

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

Contribution à l'étude de l'immunosuppression et de  
l'induction de tolérance à l'allogreffe induite par des  
anticorps anti-CD28.

THESE DE DOCTORAT  
Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE  
Discipline : Science de la vie et de la santé  
Spécialité : Immunologie

Présenté et soutenu publiquement par  
**Fabienne HASPOT**

*Le 2 décembre 2004, devant le jury ci-dessous :*

Président du Jury	<i>Ignacio ANEGON, Professeur, Nantes</i>
Rapporteurs	<i>Dominique LATINNE, Professeur, Bruxelles</i> <i>Hervé WATIER, Professeur, Tours</i>
Examineurs	<i>Jacques NUNES, Docteur, Marseille</i> <i>Ignacio ANEGON, Professeur, Nantes</i>
Directeur de thèse	<i>Bernard VANHOVE, Docteur, Nantes</i>

<b>REMERCIEMENTS</b>	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>4</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>5</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>6</b>
<b>AVANT PROPOS :</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>8</b>
1. LE REJET D'ALLOGREFFE :	8
1.1. <i>Du rejet hyper aigu au rejet chronique :</i>	8
1.1.1. Le rejet hyper aigu :	8
1.1.2. Le rejet vasculaire aigu :	9
1.1.3. Le rejet aigu :	9
1.1.4. Le rejet chronique :	10
1.2. <i>L'allogénicité :</i>	13
1.2.1. Origines moléculaires de l'alloreconnaissance:	13
1.2.1.1. Structure de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité :	13
Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I :	13
Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II :	14
1.2.1.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité :	14
1.2.1.3. L'activation du lymphocyte T :	15
Le récepteur du lymphocyte T :	15
Le signal antigénique :	16
Le signal de costimulation :	17
1.2.2. Les apports de la cristallographie :	19
1.2.3. Comprendre la présentation croisée (cross présentation) :	21
1.2.4. L'alloreconnaissance directe :	22
1.2.5. L'alloreconnaissance indirecte :	24
1.2.6. La part du direct et de l'indirect dans le rejet de greffe :	26
1.2.7. Le rôle des organes lymphoïdes secondaires dans le rejet de greffe :	27
2. LE TRINOME CD28/CTLA-4/B7 :	30
2.1. <i>Structure moléculaire et expression :</i>	30
2.2. <i>Les rôles du CD28 et du CTLA-4 dans la réponse lymphocytaire T :</i>	32
2.2.1. Conséquences de l'engagement du CD28 sur le lymphocyte T :	32
2.2.1.1. CD28 et sélection thymique :	33
2.2.1.2. CD28 et seuil d'activation du TCR :	34
2.2.1.3. CD28 et synapse immunologique :	35
2.2.1.4. CD28 et activation de facteurs de transcription :	36
2.2.1.5. CD28 et survie cellulaire :	39
2.2.2. Conséquences de l'engagement du CTLA-4 sur le lymphocyte T :	40

2.2.2.1.	Mise en surface de la molécule CTLA-4 : .....	40
2.2.2.2.	Inhibition du signal transduit par le TCR : .....	41
2.2.2.3.	Blocage de la prolifération et apoptose : .....	42
2.2.3.	Les molécules CTLA4Ig : .....	43
2.2.4.	CTLA-4 ligands des molécules B7 : .....	44
2.3.	<i>Protéines de la famille CD28/B7</i> : .....	47
2.4.	<i>Souris CD28KO et transplantation</i> : .....	48
2.5.	<i>Modèles expérimentaux de ciblage thérapeutique du CD28</i> : .....	49
2.5.1.	Les anticorps anti-CD28 : .....	49
2.5.1.1.	Chez la souris : .....	49
2.5.1.2.	Chez le rat : .....	50
2.5.1.3.	Chez l'homme : .....	51
2.5.2.	Blocage du CD28 dans les maladies autoimmunes : .....	53
2.5.3.	Blocage du CD28 en transplantation : .....	55
3.	LA TOLERANCE : .....	57
3.1.	<i>Les cellules régulatrices</i> : .....	59
3.1.1.	Les cellules régulatrices T : .....	59
3.1.1.1.	Les cellules régulatrices T CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> naturelles : .....	59
	Origine et fonctions des cellules régulatrices naturelles CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> : .....	59
	Phénotype des cellules régulatrices naturelles CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> : .....	60
3.1.1.2.	Les cellules régulatrices T induites : .....	61
	Les cellules régulatrices CD4 <sup>+</sup> de type Tr1 : .....	61
	Les cellules régulatrices CD4 <sup>+</sup> de type Th3 : .....	62
	Les cellules régulatrices CD25 <sup>-</sup> : .....	62
	Les cellules régulatrices CD8 <sup>+</sup> : .....	63
3.1.2.	Le rôle des cellules dendritiques dans la génération des cellules T régulatrices : .....	66
3.1.3.	Le lien entre les cellules T régulatrices naturelles et les cellules régulatrices induites, la tolérance infectieuse : .....	67
3.2.	<i>Stratégies d'induction de la tolérance par blocage des molécules de costimulation</i> : .....	68
3.2.1.	Blocage de ICAM et LFA-1 : .....	70
3.2.2.	Blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L : .....	71
3.2.3.	Blocage de la voie de costimulation CD28/B7 : .....	72
<b>RESULTATS :</b>		<b>75</b>
4.	COMPARAISON ENTRE LE BLOCAGE SPECIFIQUE DU CD28 OU DES MOLECULES B7 DANS DES CONDITIONS DE STIMULATION DIRECTE OU INDIRECTE. ....	76
4.1.	<i>Objectifs de l'étude et modèle utilisé</i> : .....	76
4.2.	<i>Résultats</i> : .....	77
	Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. ....	77
4.3.	<i>Discussion et perspectives</i> : .....	87

5. LE BLOCAGE SPECIFIQUE DU CD28 EN TRANSPLANTATION RENALE CHEZ LE RAT ENTRAINE UNE TOLERANCE ET LE DEVELOPPEMENT DE CELLULES REGULATRICES. ....	91
5.1. <i>Développement d'un protocole d'induction à la greffe rénale chez le rat</i> : .....	91
5.2. <i>Résultats</i> .....	97
5.3. <i>Annexe au matériel et méthode</i> .....	124
5.4. <i>Annexe aux résultats</i> .....	125
5.5. <i>Discussion et perspectives</i> : .....	126
<b>CONCLUSION</b>	<b>132</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>134</b>
Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody.....	135
CD25 <sup>+</sup> regulatory cells differentiate in recipients of long term allograft following donor specific transfusion (DST) and are able to transfer long term survival of MHC incompatible graft in naïve host.....	135
Transfer Of Dominant Tolerance To Recipients Of Fully MHC Mismatched Kidney.....	136
Grafts Induced By Anti-Donor Class II Antibodies: T/non-T cell collaboration .....	136
<b>BILBIOGRAPHIE</b>	<b>137</b>

# Abréviations

Ad : adénovirus	GVHD : Graft-vs-host disease
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1
AICD: activation induced cell death	IDO : indoleamine 2, 3-dioxygenase
AMAC $\phi$ : alternatively activated macrophages	IFN- $\gamma$ : interféron $\gamma$
AP-1: activator protein-1	IL-2R : récepteur à l'IL-2
ARNm: acide ribonucléique messenger	KIR: killing inhibitory receptor
CDR: complementary determining region	LAT: linker for activation of T cell
CIA : Collagen-induced-arthritis	LFA-1: lymphocyte function associated antigen
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	LT: lymphocyte T
CPA : cellule présentatrice d'antigènes	LTs: lymphocyte T supresseurs
CsA : cyclosporine A	1-MT : 1-méthyl-tryptophane
CTL : lymphocyte T cytotoxique	MBP (myelin basic protein)
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte antigen	MBP: myelin basic protein
EAE : experimental autoimmune encephalomyelitis	MLR: reaction mixte lymphocytaire
EAN : experimental autoimmune neuritis	Mtv: mammary tumor viruses
EAU : experimental autoimmune uveoretinitis	NF- $\kappa$ B: nuclear factor $\kappa$ B
FoxP3 : transcription factor forkhead box P3	NF-AT: nuclear factor of activated T cell
GIC : cellules infiltrant le greffon	NK : natural killer
GITR: glucocorticoid-induced TNF-related receptor	PKC- $\theta$ : protéine kinase C- $\theta$
GMCSF: granulocyte macrophage colony stimulation factor	TCR : récepteur du lymphocyte T
	TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase
	TSST1 : toxic shock syndrome toxin

