity, this therapy challenges the development of regulatory mechanisms because it depletes regulatory cells and modifies the profile of T cells after homeostatic repopulation. Targeting T-cell subpopulations or selectively activated T cells, without modifying Treg cells, could constitute a pro-tolerogenic approach. However, the perfect molecular target that would be totally specific probably still needs to be identified. In this study, we have reviewed the biological activities of broad or specific T-cell depletion strategies as these contribute to the induction of regulatory cells and tolerance in organ transplantation.

Given that allograft rejection is mainly a T-lymphocyte-mediated process, the depletion of recipient T lymphocytes has been an obvious approach to counteract acute rejection in rodents, in nonhuman primate trials and in humans. However, total T-cell depletion might not be favorable for the induction of immunologic tolerance. Hereunder, we have reviewed certain aspects of the depletion of T cells and their subpopulations defined by the expression of target antigens, with a special focus on the induction of regulatory mechanisms in experimental organ transplantation (summarized in Table 1).

Mechanisms of action of depleting antibodies

The dominant parameters influencing the cytotoxicity of antibodies include the isotype and affinity of the antibody, the surface antigenic density and the antigen modulation or internalization of the antigen-antibody complex. The latter can lead to a reduction in the ability of the antibody to produce cell death [1]. The expression of complement regulatory proteins by the target cell [2] is also of considerable significance. In most cases, complement-dependent cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity are believed to represent the dominant mechanisms of action of the unconjugated Mab, although the induction of apoptosis or cell-cycle

arrest could also be highly relevant in other cases [3,4]. Therapeutic antibodies use a combination of these mechanisms to deplete target cells [5]. As regards organ transplantation, whatever the mechanism, it appears that the therapeutic effect not only relates to the efficacy of the depletion but also to the immune reactivity of residual cells that might expand and either contribute to tolerance or to rejection.

T-cell reconstitution and homeostatic proliferation

Given that thymic function declines every year after adolescence, naive T-cell reconstitution is impaired after severe lymphopenia. However, T lymphocytes that previously escaped depletion undergo a homeostatic proliferation to fill free 'space' (for review [6]). This process is under control of interleukin (IL)-7, IL-15 and IL-21 cytokines (for review [7]). IL-15 is released in large quantities after severe depletion of T cells. IL-15 and IL-21 have little impact on naive T-cell proliferation but are important for memory CD8 T-cell function, expansion and survival. Independently of cytokines, post-transplant exposure to alloantigens also contributes to the expansion of memory CD4 and CD8 T cells and to the modification of naive T cells that acquire an effector-memory 'like' phenotype. These cells progressively lose CD62L expression, overex-

Table 1. Antibody-mediated T-cell depletion and transplantation outcomes.

Molecular target/reagent	Mechanism of action	Impact on transplant tolerance
Whole T cells		
Thymocyte (ATG)	Rapid and profound lymphopenia CDC/ADCC/opsonization/phagocytose	Expansion of Treg in human kidney allografts [16]
CD52 (Campath-1)	Cytotoxicity	Expansion Treg and shift from myloid to regulatory plasmacytoid DC in human kidney allografts [24,29]
CD3	Complement activation/ADCC/apoptosis	Inhibition of acute but not humoral rejection [33]. High frequency of CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg in kidney NHP allografts [34,35]. Tolerance to heart but not to skin grafts in rodents [30]
CD2	Transient but profound T-cell depletion Inhibition of mitogenic and allogenic responses	Long-term survival of heart grafts in rodents [36] Prolonged kidney allograft survival in NHP [37] High level of FoxP3 mRNA in human kidney allografts [39]
TCR $\alpha\beta$	Transient T-cell depletion	Tolerance in rodents [40]
T-cell subpopulations		
CD4	Profound CD4 T-cell depletion	Tolerance to heart, skin and islet grafts in rodents [41–43,50] No tolerance; modest prolongation in kidney and liver models (mice, dog and NHP) [46–49] Prolongation of pancreas and xeno islet grafts in rodents [51–53]
CD8	Transient but profound CD8 T-cell depletion of donor-specific memory CD8 T cells	No effect on heart grafts in miniature swine and mice [60–62] Moderate prolongation if kidney graft survival in dogs [47] Nondonor-specific tolerance in a small bowel allograft model in mice [8] Tolerance with low dose total body irradiation, thymic irradiation, antithymocyte globulin, anti-CD154 antibody and a brief course of calcineurin inhibitor plus donor bone marrow transplantation in kidney transplantation in primates [59]
CD28	Apoptosis induced cell death	Prevention of graft-versus-host disease [67]
T-cell activation markers		
CD154 (Hu5C8)	Apoptosis of activated T cells	Tolerance possible to kidney grafts in primates and skin grafts in mice [75,76]
LAG-3	Complement dependant cell cytotoxicity	Prolongation of heart graft survival in the rat but prevention of tolerance [78]
IL-2/CD25 (PC61/immunotoxin)	Depletion/immunotoxicity	Prevention of tolerance to heart and liver allografts in mice [84]
CD45 (MB23G2/6G3)	Enrichment in CD45RBlow T cells	Tolerance to kidney allografts in mice [93] Prolongation of survival and tolerance with rapamycin in heart transplantation in mice [91] Prolongs kidney graft survival in primates [98]

press CD44 and are less sensitive to CD28 costimulation. Their cytotoxic activity, proliferative capacities and cytokine production are also enhanced. In contrast with activated T cells, effector-memory-like T cells do not overexpress the CD25 and CD69 activation markers (for review [8]). Therefore, memory T cells disproportionately expand after severe lymphodepletion and become the dominant cell type in humans [9] or experimental models [10]. In the case of rodents, homeostatic proliferation and

memory 'like' phenotype are responsible for a resistance to tolerance induction after severe lymphodepletion. In addition, regulatory T cells (Tregs) are depleted as efficiently as naive T cells by current depleting strategies, but might be less suitable for homeostatic proliferation than memory T cells [8]. As predicted, the predominant T-cell type that is present after antibody-mediated T-cell depletion in humans is an activated memory-like T cell. Patients induced with depleting agents without mainte-

nance immunosuppression experienced rejection within 1 month despite 97% T-cell depletion and essentially as a result of the action of residual activated memory-like T cells that predominated peripherally as well as in the allograft during rejection [11]. Thus, the homeostatic proliferation that follows lymphodepletion might hinder the development of transplant tolerance. As described hereafter, regulatory cells can, however, equally expand in the repletion phase after massive T-cell depletion with a possible beneficial effect that needs to be evaluated.

Targeting all T cells

Anti-lymphocyte globulins

The first antibody preparation used since the 1960s is polyclonal anti-thymocyte globulin (ATG, rabbit and horse). ATG induces a rapid and profound lymphocytopenia classically attributed to complement-dependent cytolysis, cell-mediated antibody-dependent cytolysis, opsonization and subsequent phagocytosis by macrophages. In addition, ATG generates various transduction signals to the target cells which interfere with activation signals and can trigger an activation-induced cell death phenomenon [12]. After MOG immunization in the murine model EAE, ATG treatment depleted effector T cells, enhanced the expansion of MOG-specific Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) and skewed an auto-antigen-specific immune reaction from a pathogenic T-cell response to a potentially protective T-reg response. Therefore the therapeutic effects of ATG may not only occur because of lymphocyte depletion but also because of the enhanced Treg cell number and function [13]. Equally *in vitro*, rabbit ATG can induce the expansion of functional Treg by converting CD4⁺CD25⁻ T cells through transcriptional enhancement of NFAT1 expression, in turn conferring FOXP3 expression and regulatory activity [14,15]. However, no study in kidney transplantation is available to show tolerance in nonhuman primates or humans following administration of ATG, with the exception of the studies that combined ATG with total lymphoid irradiation and hematopoietic stem-cell transplantation [16]. In clinical practice, outcomes after ATG treatment in kidney transplantation are not different from the use of nondepleting induction treatments such as anti-CD25 monoclonal antibodies, suggesting no clear benefit in terms of a potential pro-tolerogenic effect of ATG [17].

Anti-CD52 (Campath-1)

The CD52 antigen is highly expressed on lymphocytes, monocytes and eosinophils. CAMPATH-1 (alemtuzumab) is a strongly cytotoxic anti-CD52 Mab that has been used to treat lymphoid malignancies for many years [18]. It

has also been used for the treatment of several autoimmune diseases such as arthritis, MS, vasculitis, autoimmune cytopenias, etc., and as part of the preparative regimes for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [19]. This antibody has been used in kidney transplantation with low dose cyclosporine A (CsA) monotherapy in the hope of establishing 'prope' or near tolerance [20]. However, there has been no long-term, prospective, randomized study to date that has determined the optimal immunosuppressive regimen to be used with Campath-1. The differing surface expression of CD52 on T-cell subtypes suggests that complement and noncomplement-mediated mechanisms of cytotoxicity by Campath-1 might not equally mediate the killing of all T-cell subtypes *in vivo*. The phenotypic transformation of CD52-positive to CD52-negative T cells can also modulate the action of anti-CD52 cytotoxic antibodies [21]. Although the precise role of CD52 is still unknown, it does not play an essential co-stimulatory role in normal T-cell activation. When cross-linked, anti-CD52 Mabs can transduce an activation signal in resting T cells in a calcineurin-dependent manner [22]. Recently, it has been demonstrated that CD52 signaling by Campath-1 also induces Treg cells that could be expanded by culture with IL-2 and is able to reverse the xenogeneic graft-versus-host disease reactions in SCID mice caused by human PBMC [23]. An increase in FOXP3⁺ Tregs in Campath-1 treated kidney transplant patients was indeed observed, which was not fully explained by their homeostatic proliferation in the repletion phase, increased thymic output, or Treg-sparing, suggesting a *de novo* generation/expansion [24]. In Campath-1-depleted kidney transplant recipients that received a reduced dose of mycophenolate mofetil and tacrolimus, there was additionally reported to be a repopulation by immunosenescent T cells of the CD28⁻CD8⁺ phenotype. These cells suppressed the proliferation of CD4⁺ T cells *ex vivo*. As a result, expanded CD28⁻CD8⁺ T cells might compete for 'immune space' with CD4⁺ T cells, suppressing their proliferation and therefore delaying CD4⁺ T-cell recovery [25]. The depletion of effector cells, direct interference with T-cell signaling and upregulation of Treg cells might not account for all the mechanisms of action of anti-CD52 antibodies. An induction with Campath-1 in kidney transplant recipients also caused a sizeable and sustained reduction in the total number of peripheral DC and a significant shift from myeloid to immunoregulatory plasmacytoid DC subsets as early as 1 month post-transplantation [26].

Anti-CD3

After binding to target T cells, anti-CD3 Mab induce only 20–50% T-cell depletion, depending not only on comple-

ment activation and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) but also on the induction of apoptosis through direct signal transduction, independently of the Fc part of the antibody. *In vitro*, it has been established that activated T cells preferentially undergo apoptosis whereas resting T cells are resistant to the action of the original mouse OKT3 antibody or of humanized anti-CD3 antibodies [27,28]. Other target cells that are not depleted *in vivo* lose their CD3 expression as a result of antigen down-modulation [29]. Initially recognized as a nonspecific immunosuppressant, for many years anti-CD3 antibodies have demonstrated their capacity to induce tolerance to heart grafts but not to skin grafts in rodents [30]. That regulatory cells arise after anti-CD3 administration has been shown in a NOD mouse model of spontaneous diabetes, where regulatory CD4⁺CD25⁺CD62L⁺ T cells producing high levels of TGF- β increased in number and were able to transfer protection to diabetes [31]. The reason for this might be that anti-CD3 Mabs mimic altered peptide ligands, which can also induce tolerance [32]. Depletion by anti-CD3 antibodies in the kidney grafts of monkeys inhibited the acute cellular but not the humoral rejection [33]. Although a correlation with longer survival could not be proven in primates, the use of anti-CD3 antibodies nevertheless induced a high frequency of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells [34,35].

Other pan-T targets (TCR $\alpha\beta$, CD2, CD45, CD7...)

Targeting CD2 with depleting antibodies resulted in long-term survival in rat cardiac allograft recipients by inducing a transient but profound T-cell depletion and local immunoregulatory mechanisms that are seemingly involved in maintaining long-term graft acceptance [36]. In primates, a rat anti-CD2 Mab inhibiting mitogenic and allogeneic responses *in vitro* provided a rapid peripheral T-cell depletion and slightly prolonged renal allograft survival [37]. Recent insight into patients receiving non-myeloablative haploidentical hematopoietic cell transplantation treated with CD2 antibodies pointed to an expansion of the CD4⁺CTLA4⁺FoxP3⁺ Treg cell compartment [38]. In fact, there were high levels of FOXP3 mRNA in a small cohort of kidney transplant recipients from HLA single-haplotype mismatched donors who received CD2 antibody combined with bone marrow transplantation. In these patients, it was possible to discontinue all immunosuppressive therapy 9–14 months after the transplantation and renal function remained stable for many years [39]. T-cell depletion induced by targeting TCR $\alpha\beta$ [40] in rat heart transplantation also resulted in similar graft acceptance, suggesting that T-cell depletion *per se* is important rather than the specificity of the molecular target.

Targeting T-cell subpopulations

CD4

As helper CD4 T lymphocytes orchestrate humoral and cellular responses, their depletion using anti-CD4 antibodies appeared to be the best strategy to achieve tolerance to heart [41] or skin allografts in mice [42] and rats [43], alone or in combination with pretransplant intrathymic donor-specific transfusion [44,45]. The depletion of CD4 positive T cells in kidney allotransplantation was less effective: in rats [46], dogs [47] or in monkeys [48], the prolongation of survival was modest and tolerance could not be attained. Similar results were obtained for liver allotransplantation in rats [49]. However, tolerance was achieved in rodents by depleting CD4 helper T cells in islet allotransplantation [50], pancreas allotransplantation and islet xenotransplantation [51–53]. Furthermore, depleting anti-CD4 antibodies cured new-onset diabetes, prevented recurrent autoimmune diabetes, and delayed islet allograft rejection in NOD mice [54]. Therefore, organ specificity is seemingly important and strain specificities in mice is equally a factor of importance [53]. Interestingly, the humoral response to alloantigens that occurred after CD4 depletion in heart allotransplantation was modified from the formation of IgG to IgM alloantibodies only [55]. This might be related to the observation that CD4⁺ T-cell depletion prevented the development of chronic allograft vasculopathy (CAV) in mice [56]. Finally, whereas depletion of natural Tregs (CD4 CD25^{high}) by anti-CD4 antibodies was considered as a major problem, Yi *et al.* [57] published recently that depleting CD4 antibodies depletes Tregs but not as efficiently as CD4⁺CD25⁻ cells, resulting in an enhanced peripheral CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ ratio and thus promoting tolerance.

CD8

Cytotoxic CD8 T lymphocytes with a memory phenotype (CD45RO⁺CD45RA⁻CD25⁻) are highly aggressive towards allografts [58] and resistant to immune regulation [59]. Therefore it appeared useful to specifically deplete these cells in transplantation. Surprisingly, however, the depletion of cytotoxic T cells by CD8 antibodies was not efficient to prevent or treat acute rejection in miniature swine [60], dogs [47] or mice [51,61]. Albeit protective against rejection, the depletion of murine CD8 T cells modifies intragraft cytokine production from Th1 to Th2 and enhances eosinophil, large mononuclear cell and fibroblast-like cell infiltration [61]. In miniature swine, even though the depletion of CD8 T cells did not significantly prolong graft survival in combination with CsA, an inhibition of intimal proliferation in these grafts

was observed, suggesting that the depletion of CD8 T cells could protect from CAV [60]. However, the depletion of CD8 T cells had no effect on CAV in rats [62] and counter-productively increased the severity of rejection of liver allotransplants [49]. In a human pilot study, the depletion of CD8 T cells completely reversed acute rejection in two patients and delayed rejection or was ineffective in four others [63]. In contrast, the depletion of CD8⁺ T cells induced a nondonor-specific tolerance [8] in the context of small bowel transplantation in mice, suggesting that CD8 T cells indeed play a greater role in the rejection of intestinal transplants. More recently, it has been described that depletion of memory T cells by anti-CD8 antibodies in combination with a low dose of total body irradiation, thymic irradiation, ATG, anti-CD154 antibody, a brief course of calcineurin inhibitor plus donor bone marrow transplantation, could induce tolerance of a previously transplanted kidney allograft in the nonhuman primate. In this model, the depletion of CD8⁺ T cells was necessary to achieve tolerance [59].

CD28

CD28 is constitutively expressed on most CD4⁺ T cells and on 50% of CD8⁺ T cells. Although most anti-CD28 antibodies have been used either to stimulate [64] or to antagonize [65] T cells, certain antibodies can induce target-cell depletion. In fact, although a physiological role of CD28 is to upregulate anti-apoptotic genes in T lymphocytes after antigenic challenge, strong CD28 signaling can also lead to T-cell apoptosis. This is borne out by the observation that CD28 null human T cells manifest resistance to apoptosis in patients with arthritis or sclerosis [66]. Yu *et al.* have looked at the effect of an agonist anti-CD28 antibody (clone 37.51) in mice and found that it surprisingly inhibited donor T-cell expansion. They also found that the effect prevented graft-versus-host disease by selectively depleting alloantigen-activated donor T cells through apoptosis, in an IFN- γ -dependent manner, but spared the T cells that did not recognize recipient alloantigens [67]. One drawback to eliminating CD28⁺ T cells might be the blockade of immune regulation as CD28 is expressed by a subset of Treg cells and is paramount in their expansion and function [68]. However, certain regulatory cells are controlled by ICOS and not by CD28 [69] and another subset of Tregs, the CD8⁺CD28⁻ cells, can function independently of CD28 [70,71]. Therefore, CD28⁺ T-cell depletion might still favor or at least spare the subsequent development of Treg cell subsets. In contrast with rodents and primates, agonist anti-CD28 antibodies cannot be used in humans because they caused a massive cytokine storm and a multiorgan failure in six healthy human volunteers in a phase I study [72]. One

hypothesis that could explain the different reactivity of human T cells towards stimulation by agonist anti-CD28 antibodies is the differential expression of molecules of the Siglec family that carry ITIMs motifs in the intracytoplasmic domain and actively dephosphorylate tyrosine residues in other signaling molecules. Rodents and monkey T cells express various members of these molecules whereas they are barely detectable in man. The signaling threshold required to activate the intracellular machinery in humans therefore appears much lower and more sensitive to the CD28 signaling [73].

Targeting T-cell activation markers

The selective depletion of activated T lymphocytes as an immunosuppressive induction treatment may result in the development of regulatory cells able to support the long-term survival of allogeneic organs. The proof of concept has been obtained in mice engineered such that their T cells express a viral thymidine kinase suicide gene metabolizing the nontoxic prodrug ganciclovir into a metabolite that is toxic only to dividing cells. After transplantation, this approach therefore depleted alloreactive dividing T cells. The result was a significant delay in the rejection of skin and heart grafts and the induction of an immune tolerance in a fraction of the recipient mice [74]. The therapeutic translation of this strategy requires the targeting of an antigen that would be highly specific for activated T cells. So far, the perfect target is still to be ascertained.