# Liste des Figures

<i>Figure 1: Comparaison de l'orientation adoptée par le TCR. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figure 2: Schéma récapitulatif des voies de présentation directe et indirecte.....</i>	<i>29</i>
<i>Figure 3: Différence de stabilité et d'organisation des molécules CD28 et CTLA-4.....</i>	<i>31</i>
<i>Figure 4: Le devenir du lymphocyte T dépend des engagements moléculaires établis avec la cellule présentatrice d'antigènes. ....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 5: Accumulation du CD28 au niveau de la zone de contact entre deux cellules. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 6: Schéma récapitulatif du signal issu du CD28 induisant la translocation de facteurs de transcription. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 7: Schéma récapitulatif des signaux inhibiteurs issus du CTLA-4.....</i>	<i>43</i>
<i>Figure 8 : Schématisation de la construction des molécules BMS-188667 et BMS-224818. ..</i>	<i>44</i>
<i>Figure 9: Modèle d'induction de tolérance par la signalisation B7 des cellules dendritiques.....</i>	<i>46</i>
<i>Figure 10 : Lühder F et coll proposent les sites de fixation des anticorps JJ319, JJ316 (reconnaissant le CD28 de rat) et 31.57 ( reconnaissant le CD28 de souris). ....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 11 : Schéma de la construction de la protéine de fusion scFv28.3-HaaT (SC28-Haat).....</i>	<i>57</i>
<i>Figure 12: La tolérance infectieuse. ....</i>	<i>67</i>
<i>Figure 13: Survie des greffons rénaux.....</i>	<i>92</i>
<i>Figure 14: Survie des greffon rénaux. ....</i>	<i>93</i>
<i>Figure 15 : Analyse des capacités prolifératives de différents compartiments cellulaires des rats tolérants (anti-CD28+C<sub>s</sub>A 3mg/kg). ....</i>	<i>94</i>
<i>Figure 16 : Inhibition d'une MLR de base (dont le niveau de prolifération est encadré) par les cellules mononuclées du sang périphérique issues d'animaux tolérants. ....</i>	<i>94</i>

*Figure 17 : Comportement des cellules sanguines des rats traités avec de la CsA..... 95*

*Figure 18 : Le traitement : anti-CD28+CsA (n=5) ou CsA seul (n=2) n'influence pas la production d'alloanticorps chez les rats greffés..... 95*

## Liste des Tableaux

*Tableau 1: Résumé des rejets d'allogreffe chez l'homme..... 12*

*Tableau 2: Résumé non exhaustif des principales voie de costimulation du lymphocyte T..... 18*

*Tableau 3 : Tableau récapitulatif des protéines de la famille CD28/B7 réalisé à partir de plusieurs revues..... 47*

*Tableau 4 : Récapitulatif des réactifs anti-CD28 et de leur mécanismes d'action..... 52*

*Tableau 5: Récapitulatif non exhaustif des caractéristiques des cellules régulatrices T naturelles et induites chez la souris. .... 65*

*Tableau 6: Modèle d'induction de tolérance par blocage des molécules ICAM-1, LFA-1 en transplantation. .... 70*

*Tableau 7: Blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L en transplantation et induction d'une tolérance..... 71*

*Tableau 8: Blocage de la voie de costimulation CD28/B7 en transplantation et induction d'une tolérance..... 72*

*Tableau 9: Analyse du pouvoir régulateur des cellules B7 positives des PBMC issus de rat tolérants..... 128*

## Avant propos :

La transplantation d'organes a connu un succès fulgurant avec la découverte des inhibiteurs de la calcineurine, permettant ainsi l'amélioration et la prolongation de la vie des patients. La greffe est avant tout un acte thérapeutique. Les 3 000 greffes d'organes et près de 25 000 greffes de moelle osseuse, de tissus ou de cellules effectuées chaque année en France, en sont la première traduction. Cependant, l'immunosuppression chronique entraîne un affaiblissement général du système immunitaire du patient, des risques de cancer, et ne protège pas contre le rejet chronique des greffons vascularisés. Il incombe donc aux chercheurs et au corps médical d'affiner les traitements immunosuppresseurs afin d'entraîner un état de tolérance où le greffon ne serait pas rejeté en l'absence d'immunosuppression ou bien sous de très faibles doses d'immunosuppression.

Depuis plus de 50 ans, Billingham RE, Medawar PB et Brent L ont établi le concept de tolérance (Billingham, Brent et al. 1953). La recherche expérimentale sur l'animal a permis de comprendre les grandes phases du rejet de greffe et leurs principaux effecteurs. Comprendre les mécanismes mis en jeu permet de cibler spécifiquement les effecteurs du rejet pour mieux l'éviter. Ainsi, en se dotant de nouvelles molécules immunosuppressives, les chercheurs ont mis au point de nombreux protocoles d'induction de tolérance. Les résultats positifs des expérimentations animales ont permis le développement de molécules utilisables chez l'homme. L'une des immunointerventions majeures pouvant entraîner un état de tolérance, consiste à bloquer spécifiquement l'activation du lymphocyte T en ciblant soit les récepteurs T soit les voies de costimulation.

Dans cette thèse, je vais tout d'abord présenter les différents types de rejets auxquels les patients peuvent être confrontés ainsi que leurs principaux effecteurs. L'importance de la molécule CD28 pour l'activation du lymphocyte T sera ensuite développée. Enfin, différentes stratégies d'induction de tolérance seront décrites et notamment celles visant à bloquer les voies de costimulation comme la voie CD28/B7.



# Introduction

## 1. Le rejet d'allogreffe :

La transplantation de cellules, de tissus ou d'organes entre individus de la même espèce mais génétiquement différents (allotransplantation) active le système immunitaire. Si cette activation n'est pas contrôlée, celui-ci rejette le transplant. Le rejet de greffe est un processus complexe incluant de nombreux facteurs comme la nature du tissu transplanté, le site de transplantation, l'état immunologique du patient ainsi que la disparité génétique entre le donneur et le receveur. Les termes de rejet hyper aigu, rejet aigu, et rejet chronique décrivent et identifient différents aspects de l'activation du système immunitaire aboutissant au rejet du transplant.

### *1.1. Du rejet hyper aigu au rejet chronique :*

Avant même l'intervention du système immunitaire reconnaissant la greffe comme ne faisant pas partie du « soi », le greffon peut montrer des signes de faiblesse et de fragilité. Ainsi la préparation du greffon, son transport, la préparation du receveur, l'ischémie/reperfusion (Weiser, Williams et al. 1996) sont autant de petites agressions non immunologiques qui peuvent l'endommager. Malgré tous les soins apportés à la préparation du greffon et du receveur, ces actes chirurgicaux restent associés à des réponses inflammatoires précoces et non spécifiques.

#### 1.1.1. Le rejet hyper aigu :

Le rejet hyper aigu intervient de quelques minutes à quelques heures après la transplantation. Ce rejet est dû à la présence d'anticorps préformés dirigés contre un ou des alloantigènes du donneur. Ils se lient au tissu greffé et entraînent une coagulation à l'intérieur du greffon. Ces anticorps sont souvent dirigés contre les protéines déterminant les groupes sanguins ou contre les molécules du CMH du donneur. Les personnes présentant de forts taux d'anticorps préformés sont des personnes ayant eu plusieurs transfusions sanguines, ayant déjà été greffées ou s'étant immunisées pendant une grossesse. Grâce aux travaux de Dausset (pour lesquels il a reçu le prix Nobel) et de Tarasaki et al sur la recherche de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur, ce rejet est désormais évité par analyse de la compatibilité

donneur receveur avant la greffe et/ou une absence d'anticorps anti-donneur chez le receveur (crossmatch anticorps). Cependant pour les personnes développant un grand nombre d'anticorps préformés, ce test de compatibilité donneur receveur les laisse souvent sur les listes d'attente pour les greffes. (Cf Tableau 1)

### 1.1.2. Le rejet vasculaire aigu

Le rejet vasculaire fait intervenir des alloanticorps qui ciblent la cellule endothéliale (Steele, Laufer et al. 1996) sans entraîner d'infiltrat cellulaire dans le greffon. La fixation des anticorps sur les cellules endothéliales peut activer le complément qui à son tour activera l'endothélium (Saadi, Holzknrecht et al. 1995). De plus, par l'intermédiaire de l'opsonosation, les macrophages et les cellules natural killer (cellules NK), grâce à leur récepteur au fragment Fc des immunoglobulines, vont se fixer et lyser les cellules endothéliales, provoquant ainsi une ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity). Des atteintes vasculaires comme les thromboses caractérisent ce rejet. Le rejet vasculaire ne présente pas d'un infiltrat cellulaire ((Platt 2000) pour revue).

### 1.1.3. Le rejet aigu :

Le rejet aigu apparaît une semaine après la transplantation dans la plupart des études menées sur les petits animaux. Chez l'homme il survient généralement dans la semaine ou l'année suivant la transplantation. Le rejet aigu est dépendant d'une activation cellulaire T, spécifique du greffon, aboutissant à l'activation de cellules T CD4<sup>+</sup>, de cellules T CD4<sup>+</sup> helper, de cellules T cytotoxiques ((Popov, Fedoseyeva et al. 1995), (Auchincloss, Lee et al. 1993), (Kreisel, Krupnick et al. 2002), (Krieger, Yin et al. 1996), (Pietra, Wiseman et al. 2000)). Après une première activation dans les organes lymphoïdes secondaires (Lakkis, Arakelov et al. 2000), les lymphocytes T réalisent une expansion clonale puis recirculent. Les lymphocytes T allospécifiques peuvent alors être attirés par un contexte proinflammatoire au niveau des cellules endothéliales du greffon lorsqu'il s'agit d'une greffe vascularisée ((Collins, Korman et al. 1984) (Pober and Cotran 1990) (Pober, Orosz et al. 1996) pour revue). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés synthétisent les cytokines proinflammatoires interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et TNF attirant les macrophages responsables de l'infiltration du greffon. Cette réaction d'hypersensibilité retardée est due à deux composantes cellulaires les lymphocytes T-helper de type I (Th-1) activateurs et les macrophages effecteurs. A leur tour, les macrophages vont synthétiser du TNF- $\alpha$  et des molécules de stress comme l'oxyde

nitrique (NO) ou des radicaux libres activant la cellule endothéliale. Ces facteurs altèrent directement le fonctionnement physiologique de la greffe, notamment le tonus et la perméabilité vasculaire, et son intégrité. La barrière endothéliale peut également être affaiblie par l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs). Ces CTLs détruisent le greffon par un contact direct et « mortel » (Kreisel, Krupnick et al. 2002) qui se traduit soit par une activation Fas/FasL soit par exocytose de granzymes et perforine. Les CTLs vont être à l'origine de l'initiation de la destruction des greffons non vascularisés. Les anticorps et les lymphocytes B ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans le rejet aigu puisque des souris agammaglobulinémiques sont capables de rejeter leur greffe de peau dans les mêmes délais que les souris contrôles (Cerny, Ramseier et al. 1988) (Cf Tableau 1).

#### 1.1.4. Le rejet chronique :

Le rejet chronique survient assez tardivement après la transplantation. Ses origines ne sont pas uniquement d'ordre immunologique et restent assez méconnues. Il est caractérisé par une diminution de la lumière des vaisseaux de la greffe liée à un épaissement de leur paroi suite à une prolifération des cellules musculaires lisses. Enfin le greffon est envahi par de la fibrose interstitielle. Aucune thérapie actuellement connue ne peut empêcher le rejet chronique. Lorsque celui-ci survient il est irréversible.

Le nombre de rejets aigus abortifs, contrôlés par les immunosuppresseurs ou les cellules immunitaires elles mêmes, augmente le risque de développement d'un rejet chronique. Le rejet chronique semble être lié à l'activation indirecte des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> alors que leur activation directe semble être liée au rejet aigu (Shirwan 1999). Cependant la présentation directe par les cellules endothéliales aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> semble avoir un rôle dans l'activation chronique du système immunitaire et peut être à l'origine du développement d'un rejet chronique.

Le rôle des alloanticorps dans le rejet chronique reste controversé. Ainsi, chez l'homme, il a été démontré que ces anticorps pouvaient être associés au développement d'un rejet chronique (Coupel, Giral-Classe et al. 2003). Cependant dans de nombreux modèles sur les petits animaux, il n'existe pas toujours de corrélation entre l'apparition d'un rejet chronique et la présence d'alloanticorps. Ainsi dans un modèle de transfusion du sang du donneur avant la greffe, traitement bloquant le rejet aigu mais ne bloquant pas le développement d'un rejet chronique, des anticorps IgG1 anti-molécule de CMH de classe II sont retrouvés (Cuturi, Josien et al. 1994). Alors que dans d'autres études réalisées dans les

mêmes souches de rat, le rejet chronique survient malgré l'absence de développement d'alloanticorps (Guillot, Menoret et al. 2003). Dans un modèle de greffe cardiaque traitée par une molécule recombinante entre la partie Ig d'une immunoglobuline et la molécule de costimulation CD40, l'adéno-CD40Ig, les animaux gardent leur greffon à long terme sans immunosuppression mais développent un rejet chronique important en présence d'alloanticorps (Guillot, Guillonnet et al. 2002). Le blocage additionnel de la voie de costimulation CD28/B7 par un anticorps anti-CD28 ne protège que 50% des animaux contre le rejet chronique (*Guillonnet C, Seveno C et coll en préparation*), animaux chez lesquels les alloanticorps ne sont pas détectables. Le blocage additionnel de la voie de costimulation RANK par un adénovirus (Ad) codant pour RANKIg ne protège pas les animaux contre le développement du rejet chronique mais diminue l'intensité de celui-ci (Guillonnet, Louvet et al. 2004). Enfin le blocage additionnel d'ICOS (molécule de costimulation) par un anticorps anti-ICOS semble protéger du rejet chronique (*Guillonnet C et coll en préparation*). Le rejet chronique possède donc une part immunologique importante en ce sens que différents protocoles d'inhibition de l'activation du lymphocyte T lors de la transplantation semblent avoir des conséquences sur son apparition et sur son intensité.

<i>Type de rejet</i>	<i>Incidence</i>	<i>Survenue</i>	<i>Histologie</i>	<i>Pathologie</i>	<i>Acteurs du rejet</i>	<i>Thérapie</i>
<i>Rejet hyper aigu</i>	<i>Rare <math>\leq 1\%</math></i>	<i>Lors de greffe d'organes vascularisés, quelques minutes après la transplantation</i>	<i>Thrombose accumulation plaquettaire et de neutrophiles, hémorragie.</i>	<i>Cellules endothéliales endommagées, thrombose vasculaire.</i>	<i>Anticorps, complément et activation de la cellule endothéliale.</i>	<i>Aucune</i>
<i>Rejet aigu</i>	<i>Commun 20 à 50% suivant la stratégie thérapeutique</i>	<i>Généralement des la première année après la transplantation</i>	<i>Forte infiltration leucocytaire, oedème nécrose tissulaire</i>	<i>Activation des lymphocytes T par les antigènes du greffon, destruction progressive des tissus infiltrés</i>	<i>Lymphocytes T et macrophages cellules NK et lymphocytes B (alloanticorps ?).</i>	<i>Azatioprine, Stéroïdes, cyclosporine A, FK506, OKT3, mycophenolates mofetil,</i>
<i>Rejet chronique</i>	<i>Commun 50%</i>	<i>De quelques semaines à quelques années après la transplantation</i>	<i>Obstruction des vaisseaux, fibrose interstitielle, infiltration leucocytaire</i>	<i>Activation vasculaire pathologique</i>	<i>Traumatismes vasculaires alloanticorps ? activation des lymphocytes T</i>	<i>Aucune</i>

*Tableau 1: Résumé des rejets d'allogreffe chez l'homme.*

*(d'après Charles Orosz encyclopedia of science, nature publishing group).*

## 1.2. *L'allogénicité :*

La clef de la réponse immune adaptative est la reconnaissance spécifique d'un complexe [CMH du soi]-[peptide du non soi] par le récepteur du lymphocyte T (TCR). Ce concept de restriction du TCR par le CMH découle des expériences de Zinkernagel et Doherty en 1974 dans lesquelles des lymphocytes T spécifiques d'un virus ne pouvaient lyser les cellules infectées que si elles présentaient le même CMH que les lymphocytes T effecteurs (Zinkernagel and Doherty 1974). Les lymphocytes T sont sélectionnés au niveau du thymus pour leurs capacités à reconnaître le CMH du soi. L'allogénicité se caractérise par une diversité des molécules de CMH entre individus d'une même espèce. Dans le contexte d'une greffe, ce concept de restriction est un paradoxe. En effet, comment les cellules T alloréactives peuvent-elles répondre fortement à une molécule de CMH étrangère alors qu'elles n'ont pas été sélectionnées pour la reconnaître ? L'alloréactivité correspond à cet élargissement, à cette réactivité croisée à l'encontre de nouvelles molécules de CMH.

### 1.2.1. Origines moléculaires de l'allorecognition:

#### 1.2.1.1. Structure de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité :

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont des protéines exprimées à la surface des cellules dont la fonction principale est de présenter une grande collection de peptides, dérivés des protéines intracellulaires, aux cellules du système immunitaire. La reconnaissance ou non par un lymphocyte T et l'activation ou non du lymphocyte T découlent de cette présentation.

#### *Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I :*

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I correspondent aux antigènes leucocytaires humains (HLA : Human Leucocyte Antigens) HLA-A, -B, et -C. Chez la souris, ces molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I sont appelées H-2K, D et L et chez le rat RT1-A, -C. Les molécules de CMH de classe I sont exprimées par l'ensemble des cellules des mammifères. Elles présentent des peptides dérivés de protéines intracellulaires dégradées par la cellule elle-même pouvant être des peptides endogènes, ou viraux. Leur principale fonction est de présenter ces peptides aux cellules

lymphocytaires T CD8<sup>+</sup>. Cependant, il existe une présentation dite croisée où les peptides présentés sur les molécules de classe I sont des peptides issus de protéines captées, n'appartenant pas à la cellule qui les présente. Nous y reviendrons dans la partie dédiée à la présentation croisée.