CD154 (CD40Ligand)

CD40 ligand is a co-stimulatory molecule member of the TNF family of membrane receptors expressed mainly on activated CD4⁺ T lymphocytes. It is also expressed at different levels by mast cells, macrophages, basophils, NK cells, B lymphocytes, as well as nonhematopoietic cells. CD40 ligand binds to CD40 on antigen-presenting cells (APC) and induces APC activation. It also regulates B-cell function by engaging CD40 on the B-cell surface and is expressed by resting platelets in a cryptic way and is rapidly exposed after stimulation. In fact, platelets account for over 95% of the CD40L molecules in the blood. This molecule serves as a receptor for the integrin α IIB β 3 also expressed on stimulates platelets. CD40L/ α IIB β 3 interactions are involved in the stabilization of arterial thrombi. The significance of this interaction was underscored by the observation that administration of a humanized CD154 antibody in patients induced thrombosis, an adverse event which halted pending additional clinical evaluation. In addition, thrombotic troubles were found in four animals out of nine treated with anti-CD154

antibodies (5C8.33) [75] in a primate kidney graft model that involved a protocol including nonmyeloablative total body irradiation, thymic irradiation, anti-thymocyte globulin, donor bone marrow infusion and a 1-month course of CsA. The administration of heparin, however, could reduce the incidence of thromboembolic complications. Experiments showing that short courses of CD40L antibody therapy could achieve long-term graft survival in mice and primates [76,77] have been initially interpreted as an effect of the co-stimulation blockade. However, Monk *et al.* [76] showed that much of the efficacy of anti-CD40L therapy derives not from a co-stimulation blockade, but from the destruction of activated T cells. The outcome is a selective purging of potentially aggressive T cells that have experienced antigen. Anti-CD40L also seems to spare Tregs that, although expressing CD40L, might expose fewer antigens or have an enhanced function after CD40L blockade [20].

CD223 (lymphocyte activated gene-3)

Lymphocyte activated gene-3 (LAG-3) is expressed in activated CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes residing in inflamed secondary lymphoid organs or tissues, such as human tumors, but not in the spleen, thymus or blood. It is also expressed by graft infiltrating lymphocytes in acutely rejected hearts allografts [78]. LAG-3 is a negative regulator of activated human CD4 and CD8 T cells inhibiting early events in primary activation [79]. Although expressing high levels of LAG-3 mRNA, unstimulated murine CD4⁺CD25⁺ T reg cells, do not express LAG-3 protein on their cell surfaces. However, they do so after activation [80]. Complement-activating anti-LAG-3 polyclonal antibodies have been used in a model of rat cardiac allotransplantation and induced a specific depletion of activated LAG-3⁺ T cells without modification of the whole T-cell count. The treatment could reverse an ongoing acute rejection and prolonged graft survival from 5 days in controls to a median of 30 days [78]. However, the same treatment prevented the development of the tolerance otherwise induced by pretransplant donor blood transfusions. Strikingly, it also induced the rejection of tolerated heart allografts 100 days after tolerance induction, by depleting Treg cells [78]. Therefore anti-LAG-3 antibodies can be used to treat acute rejection but do not promote graft acceptance, where Treg cells are instrumental.

IL-2R α /CD25

The IL-2 receptor is composed of three proteins: the α , β and γ chains, the first being the CD25 antigen. CD25 is not expressed on normal or unstimulated lymphocytes,

but it is rapidly transcribed and expressed on activated T cells [81]. The administration of anti-CD25 antibodies in rodents synergized with subtherapeutic administration of Cyclosporine to induce tolerance to pancreatic islet allografts [82]. Tolerance could be achieved in several experimental transplant models (reviewed by Strom *et al.* [83], presumably because many IL-2R⁺ activated T cells are depleted. However, CD25 is also expressed on Treg cells at very high levels and therefore killing CD25⁺ T cells will also affect Treg cells. The administration of a depleting anti-CD25 antibody (PC61 clone) reduced the ratio of CD4⁺CD25⁺ Treg cells in the liver and recipient spleen and induced acute rejection [84] in a mouse model where the liver allograft is accepted spontaneously. A similar effect was observed in the bm12 cardiac grafts in the C57Bl/6 recipient mouse model where administration of the PC61 antibody induced a significant decrease in the percentage of CD4⁺CD25⁺ cells in the spleen and broke the tolerance otherwise installed after administration of anti-CD4 antibodies [85]. In addition, the depletion of CD25⁺ T cells induced rejection [85] in the model, where male CBA/Ca skin grafts are spontaneously accepted in female CBA/Ca recipients expressing a transgenic anti-HY T-cell receptor. In clinical practice, the two available anti-CD25 Mabs (Daclizumab and Basiliximab; IL-2 receptor antagonists) show a diminished capacity to directly kill CD25⁺ T cells as compared with their murine counterparts and do not interfere with the T reg compartment in kidney [86] and heart [87] transplantation. Moreover, Daclizumab was shown to induce a gradual decline in circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells and the expansion of regulatory CD56^{bright} NK cells in multiple sclerosis patients. These regulatory cells negatively regulate activated T cells and might participate in the therapeutic effect of the antibody [88].

CD45 isoforms

CD45 is a protein tyrosine phosphatase involved in signal transduction and early activation by IL-2, IFN- γ and TNF- α . Multiple CD45 isoforms are expressed at varying densities on hematopoietic cells, according to the differentiation status [89]. Cytotoxic T cells, helper T cells and most thymocytes express CD45RB. CD4⁺ cells that express a high density of CD45RB (in the mouse) and CD45RC (in the rat) on their surface are naive cells that have been shown to cause a number of autoimmune disorders. In contrast, autoimmunity caused by the CD45RB^{high} cells is inhibited by CD4⁺CD45RB^{low} cells. Importantly, CD45RB^{high} cells have been associated with pancreas transplant rejection [90]. By contrast, CD45RB^{low} cells express FoxP3 [91], exert a regulatory activity and inhibit allograft rejection [92]. Mouse kidney

transplant recipients treated with an induction consisting of anti-CD45RB antibodies (clone MB23G2) acquired a normal kidney graft function for their natural lifespan [93]. At the cellular level, MB23G2 caused a significant drop in the number of circulating lymphocytes, which returned to normal after 1 week. These cells then presented an increased tyrosine phosphorylation of PLC γ 1, which is a property of anergic T cells [94]. In a heart transplant model, the same CD45RB antibody induced an enrichment of the CD45RB^{low} population, prolonged survival in monotherapy and induced tolerance if associated with rapamycin. Therefore, the CD45RB^{low}/CD45RB^{high} balance is of critical importance in the induction of tolerance by this treatment [91]. Anti-CD45RB antibodies also induced tolerance to allogenic pancreatic islets [95]. The peri-islet infiltrate from treated animals showed a slight increase in CD4 cells, a decrease in CD8 cells, and a reduced intensity of CD45RB expression, associated with an increase in the intragraft expression of transcripts for IL-4 and IL-10. This was consistent with the emergence of a distinct immunoregulatory T-cell subset [95]. The CD45RA and CD45RO isoforms are used in humans to differentiate between naïve and primed/memory T cells, respectively [96,97]. In peripheral blood, CD45RA⁺ cells also express high levels of CD45RB, whereas CD45R0 cells express little CD45RB. A mouse anti-human CD45 antibody (clone 6G3) has been tested as a monotherapy in primates where it delayed the rejection of kidney grafts for more than 200 days in two out of six animals (median survival time = 27 days) [98]. In these assays, the CD45RB^{high}/CD45RB^{low} ratio decreased during treatment and returned to normal after 1 month. In bitherapy with tacrolimus, the median survival time was prolonged to 72 days [98].

Conclusion

Whether T-cell depletion promotes or precludes the development of immune tolerance is still unclear as on the one hand, it might deplete regulatory cells, but on the other hand, these cells can secondarily dominate as a result of a selective expansion. Further investigations will be needed to understand whether the selective depletion of effector T-cell subpopulations, initially sparing existing regulatory cells, might be a better strategy. The ideal molecular target, however, expressed by alloreactive effector cells but not by resting and Tregs, still needs to be defined.

References

1. Countouriotis A, Moore TB, Sakamoto KM. Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hematologic malignancies. *Stem Cells* 2002; **20**: 215.
2. Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, *et al.* Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol* 1999; **36**: 929.
3. Villamor N, Montserrat E, Colomer D. Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. *Semin Oncol* 2003; **30**: 424.
4. Olszewski AJ, Grossbard ML. Empowering targeted therapy: lessons from rituximab. *Sci STKE* 2004; **241**: Pe30.
5. Lowenstein H, Shah A, Chant A, *et al.* Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transpl Int* 2006; **19**: 927.
6. Hickman SP, Turka LA. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; **360**: 1713.
7. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Semin Immunol* 2007; **19**: 318.
8. He G, Kim OS, Thistlethwaite JR, *et al.* Differential effect of an anti-CD8 monoclonal antibody on rejection of murine intestine and cardiac allografts. *Transplant Proc* 1999; **31**: 1239.
9. Louis S, Audrain M, Cantarovich D, *et al.* Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids. *Transplantation* 2007; **83**: 712.
10. Hubbard WJ, Moore JK, Contreras JL, *et al.* Phenotypic and functional analysis of T-cell recovery after anti-CD3 immunotoxin treatment for tolerance induction in rhesus macaques. *Hum Immunol* 2001; **62**: 479.
11. Pearl JP, Parris J, Hale DA, *et al.* Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. *Am J Transplant* 2005; **5**: 465.
12. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. *J Heart Lung Transplant* 1996; **15**: 435.
13. Chung DT, Korn T, Richard J, *et al.* Anti-thymocyte globulin (ATG) prevents autoimmune encephalomyelitis by expanding myelin antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *Int Immunol* 2007; **19**: 1003.
14. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, *et al.* A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 2844.
15. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, *et al.* Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells in vitro. *Blood* 2008; **111**: 3675.
16. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2004; **13**: 117.
17. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, *et al.* Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1967.