Les molécules de CMH de classe I sont formées par l'association non covalente d'une chaîne légère non polymorphe, la  $\beta$ 2 microglobuline, et d'une chaîne lourde  $\alpha$  polymorphe. La  $\beta$ 2 microglobuline est organisée en deux feuillets  $\beta$  plissés et associés par un pont disulfure. La chaîne  $\alpha$  est formée de trois domaines extra-cellulaires ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3), d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique. Une cavité apparaît entre les bords des hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2) avec pour fond les feuillets  $\beta$  plissés. C'est dans cette poche que se situent les résidus polymorphiques qui vont interagir avec les acides aminés du peptide présenté (Bjorkman, Saper et al. 1987).

*Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II :*

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II correspondent aux antigènes leucocytaires humains HLA-DR, -DP, et -DQ. Chez la souris, ces molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II sont appelées I-A et I-E et chez le rat RT1-D, B, et H. L'expression de la molécule de CMH de classe II est restreinte à certaines cellules de l'immunité dont les cellules dendritiques, les cellules B, les macrophages, les monocytes et à certaines cellules endothéliales dans un contexte d'inflammation (Collins, Korman et al. 1984). Ces molécules de CMH de classe II présentent généralement des peptides exogènes à la cellule à des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, peptides qu'elles ont captés par voie endosomale.

Les molécules de CMH de classe II sont des hétérodimères formés de l'association non covalente de deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  polymorphiques ancrées dans la membrane plasmique. La poche à peptide constituée par les parties extramembranaires des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  est ouverte à ses extrémités, permettant ainsi de charger des peptides plus longs que dans les molécules de CMH de classe I (Bjorkman, Saper et al. 1987).

1.2.1.2. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité :

Les molécules du complexe mineur d'histocompatibilité correspondent à de protéines polymorphiques. Un grand nombre d'antigènes mineurs d'histocompatibilité ont été mis en évidence lors d'un rejet de greffe de peau ou de tumeur entre souris partageant les mêmes

complexes majeurs d'histocompatibilité mais étant de fond génétique différent. Les mêmes découvertes ont été faites chez l'homme lors de rejet de greffe de peau entre des individus identiques pour les HLA (Ceppellini, Mattiuz et al. 1969). Ces antigènes ne sont pas codés dans les mêmes loci que les antigènes majeurs d'histocompatibilité. Les loci des antigènes mineurs d'histocompatibilité codent pour des protéines dont certains peptides peuvent être présentés par les CMH de classe I et II et peuvent ainsi activer les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. La nature exacte de ces molécules demeure mal définie. Notons cependant que la majeure partie des antigènes mineurs d'histocompatibilité est codée au niveau du chromosome Y chez l'homme et chez la souris (Simpson, Scott et al. 2002).

### 1.2.1.3. L'activation du lymphocyte T :

L'activation du lymphocyte nécessite plusieurs signaux entre le lymphocyte T engagé et la cellule présentatrice d'antigènes : tout d'abord une reconnaissance du complexe formé d'une molécule de CMH et d'un peptide par le TCR (signal 1), ensuite des signaux de costimulation (signal 2), et enfin des facteurs de croissance comme l'interleukine 2 (IL-2) (signal 3). Si le lymphocyte T ne reçoit que le signal antigénique (signal 1) ceci est insuffisant pour l'activer pleinement, le lymphocyte T entre alors en état anergique et n'est plus stimuable pour un temps donné (Jenkins, Pardoll et al. 1987),(Jenkins and Schwartz 1987), (LaSalle and Hafler 1994).

#### *Le récepteur du lymphocyte T :*

Les lymphocytes T sont les principaux médiateurs de la réponse immune cellulaire spécifique d'antigène. On peut les différencier par leurs phénotypes, comme l'expression des chaînes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  constituant le récepteur du lymphocyte T (TCR), les corécepteurs CD4 ou CD8 associés au CD3 ou leurs fonctions comme la sécrétion de cytokine, l'aide à l'activation lymphocytaire B. Les chaînes  $\alpha$  ou  $\gamma$  sont formées par la jonction de segments V et J tandis que les chaînes  $\beta$  et  $\delta$  sont codées par les segments VDJ (Chothia, Boswell et al. 1988). Chaque chaîne contient un domaine constant (C) et un domaine variable (V) et chaque domaine variable présente trois régions hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 (CDR : complementarity-determining-region) ; la région CDR3 possède la plus grande diversité structurale de ces trois régions car elle correspond à la jonction entre les segments V, D, et J. La diversité de la région CDR3 s'explique tout d'abord par la diversité combinatoire, c'est-à-dire la recombinaison entre un segment V, un segment D et un segment J et par la diversité



jonctionnelle caractérisée par l'imprécision au niveau du site de coupure des segments VDJ et par l'ajout de nucléotides entre ces différents segments par l'enzyme TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) (pour revue (Davis, Boniface et al. 1998)). Ces deux chaînes composant le TCR n'ont pas de domaine intracellulaire permettant la transduction du signal ; aussi c'est le complexe moléculaire CD3 qui transmet le signal. Enfin, le complexe TCR/CD3 est associé à un corécepteur le CD4 ou le CD8 qui interagit spécifiquement avec la molécule de CMH et participe à la transduction intracellulaire du signal via le TCR/CD3. Suivant le corécepteur CD4 ou CD8 associé au complexe TCR/CD3, le lymphocyte T reconnaîtra respectivement des molécules de CMH de classe II ou de classe I.

*Le signal antigénique :*

Le TCR est associé au corécepteur CD4 ou CD8. Cependant il ne peut pas transduire de signal car il est dépourvu de portion intracytoplasmique fonctionnelle. Son association non covalente avec les molécules CD3  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  permettra la transduction intracellulaire du signal. Le TCR reconnaît un complexe formé d'une molécule de CMH associée à un peptide. Les molécules CD4 et CD8 ne reconnaissent que des régions non polymorphes de la molécule de CMH : ainsi le CD4 reconnaît la molécule de CMH de classe II tandis que le CD8 reconnaît la molécule de CMH de classe I.

Les molécules CD3  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  possèdent un motif spécifique de 16 acides aminés (aa) dénommé ITAM (ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ce motif possède des sites de phosphorylation. La reconnaissance d'une molécule de CMH et d'un peptide entraîne la dimérisation ou l'oligomérisation du TCR et la phosphorylation du motif ITAM (Weiss and Littman 1994). Ainsi, c'est le rapprochement de toutes les sous unités de la molécule CD3 qui permet d'enclencher les cascades de phosphorylation à l'origine de l'initiation du signal antigénique (Chatila and Geha 1988) (Cf Figure).

*Le signal de costimulation :*

Le signal de costimulation augmente l'avidité de l'interaction du lymphocyte T avec la cellule présentatrice d'antigènes. Ensuite, il fonctionne comme un corécepteur amplifiant le signal transduit par le TCR. Enfin, le signal de costimulation, indépendant du signal transduit par les sous unités CD3, produit un signal intracellulaire influençant la réponse cellulaire (Bjorndahl, Sung et al. 1989).

A la fin des années 80, des études ont montré qu'en l'absence de signaux de costimulation, le lymphocyte T devient anergique, incapable de répondre à une nouvelle stimulation. Cet état anergique est transitoire et peut être levé par un apport exogène d'IL-2 (Jenkins, Pardoll et al. 1987), (Jenkins and Schwartz 1987). La voie de costimulation faisant intervenir le CD28 sur le lymphocyte T et les molécules B7-1 et B7-2 sur les cellules présentatrices d'antigènes est majoritaire dans l'activation du lymphocyte T. Etant donné que l'étude de cette voie de costimulation constitue le cœur de notre travail, elle sera la seule à être détaillée dans ce manuscrit. Cependant, le Tableau 2 résume les principales voies de costimulation aidant l'activation du lymphocyte T.

Récepteur sur le lymphocyte T	Ligand(s)	Expression	Action sur	Référence
CD28	B7-1 et B7-2	constitutive	Prolifération, synthèse d'IL-2 survie cellulaire, protection contre l'apoptose.	(Kane, Lin et al. 2002), (Fraser, Irving et al. 1991), (Boise, Minn et al. 1995)
ICOS (inducible co-stimulator)	ICOS-L (B7h)	inductible	Prolifération, expression de cytokines, surexpression de molécules permettant les interactions cellulaires, aide à l'activation lymphocytaire B, forte expression d'IL-10.	(Hutloff, Dittrich et al. 1999)
CD40L (CD154)	CD40	inductible	Activation, sécrétions $INF\gamma$ , $TNF\alpha$ , IL-10	(van Essen, Kikutani et al. 1995), (Blair, Riley et al. 2000)
4-1BB (CD137)	4-1BB-L	Faible expression constitutive, expression inductible après stimulation	Synthèse d'IL-2, prolifération, survie	(Pollok, Kim et al. 1993), (Shuford, Klussman et al. 1997), (Takahashi, Mittler et al. 1999) (Gramaglia, Cooper et al. 2000)
OX40 (CD134)	OX40-L	inductible	Synthèse d'IL-2, prolifération, survie, aide à l'activation lymphocytaire B	(Weinberg, Vella et al. 1998), (Gramaglia, Jember et al. 2000), (Stuber, Neurath et al. 1995)
CD27	CD70	inductible	Activation, développement, aide à l'activation lymphocytaire B	(Gravestein, Amsen et al. 1998), (Takeda, Oshima et al. 2000)

Tableau 2: Résumé non exhaustif des principales voie de costimulation du lymphocyte T

### 1.2.2. Les apports de la cristallographie :

Dans les années 90, différentes approches ont permis de visualiser en détail l'interaction du TCR avec la molécule de CMH et le peptide. Parmi celles-ci, la cristallographie par rayon X a permis de visualiser la structure tridimensionnelle du TCR et de la molécule de CMH. Ainsi les premières structures cristallographiques du TCR ont permis d'identifier trois boucles, correspondant aux trois régions hypervariables (CDR1, CDR2, CDR3), positionnées au niveau du site d'interaction avec la molécule de CMH et le peptide (Bentley, Boulot et al. 1995), (Fields, Ober et al. 1995).

Les boucles CDR1 des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR interagissent avec les parties terminales du peptide et la molécule de CMH, les boucles CDR2 interagissant avec la molécule du CMH (CDR2 $\alpha$  / hélice 2 $\alpha$  du CMH ; CDR2 $\beta$  / hélice 1 $\alpha$  du CMH). La poche CDR3 formée des boucles CDR3  $\alpha$  et  $\beta$  interagit quant à elle avec le peptide (Garcia, Teyton et al. 1999).

Les deux types de molécules du CMH, CMH de classe I et CMH de classe II, possèdent une organisation tridimensionnelle semblable, notamment pour la partie présentant le peptide ( $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 pour les CMH-I et  $\alpha$ 1 et  $\beta$ 2 pour les CMHII) (Madden 1995).

Le TCR adopte une orientation diagonale par rapport à la surface du complexe [CMH de classe I]-[peptide], mais l'identification des jeux d'interactions conservés dictant cette orientation n'est pas claire. L'orientation diagonale a deux avantages : tout d'abord elle place les boucles CDR2 en contact direct avec le CMH, ensuite elle place la région CDR3 juste au dessus du complexe molécule de CMH-peptide permettant ainsi la liaison au peptide (Garboczi and Biddison 1999). Le TCR adopte une orientation orthogonale par rapport à la surface du complexe [CMH de classe II]-[peptide], cette orientation a été déterminée par l'analyse cristallographique de la structure scD10-CA/I-A<sup>k</sup> (chez la souris) (Reinherz, Tan et al. 1999) (Cf Figure 1).

Le contact entre le TCR et le peptide ne fait intervenir que quelques acides aminés. Contrairement aux complexes anticorps/antigène, les surfaces d'interaction du TCR avec la molécule de CMH et avec le peptide sont modérément complémentaires. L'étude de six couples [TCR]-[CMH peptide] différents montre des fluctuations dans l'orientation que le TCR adopte par rapport à la surface de la molécule de CMH liant un peptide ; ainsi sa « torsion » son « enroulement » et son « inclinaison » par rapport au complexe [CMH-

peptide] peuvent varier (Teng, Smolyar et al. 1998). Cette flexibilité du TCR permettrait peut-être d'expliquer l'allorecognition, le TCR s'adaptant à la structure du complexe [CMH-peptide]. De plus la structure tridimensionnelle du TCR change suivant sa liaison ou non à un complexe [CMH-peptide] ; les régions CDR3 entrant en contact avec le peptide ont une structure très flexible, très ajustable.

Au niveau énergétique, plusieurs hypothèses existent : l'interaction TCR/CMH produirait la majorité de l'énergie et l'interaction TCR/peptide une légère augmentation de celle-ci suffisante pour engendrer le signal. L'interaction TCR/peptide pourrait aussi être prédominante et l'interaction TCR/CMH secondaire. L'énergie de liaison entre le TCR et le peptide serait plus faible que celle entre le TCR et le CMH (Rudolph and Wilson 2002). Pour répondre à ces questions, diverses mutations d'un TCR $\alpha\beta$  murin, le TCR 2C, reconnaissant deux complexes [CMH-peptide] différents (syngénique et allogénique) ont été analysées (Kranz, Sherman et al. 1984), (Tallquist, Yun et al. 1996). Ainsi les mutations ciblées des boucles CDR1 et CDR2 connues pour fixer préférentiellement la molécule de CMH ont beaucoup moins altéré la liaison au complexe molécule de CMH-peptide que les mutations de la boucle CDR3 liant uniquement le peptide (Manning, Schlueter et al. 1998), (Lee, Churchill et al. 2000). D'autres études de mutagenèse dirigées ciblant la molécule de CMH et plus spécifiquement ses régions en contact avec le TCR ont donné les mêmes résultats que les études de mutagenèse dirigées contre le TCR 2C. Ainsi les mutations individuelles du CMH ne modifie pas la force de la liaison TCR/molécule de CMH-peptide (Baker, Turner et al. 2001) (pour revue (van der Merwe and Davis 2003)).

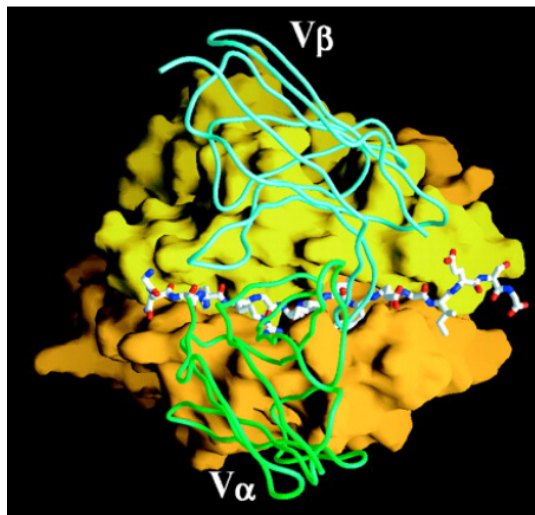
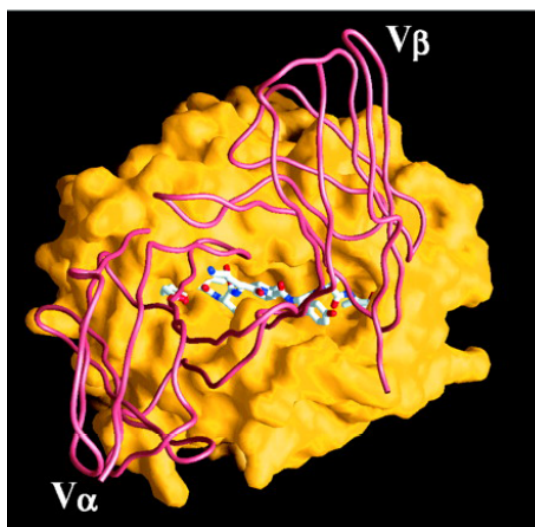


Figure 1: Comparaison de l'orientation adoptée par le TCR.

Le TCR adopte une orientation orthogonale face à un complexe [CMH de classe II-peptide].



Le TCR adopte une orientation diagonale face à un complexe [CMH de classe I-peptide].

### 1.2.3. Comprendre la présentation croisée (cross présentation) :

Nous avons vu dans le paragraphe dédié aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, que le peptide présenté sur les molécules de CMH de classe I était un peptide endogène. Une notion apparue en 1976 élargit la classe peptidique présentée par les molécules de CMH de classe I. En effet Bevan a démontré qu'une protéine antigénique synthétisée et exprimée par une cellule du non soi pouvait être captée par une CPA du soi, présentée sur une molécule de CMH de classe I du soi et engendrée une réponse cytolytique par des CTLs (Bevan 1976). Cette notion de présentation croisée n'est pas restreinte à la transplantation car elle intervient dans les cancers (Huang, Golumbek et al. 1994), les infections virales (Sigal, Crotty et al. 1999) et même avec des molécules du soi (Kurts, Heath

et al. 1996) où les peptides fixés aux molécules de CMH de classe I ne sont pas endogènes à la cellule qui les présente.