III- Annexe III

Action d'anticorps anti-LAG-3 sur l'hypersensibilité retardée dans un modèle pré-clinique chez le primate.

Thomas Haudebourg*, Nicolas Poirier*, Jérémy Hervouet, Frédéric Triebel, Bernard Vanhove et Gilles Blancho.

** Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.*

Article en préparation.

Introduction

LAG-3 est une molécule étroitement liée à CD4 et elle est exprimée sur les cellules lymphocytes activées, les cellules natural killer (NK) et pDC. LAG-3 se lie avec une haute affinité pour les molécules du CMH de classe II, il interfère en concurrençant la fixation du CD4 sur le CMH de classe II et bloque ainsi par cette interaction la transduction des signaux médiée par la stimulation (Triebel F et al. J Exp Med 1990, Bruniquel D et al Immunogenetics 1998). Dans les études expérimentales, le signal par lequel les cellules T activent les monocytes est supprimé par des anticorps spécifiques anti-LAG-3. En outre, au cours de l'inflammation les molécules de LAG-3 et du CMH de classe II sont fortement surrégulées (Workman CJ et al. JI 2004), et leur interaction peut également jouer un rôle important dans l'activation des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène. Après les résultats encourageants obtenus chez le rongeur avec un anticorps anti-LAG-3 polyclonal, il est intéressant de tester la reproductibilité de l'effet chez le primate avec un anticorps monoclonal. Cependant, la greffe chez le primate étant plus difficile à mettre en place nous avons développé un modèle moins invasif nous permettant d'étudier l'effet de l'anticorps sur une réponse immunitaire.

Pour cela nous avons développé un modèle d'hypersensibilité de type retardé (DTH) chez le primate non humain. La DTH est une manifestation in vivo d'une réponse immune cellulaire, qui offre une protection contre les agents pathogènes intracellulaires. La DTH au niveau de la peau est caractérisée par une infiltration leucocytaire qui est régulée par les macrophages et les lymphocytes T CD4 + et C8 + (Black CA et al Dermatol On line 1999). Il y a d'abord une phase d'induction ou de sensibilisation durant laquelle l'animal est exposé à un antigène ou un micro-organisme conduisant à une réponse immunitaire par activation des lymphocytes T et expansion clonale. Pendant la phase effectrice, à la suite d'une exposition ultérieure au même antigène, les cellules T sont activées et recrutées sur le site de dépôt de l'antigène (Black CA et al Dermatol On line 1999). Ainsi, la réaction cutanée due à la DTH est utilisée pour mesurer la capacité des animaux à générer CMIR.

Une fois le modèle de DTH adapté au primate non humain, nous avons pu tester l'effet d'un anticorps anti-LAG-3 monoclonal sur une réponse immunitaire. Les deux anticorps dirigés contre des épitopes différents induisent le même résultat. En effet, au niveau des sites d'injection, l'érythème est moins important au niveau taille et durée. Cet effet se caractérise aussi par un infiltrat fortement diminué.

Matériels et méthodes

Mesure de la réactivité anti-LAG-3 par cytométrie de flux.

Les cellules mononucléées du sang périphérique des babouins (PBMC) sont isolées du sang total par gradient de densité sur du Ficoll-Paque (Eurobio, Les Ulis, France) et les globules rouges sont lysés. Les PBMC fraîchement isolés sont incubés pendant 48h à 37°C, 5% CO₂, avec 10µg/ml de ConA (Sigma, Saint-Louis, Minnesota) dans du milieu complet (RPMI 1640, 10% de sera allogéniques décomplementés, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicilline, 0.1 mg/ml streptomycine, 1% acides aminés non essentiel, 1mM sodium pyruvate et 5mM HEPES, de Sigma). Les PBMC sont ensuite lavées dans du tampon de FACS et marquées avec 10µg/ml d'anticorps anti-Lag3 (11E3; 30 min à 4°C) suivi par un goat anti-mouse IgG couplé FITC (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Les cellules sont lavées et analysées avec un cytomètre de flux : LSR II™ Flow cytometer (BD Biosciences, San-Diego, CA) avec le logiciel DIVA.

Réaction mixte lymphocytaire (MLR) (ou test d'alloréactivité cellulaire).

Les PBMC fraîchement isolées sont incubées dans du milieu complet avec des PBMC allogéniques irradiées (10⁵ cellules/puits de chaque type de cellules) pendant 5 jours à 37°C, 5% CO₂, dans une plaque 96 puits préalablement coatée ou non avec 10µg/ml of 11E3 (Immutep, France) et/ou un anticorps anti-CD3 (clone SP34-2; BD Bioscience). Les cellules sont pulsées avec 1µCi de ³H-thymidine pendant les 8 dernières heures de culture et sont ensuite récupérées et comptées par un compteur à scintillation TopCount NXT (PerkinElmer).

Animaux.

Les études in vivo sont réalisées sur des babouins d'élevage (*Papio anubis*; du centre de primatologie CNRS, Rousset, France) négatifs pour tous les tests de quarantaine, incluant un test cutané pour la tuberculine. Les animaux sont hébergés dans notre laboratoire pour grands animaux (LGA, INSERM, Nantes) et toutes les expériences sont réalisées sous anesthésie générale réalisée avec du Zoletil (Virbac, Carron, France) et conformément aux recommandations éthiques de l'INSERM. Les études pharmacocinétiques de 11E3 sont réalisées sur deux animaux naïfs recevant un bolus en intraveineux de 11E3 à 5mg/Kg. 11E3 est quantifié par un test ELISA spécifique.

Test ELISA spécifique anti-LAG-3

Pour doser les anticorps anti-LAG-3, nous avons mis au point un ELISA spécifique. Dans un premier temps LAG-3Ig (IMP321, Immuteq, France) est dilué à 10µg/ml dans du tampon borate pH9, distribué dans les puits d'une plaque ELISA (50µL/puits) incubé une nuit à 4°C. Après avoir lavé les puits au PBS 1X-0.05% Tween20, ils sont saturés pendant 2h à 37°C avec de la gélatine 0.25%, diluée en PBS-0.1% Tween20. Avant de déposer les échantillons pour l'étape de capture, les puits sont lavés au PBS-0.05% Tween20. 50µL d'échantillons préparés en PBS-0.1% Tween20 ainsi qu'une la gamme de l'anticorps (en démarrant de 500ng/ml, puis en diluant de 3 en 3) sont déposés et incubé 4h à température ambiante. Après lavage, les anticorps de révélation sont préparés dans du PBS 1X-0.1% Tween20 et distribués à raison de 50µl de cette solution dans chaque puits. Après 1h d'incubation à 37°C, la révélation se fait à l'aide d'une solution de TMB pendant 30minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. La coloration est arrêtée par 100µl d' H₂SO₄ 0.5N. On effectue la mesure de l'absorbance à 450nm (filtre test 450nm, filtre réf. 630nm) à l'aide d'un lecteur de plaque Dymatech Laboratories MRX et le logiciel Revelation

Immunisation tuberculose et test cutané d'hypersensibilité retardée (DTH).

Six babouins sont injectés à deux reprises en intradermique (i.d.) avec un vaccin BCG (0.1ml; 2-8 x 10⁵ UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) dans la zone supérieure de la jambe, 4 et 2 semaines avant le test cutané DTH. Pour vérifier la sensibilisation des animaux avant le test cutané DTH, un test elispot de sécrétion d'IFN-γ (non-human Primate IFN-γ Elispot kit; R&D Systems, Minneapolis, MN) a été réalisé à partir des PBMC, conformément aux instructions du fournisseur.

Au jour J0 du test DTH, les animaux reçoivent une injection intradermique de 0,1mL d'un dérivé purifié de la tuberculine (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA) dans la peau sur le côté droit du dos de l'animal. Une solution saline (0.1ml), injectée au même niveau dans le dos, est utilisée comme contrôle négatif (Sham). Les animaux reçoivent 2 doses différentes de PPD (2000 UI or 40 UI), réalisées en duplicat. Chaque point d'injection est séparé de 5 cm au minimum du point adjacent. L'érythème au niveau des sites d'injection est mesuré en utilisant un pied à coulisse. Le diamètre de chaque érythème est mesuré par 2 observateurs du 3ème au 8ème jour. Une réaction est considérée comme positive quand le

diamètre est > 4 mm. La moyenne des lectures est enregistrée. S'il y a une différence > 2 mm entre les lectures des deux observateurs, une troisième lecture indépendante est réalisée. Des biopsies de peau des sites de DTH et saline sont réalisées à J4 sur un des duplicats. La biopsie, réalisée à l'aide d'un scalpel, a pour centre le site d'injection et fait 1cm de diamètre. Un fragment est congelé dans de l'azote liquide pour l'extraction d'ARNm et un second fragment est placé dans du Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) pour des marquages immunohistologiques. Un second test cutané DTH est réalisé plus tard, après une période de 3 semaines de repos. Les animaux ont reçu une injection en intraveineuse de 5mg/kg (n=3) de 11E3 (Immutep, France) ou 0.1 (n=1) et de 1(n=2) mg/kg d'IMP731 (Immutep, France) la veille de ce second challenge par le dérivé purifié de la tuberculine (PPD).

Marquage immunohistochimique.