L'étude du TCR 2C récepteur d'un lymphocyte T cytotoxique murin spécifique de la molécule de CMH de classe I H-2K<sup>b</sup> (syngénique) a démontré qu'il pouvait être activé suite à une présentation croisée : peptide H-2Ld présenté par une molécule du CMH de classe I du soi (Sha, Nelson et al. 1988).

Un seul TCR peut accommoder sa structure tridimensionnelle à divers peptides pouvant ainsi expliquer les phénomènes de présentation croisée (Garcia, Degano et al. 1998), (Liu, Sun et al. 1993). La présentation croisée peut-être due au fait que, d'une part le TCR ne reconnaît que quelques acides aminés sur la chaîne peptidique, et que d'autre part la structure très flexible de la boucle CDR3 augmente le degré d'accommodation de celle-ci envers différents peptides (Garboczi and Biddison 1999).

#### 1.2.4. L'allorecognition directe :

L'allorecognition directe est définie comme la reconnaissance de molécules intactes de CMH de classe I et de classe II d'une cellule étrangère par les lymphocytes T du receveur. L'allorecognition directe peut avoir lieu lors d'une grossesse ou lors d'une transplantation. La majorité des cellules répondant à une allostimulation le font suite à une stimulation directe de leur TCR par les molécules de CMH allogéniques. Ainsi chez une souris BALB/c (H-2<sup>d</sup>) présentant un rejet aigu après une greffe de peau B10.A (H-2<sup>b</sup>) 90% des cellules alloréactives sont activées de façon directe par les molécules de CMH du donneur (Benichou 1999).

Deux hypothèses sont proposées pour expliquer l'allorecognition directe. Tout d'abord il faut savoir que les résidus polymorphiques des molécules de CMH sont principalement localisés au niveau du site d'ancrage du peptide et très peu au niveau des boucles  $\alpha$  en contact avec le TCR. Ainsi la première hypothèse concernant l'alloréactivité directe suppose que les LT alloréactifs reconnaissent les quelques parties polymorphiques au niveau des boucles  $\alpha$  des molécules de CMH indépendamment du peptide présenté (Housset and Malissen 2003), (Jankovic, Remus et al. 2002). Smith P.A et coll ont démontré, suite à une greffe de peau, l'existence de CTL (Lymphocytes T cytotoxiques) reconnaissant directement la molécule de CMH à la surface de la cellule allogénique de façon peptide indépendante (Smith, Brunmark et al. 1997). Cependant de telles observations sont rares et ne

sont donc pas généralisables. La deuxième hypothèse suggère une reconnaissance [CMH-peptide] impliquant de façon importante la reconnaissance peptidique. Par conséquent, les similitudes entre les boucles  $\alpha$  des molécules de CMH syngéniques et allogéniques sont reconnues par le TCR plutôt que les régions polymorphes des boucles  $\alpha$  (Matzinger and Bevan 1977). Les allopeptides présentés diffèrent d'un individu à l'autre ; le répertoire des peptides sélectionnés est différent du fait des nouvelles contraintes d'ancrages dans les sillons peptidiques des molécules allogéniques ((Whitelegg and Barber 2004) pour revue). Lors de la transplantation c'est une constellation de nouveaux peptides qui sont reconnus par le système immunitaire de l'hôte. L'effet cumulatif de la réponse cellulaire T pour chacun des peptides allogéniques rend compte de la puissance et de la diversité de la réponse allogénique directe.

Des études cristallographiques ont montré que les TCR alloréactifs ont une structure très flexible. Par exemple le TCR murin 2C reconnaît un même peptide présenté par une molécule de CMH du soi H-2K<sup>b</sup> ou une molécule du CMH allogénique H-2K<sup>bm3</sup>. Dans ces deux cas la conformation tridimensionnelle du peptide n'est pas similaire ; la flexibilité de la boucle CDR3 permet néanmoins la reconnaissance (Luz, Huang et al. 2002). Plusieurs études cristallographiques ont ainsi démontré ce que l'on peut qualifier de dégénérescence du système immunitaire (Rudolph and Wilson 2002), (Hennecke and Wiley 2002), (Reiser, Darnault et al. 2003).

Sebille et coll ont démontré que l'activation allogénique directe des LT *in vitro* mobilise plusieurs familles V $\beta$  du répertoire lymphocytaire sans sélection d'une longueur CDR3 donnée. Il s'agit donc d'une réponse face à un ensemble de peptides allogéniques et non pas d'une réponse ciblant quelques peptides (Sebille, Gagne et al. 2001). Suchin et coll ont étudié *in vivo* la fréquence des cellules T alloréactives par transfert de splénocytes et de cellules ganglionnaires préalablement marquées par un fluorochrome cytoplasmique (CFSE) dans des conditions où seul le donneur peut répondre. Trois méthodes ont été utilisées pour quantifier l'alloréactivité :

$$1) \text{ Fréquence des cellules répondeuses} = \frac{\text{Nombre de cellules divisées}}{\text{Nombre de cellules totales (divisées ou non)}}$$

$$2) \text{ Fréquence des précurseurs} = \frac{\text{Nombre de cellules divisées}}{\text{Nombre de cellules utilisées pour le transfert}}$$

$$3) \text{ Fréquence optimale des précurseurs} = \frac{\text{Nombre de cellules divisées}}{\text{Nb de cellules marquées avant l'expansion clonale}}$$



Suivant la méthode utilisée, le pourcentage de cellules alloréactives varie de 1 à 30% (Suchin, Langmuir et al. 2001).

### 1.2.5. L'allorecognition indirecte :

L'allorecognition indirecte correspond à la reconnaissance d'un peptide allogénique du donneur présenté par des molécules de CMH de classe I et de classe II du receveur. Alors que l'allorecognition directe a lieu de façon instantanée, l'allorecognition indirecte nécessite la capture et la présentation d'antigènes exogènes ; elle se fait donc de façon retardée par rapport à l'allorecognition directe.

Nous avons vu dans le paragraphe dédié à la présentation croisée que le TCR 2C murin pouvait reconnaître deux peptides différents (un peptide syngénique et un peptide allogénique) présentés sur une molécule du CMH de classe I H-2K<sup>b</sup> (syngénique) (Sha, Nelson et al. 1988). Il en est de même pour le TCR du clone T humain JL12 qui reconnaît différents peptides liés à une molécule du CMH du soi (HLA-B8). Ces peptides sont d'une part des peptides allogéniques issus des molécules du CMH HLA-B14 et HLA-B35 et d'autre part un peptide issu du virus Epstein-Barr (EBV) (Burrows, Silins et al. 1997). On peut donc supposer que les lymphocytes T reconnaissant les peptides issus de molécules de CMH allogéniques ont préalablement été stimulés par des antigènes étrangers (viraux) présentés à la surface des molécules du CMH du soi. Ainsi les lymphocytes T mémoires, spécifiques du peptide viral, pourront répondre à la présentation d'un peptide allogénique (par mimétisme de ce peptide avec le peptide viral) auquel ils n'ont jamais été confrontés. Par définition les cellules mémoires répondent plus rapidement que des cellules naïves ; elles peuvent donc augmenter l'intensité de l'allorecognition. Pantenburg et coll ont montré chez des souris traitées acceptant une greffe de peau que le seul fait d'être préalablement infectées par la *Leishmania major* induisait un rejet de leur greffe de peau. Cette étude a démontré que des cellules T spécifiques de la cross présentation d'un antigène exogène peuvent être à l'origine d'une allorecognition indirecte et entraîner un rejet de greffe (Pantenburg, Heinzl et al. 2002). La voie de présentation indirecte ne fait pas intervenir que les cellules T mémoires présentées ci-dessus mais elle fait également appel à des réactions alloréactives indirectes *de nov*. Ainsi, Auchincloss H et coll ont démontré que la voie de présentation indirecte est, à elle seule, suffisante pour entraîner la destruction tardive du greffon en absence complète de reconnaissance directe (Auchincloss, Lee et al. 1993).

1.2.6.

## La part du direct et de l'indirect dans le rejet de greffe :

Bolton et coll ont démontré le rôle essentiel des lymphocytes dans le rejet de greffe. Ainsi, chez des souris *nude* dépourvues en cellules T, le greffon allogénique est parfaitement toléré (Bolton, Gracie et al. 1989).

Les lymphocytes T alloréactifs peuvent être activés par deux voies de stimulation différentes, mais non exclusives : les voies directes et indirectes. Les activations directes et indirectes diffèrent par l'origine des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) activant le lymphocyte T et par les mécanismes cellulaires qui en découlent. Différentes approches ont été mises en œuvre pour évaluer la contribution relative de chacune des voies d'allorecognition. Le développement de souris avec un ou plusieurs gènes inactivés (souris « knock-out » KO) et celui de souris chez lesquelles on fait exprimer ou surexprimer un gène (souris transgéniques) rendent possible l'évaluation de la combinaison de ces deux voies d'allorecognition.

L'utilisation de souris immuno-déficientes (SCID, H-2d) a permis d'apprécier le rôle des cellules T CD4<sup>+</sup> dans le rejet de greffe vascularisée. Après avoir vérifié que la déplétion de cellules CD4<sup>+</sup> chez un receveur sauvage empêchait le rejet, Pietra BA et coll ont voulu savoir si ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Balb/c ; H-2d) sont capables à eux seuls de provoquer un rejet en l'absence d'autres cellules lymphoïdes. Pour ce faire, ils ont greffé des souris SCID qui sans traitement acceptent un greffon cardiaque pendant plus de 60 jours. Après un transfert de cellules CD4<sup>+</sup> sauvages (Balb/c ; H-2d), ces souris SCID rejettent leur greffon. Ainsi les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont capables d'entraîner le rejet du greffon en absence de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et de lymphocytes B (Pietra, Wiseman et al. 2000). Puis Pietra BA et coll ont évalué la part du direct et de l'indirect dans le rejet de greffe observé. Par transplantation de cœur C2D (*rag*<sup>-/-</sup>) chez une souris SCID ils se sont assurés du fait que seul le receveur exprimait des molécules de CMH de classe II. Ainsi le transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> sauvage (Balb/c ; H-2d) ne provoque pas de rejet ; ce qui leur permet de conclure que, d'une part les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> induisent le rejet suite à une reconnaissance directe, et que d'autre part la reconnaissance indirecte n'intervient pas dans leur système (les souris SCID exprimant les molécules de classe II) (Pietra, Wiseman et al. 2000). De plus Krieger et coll ont démontré qu'une greffe de cœur ou de peau est acceptée chez des souris CD4 KO alors qu'elle est rejetée après transfert de cellules T CD4<sup>+</sup> ou lorsque la greffe est réalisée chez des souris CD8 KO. Ainsi les cellules T CD4<sup>+</sup> et non les cellules T CD8<sup>+</sup> semblent

initier le rejet (Krieger, Yin et al. 1996). Kreisel et coll ont quant à eux analysé l'activation directe des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>. Les donneurs sont des souris chimères (H-2Kb) n'exprimant plus les molécules de classe I sur les cellules hématopoïétiques (APC) mais exprimant les molécules de classe I sur leurs tissus et leurs cellules endothéliales. Les receveurs, souris BM3 (H-2K), sont déplétés en cellules CD4<sup>+</sup>, ce qui permet l'analyse de l'alloreconnaissance directe du greffon par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Dans ce modèle, le greffon cardiaque est rejeté par un infiltrat lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>. Ainsi les cellules non hématopoïétiques du greffon que sont les cellules endothéliales sont capables d'activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Kreisel, Krupnick et al. 2002). Cette observation laisse donc supposer qu'à long terme, alors que les cellules présentatrices d'antigènes du donneur ne sont plus en vie, les cellules endothéliales du greffon peuvent toujours stimuler de façon directe les cellules T CD4 ou CD8 du donneur car les cellules endothéliales peuvent exprimer la machinerie nécessaire à l'activation lymphocytaire T, à savoir des molécules de CMH de classe I et II et des molécules de costimulation.

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont nécessaires à la commutation de classe des lymphocytes B. Après une greffe de peau de souris déficiente pour les molécules de CMH de classe II, il n'y a pas de variation dans la synthèse d'immunoglobulines IgM et IgG anti-molécule de CMH de classe I du donneur par les plasmocytes du receveur. Par contre l'absence de molécules de CMH de classe II chez le receveur aboutit à la production d'IgM mais pas d'IgG. Ainsi les cellules T CD4<sup>+</sup> activées par la voie indirecte sont des coactivateurs essentiels aux cellules B alloréactives à la fois pour la production d'IgM mais aussi pour la commutation de classe (Steele, Laufer et al. 1996). Enfin l'activation indirecte des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a été démontrée dans de nombreuses études comme dépendante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper (Popov, Fedoseyeva et al. 1995), (Auchincloss, Lee et al. 1993), (Steele, Laufer et al. 1996) (Cf Figure 2).

### 1.2.7. Le rôle des organes lymphoïdes secondaires dans le rejet de greffe :

La stimulation de lymphocytes T naïfs par la voie directe d'alloreconnaissance a tout d'abord été démontrée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions drainant le site de la transplantation) après activation et migration des CPA du donneur. L'utilisation de souris mutées *aly/aly* (n'ayant ni ganglion lymphatique ni plaque de Payer's) ou de souris *Hox11*<sup>-/-</sup> (n'ayant pas de rate) (Roberts, Shutter et al. 1994) a permis de définir le rôle des

organes lymphoïdes secondaires dans le rejet de greffe d'organe vascularisé. Les souris mutées *aly/aly* sont incapables de rejeter une allogreffe de peau (Miyawaki, Nakamura et al. 1994) ce qui tend à démontrer que le rejet de greffe de peau est dépendant de la présence de ganglions lymphatiques. De plus Lakkis et coll ont démontré qu'en l'absence d'organe lymphoïde secondaire (souris *aly/aly* splénectomisées) la greffe d'organe vascularisé était immunologiquement ignorée alors qu'en présence soit de la rate soit des ganglions lymphatiques il y a rejet d'allogreffe. Ceci laisserait suggérer qu'aucune réponse immune ne peut être initiée dans l'organe lui-même. Enfin Larsen et coll ont démontré que les cellules dendritiques du greffon s'activaient pendant leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires et présentaient leur complexe [CMH-peptides] au lymphocytes T de l'hôte (Larsen, Morris et al. 1990). Ces observations illustrent l'implication des différents organes lymphoïdes secondaires en fonction de la greffe considérée et en fonction de la localisation de l'antigène dans l'initiation de la réponse immune.

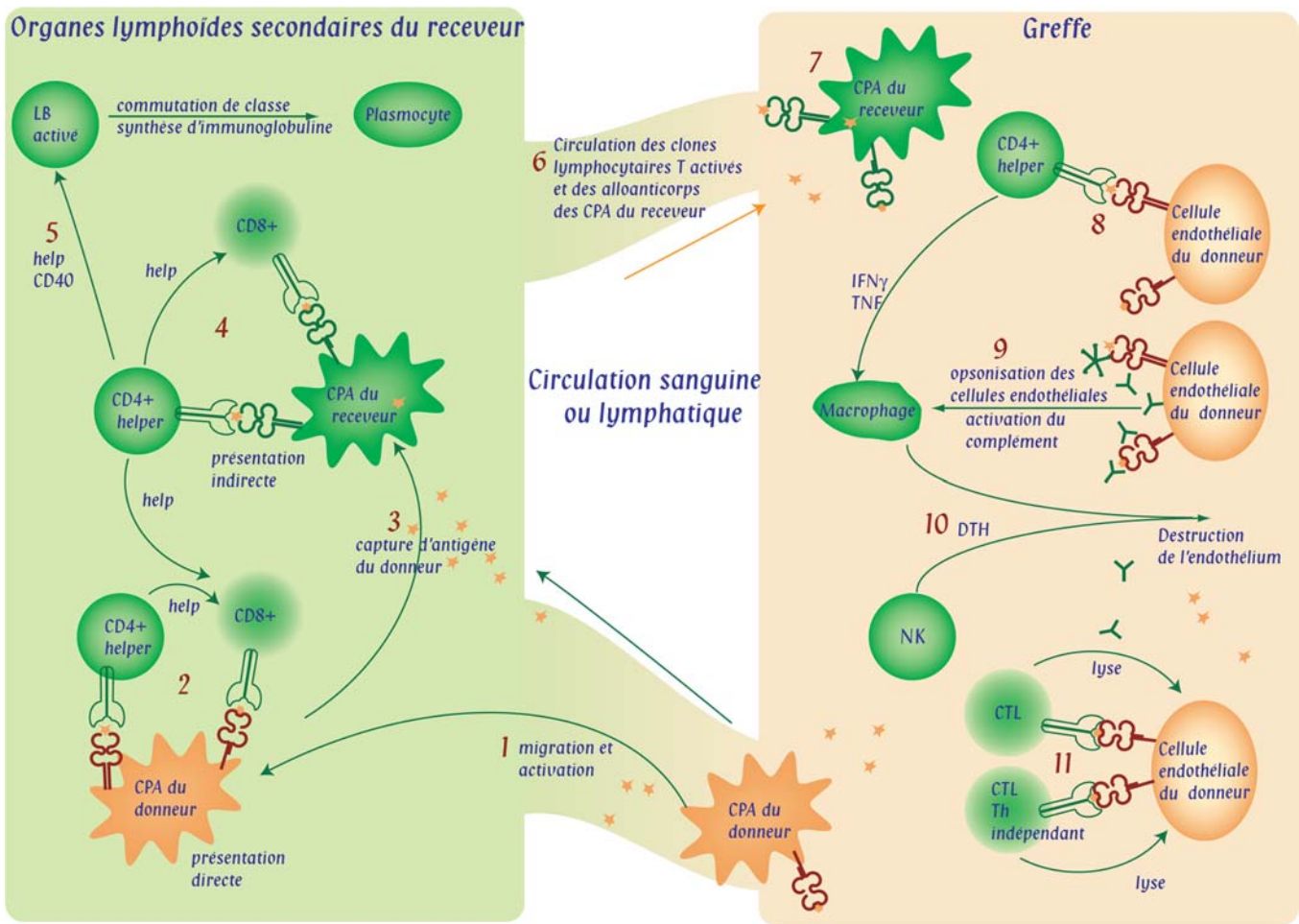


Figure 2: Schéma récapitulatif des voies de présentation directe et indirecte.