Les sections congelées (10µm) sont préparées à partir des biopsies chirurgicales de peau. Les lames sont séchées à l'air libre à température ambiante pendant une heure avant une fixation à l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante. Les sections sont bloquées avec de l'eau oxygénée (H₂O₂) et saturées avec du PBS contenant 10% de sérum de babouins, 2% normal goat serum et 4% BSA. Les sections sont incubées pendant la nuit avec un anticorps primaire à 4°C, suivi par 90 min d'incubation avec un anticorps secondaire. Les analyses d'infiltrat de cellules T sont réalisées avec un anticorps anti-humain CD3 de lapin (Dako, Glostrup, Denmark), suivi par un anticorps d'âne anti IgG de lapin couplé FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Certaines sections sont aussi marquées avec un anticorps anti-CD3 ainsi qu'avec un anticorps de souris anti CD4 humain (clone 13B8.2; Beckman Coulter) ou avec un anticorps de souris anti CD8 humain (clone B9.11; Beckman Coulter). Ces marquages sont révélés par un anticorps de chèvre anti IgG de souris couplé Alexa 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les macrophages infiltrant sont visualisés en utilisant un anticorps de souris anti CD68 humain (clone PGM1; Beckman Coulter), suivi par un affiniPure F(ab')₂ d'âne anti IgG de souris couplé avec peroxydase (Jackson ImmunoResearch) et le Peroxydase Substrate Kit Vector[®] VIP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Ces sections sont contre-marquées avec l'hématoxyline et le carbonate de lithium. Toutes les lames sont analysées en utilisant des microscopes à fluorescence standard et le logiciel d'imagerie utilisé était l'AxioVision (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Analyses d'ARNm.

L'ARN total est extrait à partir des biopsies de peau congelées à l'aide des kits d'extraction TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La qualité et la quantité d'ARNm sont contrôlées par spectrométrie (NanoDrop; Thermo scientific, Wilmington, DE) et est ensuite réalisée une RT-PCR quantitative comme décrit précédemment, en utilisant le système Applied Biosystems-GenAmp 7700. Les amplifications ont été réalisées pour les transcrits suivants : hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT; sonde Hs99999909_m1; Applied Biosystems, Foster City, California), LAG-3 (sonde Hs00158563_m1, Applied), C-beta (F: 5'-TCC TGG GTC CAC TCG TCA TT-3'; R: 5'-GGT CGC TGT GTT TGA GCC A-3'), et IL-6 (sonde Hs00174131_m1, Applied). L'HPRT est utilisé comme contrôle de gène endogène pour normaliser les variations de quantité d'ARN de départ. Les données sont ainsi normalisées par rapport au contrôle et exprimées en unité arbitraire (AU).

Analyses statistiques.

Les réponses prolifératives sont exprimées comme moyenne avec un écart type et sont comparées en utilisant un test non-paramétrique (Wilcoxon, Mann & Whitney, Friedman ou Kruskal et Wallis, en fonction de l'appariement et du nombre des échantillons). Un seuil alpha de 0.05 a été considéré comme significatif. Toutes les analyses statistiques sont réalisées par GraphPad InStat (version 5.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Résultats

Caractérisation de l'anticorps 11E3

Dans un premier temps, l'anticorps anti-LAG-3 (11E3, Immutep, France) a été caractérisé chez le babouin. Tout d'abord in vitro leur réactivité a été évaluée sur des PBMC activées en présence de ConA pendant 48 H avec en contrôle des CHO transfectées ou non avec *lag3*. Nous observons sur la figure 10 que l'anticorps se fixe sur les cellules activées et sur la CHO LAG-3⁺. Un épaulement caractéristique du marquage LAG-3 est observé sur la figure 11B par rapport à la figure 1A (17,2% des cellules sont positives). Un résultat similaire est obtenu avec les CHO contrôles, les cellules transfectées sont marquées par l'anticorps à la hauteur de 27,1% par rapport au wild type (Fig 1 C/D)

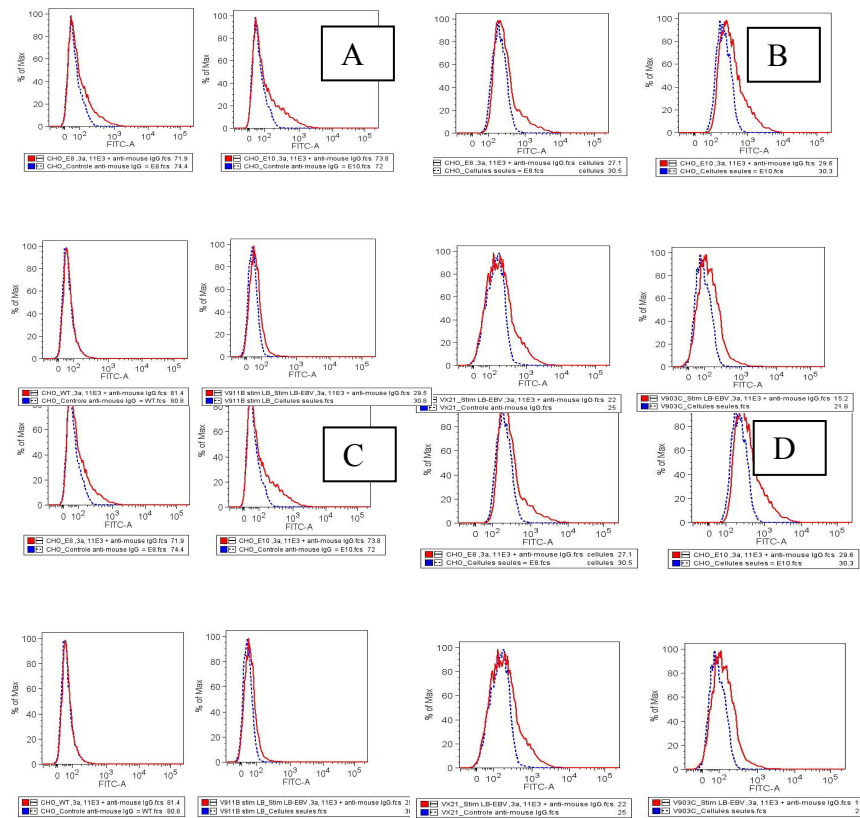


Figure 1 : cross réactivité de l'anticorps anti-LAG-3

Le marquage est effectué sur des PBMC de babouins au repos (A), activées à la ConA (B) ou sur des CHO wild type (C) ou transfectées lag 3(D). Seules les PMBC activées et les CHO transfectées sont marquées à la hauteur de 17,2% et 27,1%, respectivement.

11E3 est connu pour chez l'homme pour avoir un effet agoniste dans les MLR. Dans les MLR effectuées à l'aide de PBMC de babouins (en situation d'incompatibilité du CMH de classe II), l'effet observé est identique chez le babouin. En effet, lors des MLR effectuées avec une sur-stimulation par un anticorps anti-CD3 immobilisé, une forte diminution de la prolifération

de l'ordre de 80% est obtenue lorsque l'anticorps anti-LAG-3 est également immobilisé (Fig 2). Sans cette stimulation par l'anticorps anti-CD3, l'inhibition en présence de 11E3 est obtenue dans 50% des cas.

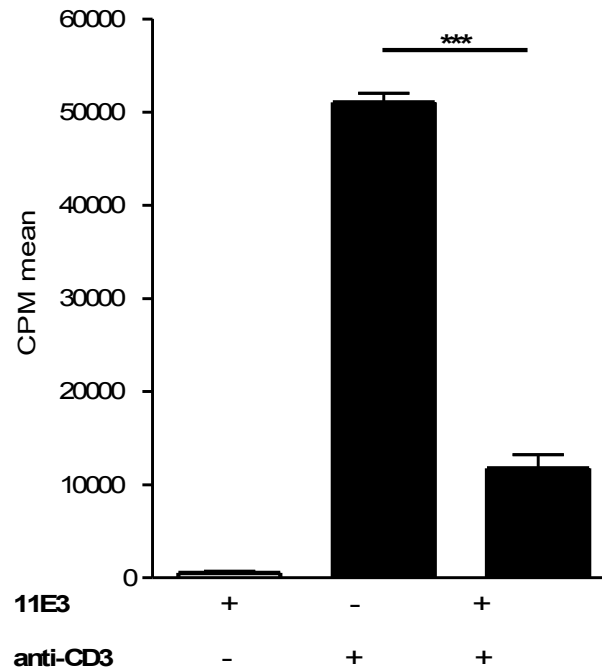


Figure 2 : effet de l'anticorps anti-LAG-3 en MLR

PMBC de babouins (miss match class II) sont mises en culture, un coating CD3 a été ajouté avec ou non du 11E3

Avant d'utiliser cet anticorps pour un traitement in vivo, une étude pharmacocinétique a été effectuée sur plusieurs singes. Après injection i.v. de 5mg/kg de 11E3, le taux sérique de l'anticorps a été évalué par un test ELISA. La demi-vie d'élimination de l'anticorps est évaluée à 5 jours.

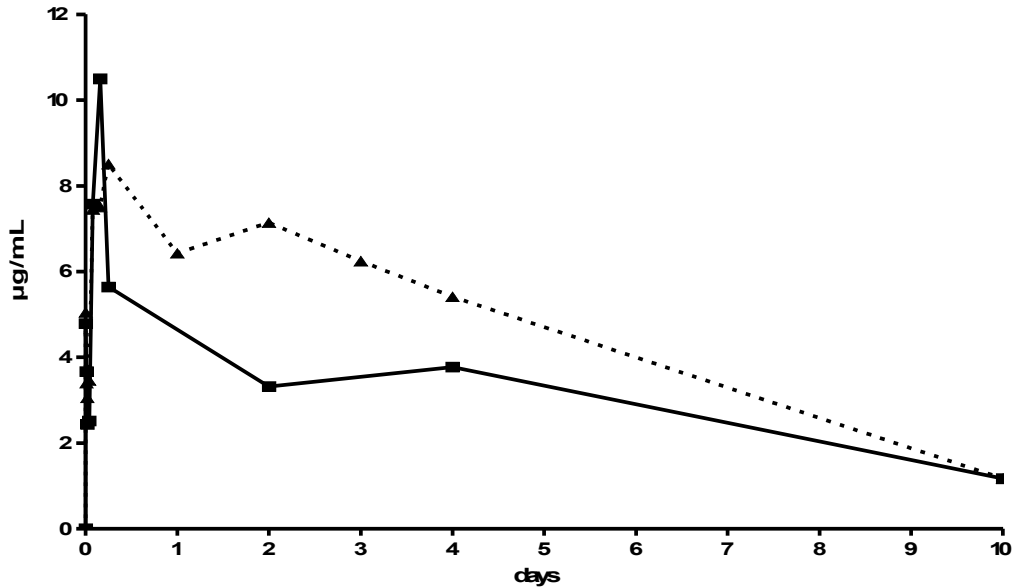


Figure 3 : Courbe de pharmacocinétique de l'anticorps anti-LAG-3

Mesure par test ELISA de la quantité d'anticorps anti-LAG-3 présent dans le sérum du babouin. Les prélèvements sont effectués à T0, T5min, T15min, T30min, T1h, T2h, T4h, T10h, T24h puis tous les jours

Modèle d'hypersensibilité de type retardée

Une hypersensibilité de type retardée se caractérise par 2 phases. Une première phase dite de sensibilisation durant laquelle l'animal est exposé à un antigène ou un micro-organisme conduisant à une réponse immunitaire par activation des lymphocytes T et expansion clonale. Une deuxième dite phase effectrice, à la suite d'une exposition ultérieure au même antigène, les cellules T sont activées et recrutées sur le site de dépôt de l'antigène (Black CA et al Dermatol On line 1999). Dans notre modèle, la phase de sensibilisation se traduit par deux injections de tuberculine en IM espacées de 15 jours (D-30, D-15). L'immunisation du babouin à la tuberculine est évaluée par Elispot à l'IFN γ .

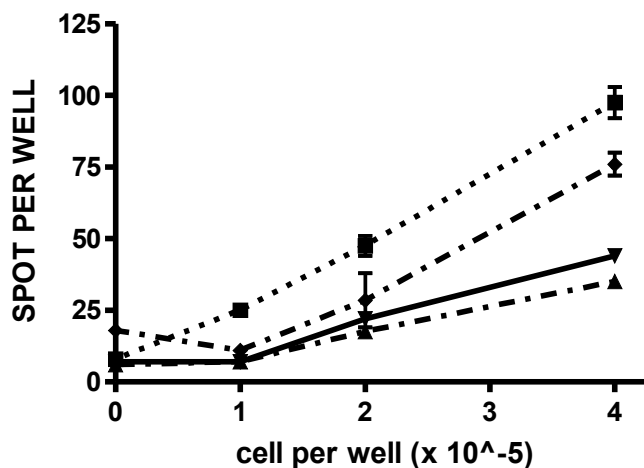


Figure 4 : Elispot IFN γ de contrôle d'immunisation

Si le babouin est bien immunisé contre la tuberculine, on obtient une réponse quantifiable par le nombre de spots par puits. Cette réponse est proportionnelle à la fréquence de cellules répondeuses

Les anticorps anti-LAG-3 réduisent l'érythème

Lors de la phase effectrice, l'injection de tuberculine en intra dermique entraîne l'apparition d'un érythème au niveau du site d'injection. (Fig5A)

A



B

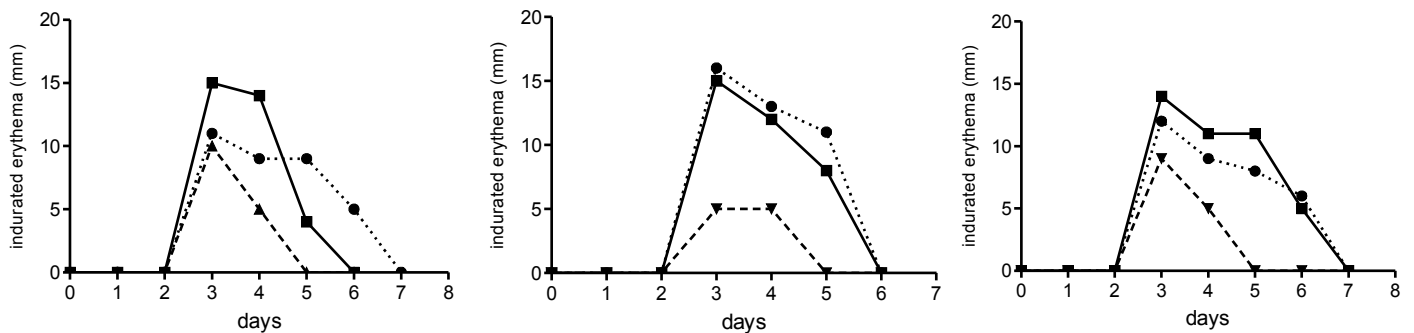


Figure 5 : Mesure de l'érythème

L'injection en intradermique de la tuberculine entraîne un érythème (A). Celui-ci est mesuré lors de 3 IDR successives (espacées de 15 jours), la seconde (triangle) se faisant le lendemain d'une injection de 5mg/Kg d'anticorps anti-LAG-3. La première (carré) et la troisième (rond) sont faites en absence de traitement immunomodulateur.

La première intradermo-réaction (IDR) est effectuée afin de connaître la capacité de réponse de l'animal. A partir du 3^{ème} jour l'érythème est mesuré jusqu'à disparition de celui-ci. La deuxième IDR est effectuée le lendemain du traitement avec l'anticorps anti-LAG-3 (5mg/kg,

IV). Une diminution de la réponse en durée, 5 jours contre 6/7, et en intensité, moins de 10mm contre 15 pour les contrôles, est observée. Une 3^{ème} IDR est réalisée afin de s'assurer que la diminution de la réponse n'est pas due à une diminution de l'immunisation mais bien au traitement.

Les anticorps anti-LAG-3 réduisent l'infiltrat

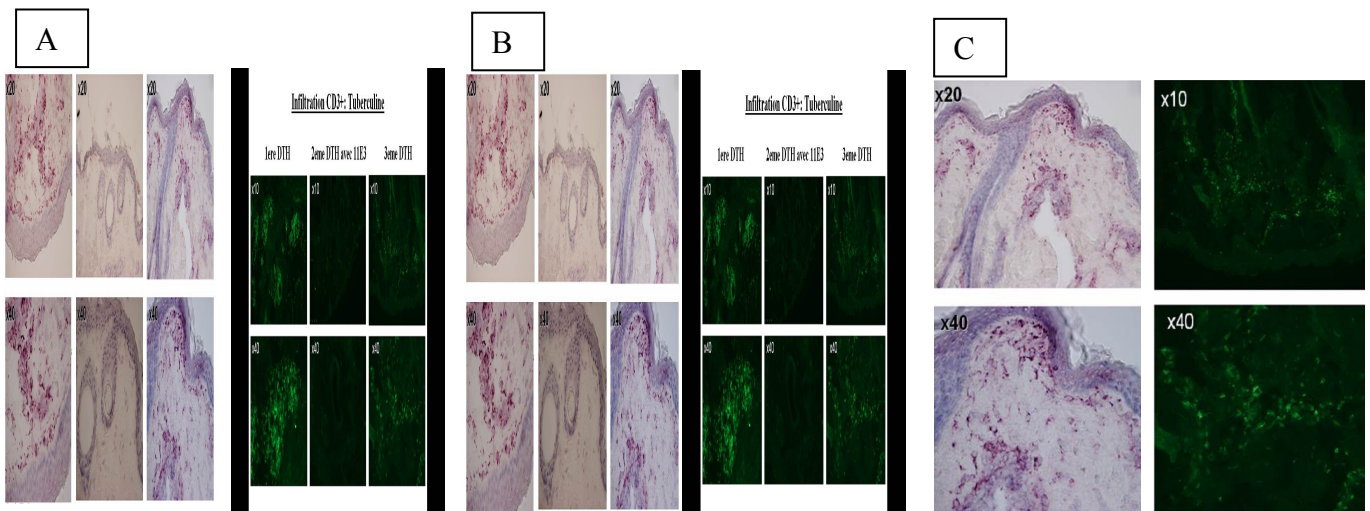


Figure 6 : Immunohistochimie des biopsies des érythèmes à J4

Marquages des macrophages (CD69) sur la gauche et marquage CD3 sur la droite des planches. La planche A correspond à la biopsie de la première IDR (contrôle), B de la seconde (traité anti-LAG-3) et C de la troisième (contrôle).

L'érythème étant plus faible lors des traitements, des analyses par immunohistochimie sont effectuées afin d'identifier les modifications au niveau de l'infiltrat. Les marquages réalisés sur les biopsies de peau faites à J4 au niveau du site d'injection révèlent une diminution très importante de l'infiltrat CD3 (CD4 et CD8) et CD69 entre l'IDR contrôle et l'IDR traitée. Cet infiltrat réapparaît à la troisième IDR contrôle. L'administration de l'anticorps inhibe fortement la réponse cellulaire puisque l'infiltrat est inexistant lors de l'IDR traitée.

Discussion et perspectives

Cette étude avait pour but de développer un modèle peu invasif pour l'étude de la réponse cellulaire et des effets immunomodulateurs des anticorps anti-LAG-3. Nous avons mis au point un modèle primate en utilisant l'hypersensibilité retardée (DTH) autrement appelé hypersensibilité de type IV. Ce type de réaction d'hypersensibilité se produit lorsqu'un antigène interagit avec un lymphocyte mémoire le reconnaissant spécifiquement. Le lymphocyte sécrète alors des substances inflammatoires qui vont attirer d'autres cellules. Dans la DTH, les cellules T CD8 cytotoxiques et les cellules T helper CD4 reconnaissent un antigène extra ou intracellulaire quand il est présenté par une molécule de CMH de classe I ou II, respectivement. Les macrophages font office de CPA et produisent de l'IL-1 qui induit la prolifération des cellules T helper. Les cellules T helper produisent alors de l'IFN γ et de l'IL-2. La réponse à la tuberculine est de ce type. Ce type de réponse a été observé pour la première fois lorsque des antigènes solubles d'organismes tels que les mycobactéries ont été administrés en sous-cutanée. Elle se caractérise par une inflammation au niveau du site d'injection et se mesure par le diamètre de l'érythème formé. Cette réaction est induite par une série de migrations cellulaires et activations: 1. Migration des cellules T, 2. Infiltration des macrophages, 3. Apparence rouge sans oedème.

Après avoir validé la phase de sensibilisation par Elispot et la phase effectrice par une première IDR, l'effet des anticorps anti-LAG-3 a été évalué. Les résultats ont montré des érythèmes plus faibles en taille et visibles moins longtemps. Les immunohistologies réalisées sur les biopsies de peau montrent une forte diminution de l'infiltrat. Il apparaît clairement que l'anticorps anti-LAG-3 inhibe la réponse cellulaire et ainsi réduit l'infiltrat au niveau du site d'injection.

A la suite de ces résultats, un autre anticorps anti-LAG-3 (IMP731) a été testé dans ce modèle. Cet anticorps est susceptible d'exercer une activité cytotoxique envers les cellules cibles, car il s'agit d'un anticorps humanisé de classe IgG1. Étant de haute affinité, des doses de 1mg/Kg et de 0,1mg/Kg ont été testées.

A

B

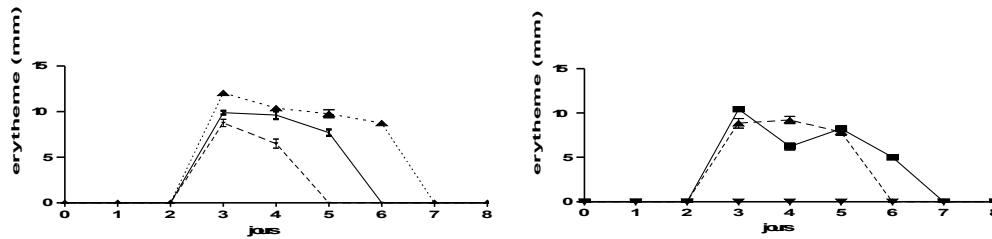


Figure 7 : Mesure des érythèmes

Mesure lors de 3 IDR, la seconde (triangle) se faisant le lendemain d'une injection de 1mg/Kg d'anticorps anti-LAG-3 (IMP731°. La première (carré) et la troisième (rond) sont faites en contrôle de la réaction. Les IDR sont effectuées avec de la tuberculine pure (A) et de la tuberculine diluée au 1/50^{ème} (B).

Les résultats obtenus sont les mêmes avec les 2 doses d'anticorps. On observe sur la figure 7 pour la tuberculine, utilisée pure, une diminution de la réponse comme pour le 11E3. Lorsque la tuberculine avait été diluée au 1/50^{ème}, l'IMP731 a eu un effet plus important que le 11E3 car aucun érythème n'est obtenu, la réponse est donc totalement inhibée avec cet anticorps.

Mis ensemble, les résultats obtenus avec un anticorps cytotoxique dans le modèle IDR et dans le modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat nous ont poussé à tester l'effet de ce type d'anticorps dans notre modèle de greffe rénale chez le primate. A l'heure actuelle 2 greffes rénales ont été réalisées chez le babouin avec une injection d'IMP731 (0,5mg/kg) tous les 3 jours.

Le prolongement de survie du greffon espérée n'a pas été obtenu. Les 2 babouins ont rejetés à J6 et J9 contre J6 pour les contrôles (contrôles historiques non reproduits ici). L'anticorps cytotoxique n'a donc pas eu l'effet escompté, la raison de l'inefficacité reste inconnue. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'anticorps était-il injecté en quantité suffisante ? La concentration minimale détectée lors du traitement est supérieure à 1,5µg/ml, la dose circulante est donc acceptable (Fig8).

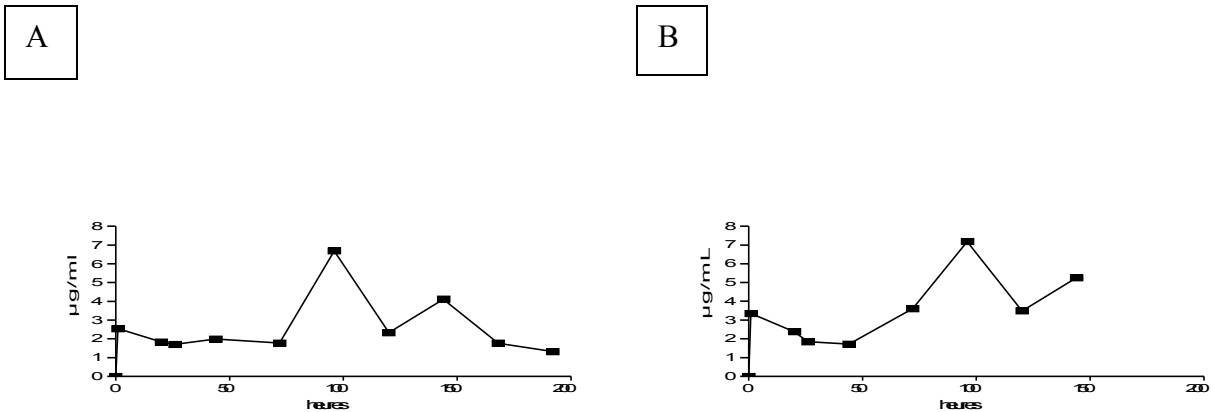


Figure 8 : Concentration d'anticorps IMP731 dans les animaux greffés
Concentration d'IMP731 mesurée quotidiennement dans le sérum des animaux A et B.

L'anticorps pénètre-t-il dans le greffon ? La cible étant les cellules LAG-3 positives qui ne sont détectées que dans le greffon, l'anticorps doit pouvoir pénétrer dans le greffon. Les biopsies du greffon montrant un infiltrat élevé de cellules T LAG-3⁺, il est possible que l'anticorps circule dans le sang mais ne pénètre pas le greffon ce qui expliquerait son inefficacité. Dans notre modèle de greffe de cœur chez le rat, cependant, les anticorps injectés permettaient une efficacité intra-greffon. Il est possible que l'effet soit différent d'un organe à l'autre (rein pour le primate et cœur pour le rat), ou la provenance de l'anticorps a peut être une influence : anticorps polyclonal de lapin pour les expériences chez le rat et anticorps de souris humanisé pour celles primate. Pour répondre à toutes ses questions d'autres greffes sont programmées avec une dose plus forte, 5mg/kg. Une concentration plus importante d'anticorps circulant évitera peut être l'infiltrat ou permettra à l'anticorps de pénétrer dans le greffon.

En conclusion de notre étude pré-clinique chez le primate, deux anticorps différents anti-LAG-3 ont eu un effet mesurable sur la réponse cellulaire lors d'une DTH. Par contre à la même concentration, l'anticorps déplétant est totalement inefficace dans la greffe de rein. D'autres études devront être menées pour déterminer si la déplétion des cellules LAG-3⁺ dans la greffe de rein est inefficace ou si la quantité d'anticorps injectée a été trop faible pour contrecarrer une réponse aussi importante que celle du rejet d'une allogreffe de rein.

REFERENCES

[Triebel F](#), [Jitsukawa S](#), [Baixeras E](#), [Roman-Roman S](#), [Genevee C](#), [Viegas-Pequignot E](#), [Hercend T](#). LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. [J Exp Med](#). 1990 May 1;171(5):1393-405.

Bruniquel D, Borie N, Hannier S, Triebel F. [Regulation of expression of the human lymphocyte activation gene-3 \(LAG-3\) molecule, a ligand for MHC class II](#). [Immunogenetics](#). 1998 Jul;48(2):116-24.

Workman CJ, Cauley LS, Kim IJ, Blackman MA, Woodland DL, Vignali DA. [Lymphocyte activation gene-3 \(CD223\) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo](#). [J Immunol](#). 2004 May 1;172(9):5450-5.

Black CA. [Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective](#). [Dermatol Online J](#). 1999 May;5(1):7.

IV- Publications/Communications/Prix

Publications

Poirier N, Vanhove B, et Blanco G. Selective blockade of CD28 for immunomodulation (*revue en préparation*).

Haudebourg T, **Poirier N** (co-premier auteur), Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Hervouet J, Minault D, Coulon F, Vanhove B, et Blanco G. Agonistic anti-Lag-3 antibody prevent delay-type-hypersensitivity in non-human primate (*article en préparation*).

Poirier N, Azimzadeh A, Tianshu Z, Dilek N, Mary C, Nguyen B, Tillou X, Wu G, Renaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon F, Allain-Launay E, Karam G, Soullillou JP, Pierson III R, Blanco G, et Vanhove B. Selective CD28 blockade promotes regulatory T cells and improve hearts and kidney allograft survival in non-human primate (*article en revision*).

Tillou X, **Poirier N** (co-premier auteur), Le Bas-Bernardet S, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, Vistoli F, Karam G, Daha M, Soullillou JP, et Blanco G. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons (*article en révision*).

Haudebourg T, **Poirier N**, Vanhove B. Depleting T cells subpopulations in organ transplantation. *Transplant International*. 2009 May; 22 (5):509-18.

Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, **Poirier N**, Vuillefroy de Silly R, Usal C, Smit H, Martinet B, Thebault P, Renaudin K, et Vanhove B. Myeloid derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Journal of Immunology*. 2008 Jun 15;180(12):7898-906.

Poirier N et Blanco G. Recombinant human c1-inhibitor inhibits cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies. *Transplantation Proceedings*. 2008 March; 40(2):581-3.

Poirier N, **Maillet F**, Barussaud ML, Renaudin K, Ashton-Chess J, Minault D, Hervouet J, Soullillou JP, et Blanco G. Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs. *J Surg Res*. 2007 May 15; 139(2):261-8.

Vulgarisation

- **Poirier N**. Compte-rendu du XXII international congress of the transplant society. *Bulletin de la Société Française d'Immunologie* (octobre 2008, 118-27)

Communications orales :

- Dilek N, **Poirier N**, et al. *European society of transplantation (ESOT-ETCO), Paris 2009* : Selective CD28 costimulation blockade synergizes with regulatory T cell activity in a CTLA-4 dependent manner.
- **Poirier N**, et al. *Congress of the Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San-Francisco (US) 2009* : CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney.
- **Poirier N**, et al. *FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium, San-Francisco (US) 2009* : CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney.
- **Poirier N**, et al. *American Transplant Congress (ATC), Boston (US) 2009*: Induction of Tregs by monovalent non-agonist CD28 antibodies in baboon kidney allotransplantation.
- Tillou X, **Poirier N**, et al. *American Transplant Congress (ATC), Boston (US) 2009*: Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboon.
- **Poirier N**, et al. *8^{ième} Congrès de Société Francophone de Transplantation (SFT), Quebec 2008*: Immunomodulation en allotransplantation rénale chez le primate non-humain induite par un antagoniste de CD28.
- Tillou X, **Poirier N**, et al. *8^{ième} Congrès de Société Francophone de Transplantation (SFT), Quebec 2008*: Prévention du rejet vasculaire aigu à médiation humorale chez le babouin alloimmunisé par du C1 inhibiteur recombinant humain.
- **Poirier N**, et al. *XXII international congress of the transplant society, Sydney (Australie) 2008*: Immunomodulation induced by a CD28 antagonist in kidney baboon recipient.
- **Poirier N**, et al. *14^{ième} N.A.T (Nantes/actualités/Transplantation), Nantes (France) 2008* : CD28 antagonist induce immunomodulation in kidney allograft in non-human primate.
- **Poirier N**, et al. *Société Francophone de Transplantation (SFT), Lyon (France) 2007* : Blocage sélectif de CD28 en allotransplantation rénale chez le primate non-humain.
- **Poirier N**, et al. *Société Francophone de Transplantation (SFT), Lyon (France) 2007* : Rejet humoral en allotransplantation rénale chez le porc alloimmunisé.
- **Poirier N**. *New Key Opinion Leader meeting 2007 of The Transplantation Society. (TTS) Cape Town (South Africa) 2007*: Targeting CD28 with antagonist for immunomodulation.
- **Poirier N**, et al. *European society of transplantation (ESOT-ETCO), Prague (République Tchèque) 2007*: Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 allows immunomodulatory responses in non-Human Primate kidney allotransplantation.
- **Poirier N**, et al. *OUEST-Transplant, Labaule (France) 2007* : Un modèle de rejet humoral en allotransplantation rénale chez le porc.

Posters scientifiques :

- **Poirier N**, et al. *FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium, San-Francisco (US) 2009* : CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney.
- Zhang T, Vanhove B, Stoddard T, Kelishadi S, Welty E, **Poirier N**, et al. *American Transplant Congress (ATC), Boston (US) 2009*: [Dose-Dependent Efficacy of Selective CD28 Blockade To Prevent Acute Heart Allograft Rejection.](#)
- Haudebourg T, **Poirier N**, et al. *ESOT Basic Science Symposium, Bruxelles (Belgique) 2009* : Anti-LAG-3 antibodies delayed type hypersensitivity to tuberculin intradermo-reaction in primates.
- **Poirier N**, et al. *American Transplant Congress (ATC), Toronto (Canada) 2008*: Immunomodulation in non-human primate kidney allotransplantation after therapy with antagonist monovalent anti-CD28 antibodies.
- **Poirier N**, et al. *Forum des doctorants, Nantes 2008* : Immunomodulation en allotransplantation rénale chez le primate non-humain induite par un antagoniste de CD28
- **Poirier N**, et al. *International Xenotransplantation Congress (CTS-IPITA-IXA), Mineapolis (U.S.A) 2007*: A model of acute antibody-mediated rejection in a pre-clinical setting in the pig.
- **Poirier N**, et al. *European society of transplantation (ESOT-ETCO), Prague (République Tchèque) 2007*: Acute vascular rejection in alloimmunized pigs.
- **Poirier N**, et al. *Université d'été d'Astellas en Transplantation, Avignon, 2007* : Le porc alloimmunisé comme modèle de rejet humoral.

PRIX & AWARDS

- **Trainee Award** lors du FOCIS Centers of Excellence Trainee Satellite Symposium, San-Francisco (US) en 2009.
- **Prix Riset** (Reprogramming the Immune System for Establishment of Tolerance) de la meilleure communication orale du 14^{ième} congrès NAT 2008.
- **Médaille de bronze** lors du New Key Opinion Leader meeting à Cape Town (South Africa) de The Transplantation Society (TTS) en 2007.
- **Poster de distinction** :
 - FOCIS 2009
 - ATC 2008
 - ESOT 2007

Immunothérapie en allotransplantation chez le primate : inhibition du complément et de la costimulation

Cette thèse a eu pour but d'explorer deux stratégies thérapeutiques innovantes en transplantation rénale chez le primate non-humain : le blocage sélectif de la molécule de costimulation CD28 et l'inhibition précoce de l'activation de la voie classique du complément. La première partie a consisté en l'évaluation préclinique de sc28AT, un antagoniste monovalent sélectif de CD28 dans le but d'inhiber les interactions activatrices CD28/B7 tout en laissant intactes les interactions inhibitrices CTLA-4/B7. Nous avons montré que cette stratégie synergise avec l'effet des inhibiteurs de la calcineurine et conduit à une surrégulation en périphérie des lymphocytes T régulateurs (Treg) après transplantation, leur accumulation dans les greffons, ainsi qu'à la surexpression transcriptionnelle de molécules immunorégulatrices. Nous avons montré que les monovalents anti-CD28 ne possèdent pas de propriétés superagonistes et qu'ils sont compatibles avec la fonction suppressive des Treg contrairement aux stratégies bloquant toute la voie CD28/B7/CTLA-4. De même, nous avons montré que seul le blocage sélectif de CD28 permet d'empêcher la formation de synapse immunologique stable par un mécanisme CTLA-4-dépendant. L'objectif de la seconde partie a été de développer un modèle préclinique de rejet aigu humoral en transplantation rénale chez le porc puis chez le primate pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons montré que deux injections consécutives de PBMC du donneur sont suffisantes pour induire une alloimmunisation et le développement d'anticorps cytotoxiques spécifiquement dirigés contre le CMH de classe I du donneur. Ces animaux immunisés développent un rejet violent très rapidement avec des signes histologiques d'atteintes humorales et la déposition de fragments du complément au sein des greffons. Enfin, l'efficacité de la molécule recombinante humaine du C1-inhibiteur a été testée *in vitro* et *in vivo* dans ce modèle. Elle permet d'inhiber la cytotoxicité induite par les anticorps et de prévenir tout rejet aigu humoral durant la phase de traitement. Ces recherches ont contribué à apporter des éléments nouveaux quant aux rôles et mécanismes de nouvelles stratégies thérapeutiques immunorégulatrices spécifiques en transplantation avec un possible impact chez l'homme à court terme.

Mots clés : Immunothérapie, Transplantation, Primate, Costimulation, CD28, Lymphocyte régulateur, Complément, C1-inhibiteur, Rejet humoral

Immunotherapy in primate allotransplantation : complement and costimulation inhibition

The aim of this PhD work was to explore two innovative strategies in non-human primate kidney transplantation: the selective blockade of the costimulatory molecule CD28 and the early inhibition of the classical complement pathway. The objective of the first part was to evaluate sc28AT, a selective monovalent CD28 antagonist, to inhibit activating CD28/B7 interactions while preserving CTLA-4/B7 inhibitory interaction. In this transplantation study, we showed that sc28AT synergize with calcineurine inhibitors and conducts in the periphery to an upregulation of regulatory T cells (Treg), their accumulation in the grafts, where immunomodulatory transcripts were also over-expressed. Monovalent anti-CD28 antibodies have no superagonist activities and are compatible with the suppressive function of Treg in contrast to B7-blockade strategies. Moreover, only selective CD28 blockade prevent the formation of a stable immune synapse through a CTLA-4-dependent mechanism. The aim of the second part was to develop a preclinical model of acute humoral rejection in renal allotransplantation in order to test new strategies to prevent it. We showed that two subsequent intradermal injection of donor PBMC induced alloimmunisation and cytotoxic antibodies directed specifically against donor class I MHC molecules. Immunized recipients developed a fast rejection with histological signs of humoral rejection and complement deposition in the graft. Finally, a human recombinant C1-inhibitor was tested *in vitro* and *in vivo* in this model. This compound inhibited cytotoxicity induced by antibodies and prevented humoral rejection during effective time of treatment. These researches illustrate new insights and mechanisms in specific and immunomodulatory therapeutic strategy in transplantation with possible short impact in humans.

Key words: Immunotherapy, Transplantation, Primate, Costimulation, CD28, Regulatory lymphocyte, Complement, C1-inhibitor, Humoral rejection.

30, Bd Jean Monnet
44093 Nantes cedex 01