Conséquences de l'activation des lymphocytes T sur le rejet de greffe d'un organe vascularisé : Les inflammations précoces et non spécifiques suivant à l'acte chirurgical sont à l'origine de la migration et de la maturation des cellules dendritiques (CPA) de l'organe greffé vers les organes lymphoïdes du receveur (1). Les CPA du donneur vont alors activer par la voie directe des lymphocytes T CD4+ du receveur. Ces lymphocytes T CD4+ (helper) peuvent aider à l'activation par la voie directe de lymphocytes T CD8+ (2). Au sein des organes lymphoïdes, les CPA du receveur peuvent présenter des peptides du donneur sur leurs molécules de CMH de classe I ou II (3). Ainsi, les CPA du receveur peuvent activer par la voie indirecte des lymphocytes T CD4+. Ces lymphocytes T CD4+ (helper) vont permettre l'activation de lymphocytes T CD8+ par les voies directes et indirectes (4). Les CD4+ helper activés de façon indirecte vont permettre la commutation de classe des immunoglobulines et leur synthèse par les plasmocytes grâce à la liaison CD40/CD40L avec des lymphocytes B activés (5). Les lymphocytes activés, les alloanticorps et les CPA du receveur vont circuler et être attirés au niveau du greffon (6). Les CPA du receveur pourront au niveau de la greffe activer des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ (7). Les lymphocytes T CD4+ qui ont recirculé vont être réactivés par les cellules endothéliales activées du greffon (8). Les alloanticorps circulant vont se fixer aux cellules endothéliales activées du greffon ; ils vont opsoniser l'endothélium et activer le complément (9). Les cytokines produites par les lymphocytes T CD4+ ( $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$ ), la présence d'alloanticorps ainsi que l'activation du complément vont permettre le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules NK et engendrer une forte réaction d'hyper sensibilité retardée aboutissant à la destruction de l'endothélium (10). Enfin, le greffon peut également être agressé par la restimulation de CTL.

## 2. Le trinôme CD28/CTLA-4/B7 :

### *2.1. Structure moléculaire et expression :*

Les trois molécules CD28, CTLA-4 et B7 sont des glycoprotéines transmembranaires de type I appartenant à la super famille des immunoglobulines.

Le CD28 est constitutivement et fortement exprimé à la surface de la majorité des lymphocytes T CD4 et CD8 chez la souris (Gross, Callas et al. 1992). Cette expression est suffisante pour induire, après la fixation de B7, un signal de coactivation au signal antigénique. Les cellules NK, les neutrophiles (Venuprasad, Parab et al. 2001) et les éosinophiles (Woerly, Roger et al. 1999) peuvent eux aussi exprimer du CD28. Le CD28 se lie à une paire de molécules B7 sous forme d'un homodimère (Cf Figure 3) grâce à son motif extracellulaire MYPPPY (Linsley, Clark et al. 1990). La liaison aux molécules B7 se fait préférentiellement avec la molécule B7-2 qui est exprimée de façon constitutive sur la cellule présentatrice d'antigènes (CPA) (Freeman, Borriello et al. 1993). Ce niveau d'expression est suffisant pour permettre le signal de costimulation. Le CD28 lie également la molécule B7-1 inducible sur les CPA. Cette liaison aux molécules B7 se fait avec une faible affinité et une forte constante de dissociation (van der Merwe, Bodian et al. 1997), ce qui laisse supposer que l'interaction CD28/B7 sera rapide, laissant par la suite les molécules B7 libres pour une interaction avec la molécule CTLA-4.

Le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen) n'est que faiblement détectable à la surface des lymphocytes T naïfs ou au repos. En effet, il s'agit d'une molécule dont l'expression est inducible suite à une stimulation du lymphocyte (Iida, Ohno et al. 2000). Le CTLA-4 est plus fortement exprimé sur les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Takahashi, Tagami et al. 2000), tandis qu'il peut également être retrouvé sur les lymphocytes B, les cellules souches CD34<sup>+</sup> et les granulocytes à des niveaux d'expression plus faibles (Pistillo, Tazzari et al. 2003). Le CTLA-4 possède lui aussi le motif MYPPPY de liaison aux molécules B7 (Linsley, Brady et al. 1991). Il lie le dimère de molécules B7 sous forme d'un homodimère bivalent contrairement à la molécule CD28 qui se lie sous forme d'un homodimère monovalent. Ainsi le CTLA-4 peut polymériser les molécules B7, formant alors une structure en forme de fermeture éclair (Cf Figure 3). Cette particularité permet au CTLA-4 de lier B7 avec une très forte avidité et une très faible constante de dissociation contrairement au CD28 (Stamper, Zhang et al. 2001).

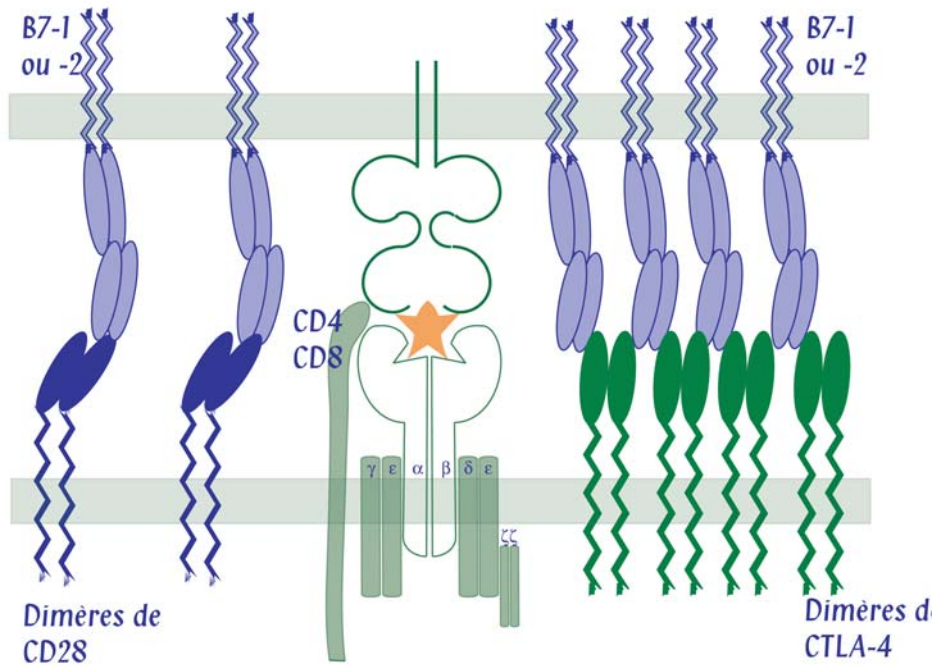


Figure 3: Différence de stabilité et d'organisation des molécules CD28 et CTLA-4.

La molécule CD28 se dimérise et lie un seul dimère de molécule B7. La molécule CTLA-4 s'organise sous forme de dimère bivalent liant deux dimères de molécule B7 et formant ainsi cette structure très stable en forme de fermeture éclair.

Les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) sont exprimées par :

- les cellules B (Freedman, Freeman et al. 1987)
- les cellules dendritiques (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- les macrophages (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- les cellules épithéliales (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- les cellules de Langerhans au niveau de la peau (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- les cellules dendritiques interdigitées au niveau de la zone T de la rate (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- les cellules dendritiques interdigitées dans les ganglions lymphatiques (Vandenberghe, Delabie et al. 1993)
- des cellules dendritiques dans thymus chez le fœtus (Vandenberghe, Delabie et al. 1993).

L'expression des molécules B7-1 ou B7-2 sur les cellules endothéliales varient suivant les espèces et les stimuli. Longtemps considérées comme les ligands des molécules CD28 et CTLA-4, les molécules B7-1 et -2 ont récemment vu leur statut s'élargir. Ainsi, malgré leur court domaine intracellulaire, il a été démontré qu'elles pouvaient transduire un



signal suite à la fixation d'une molécule recombinante le CTLA4Ig (Grohmann, Orabona et al. 2002). Ce rôle de transducteur de signal sera explicité plus en détail ultérieurement.

## 2.2. Les rôles du CD28 et du CTLA-4 dans la réponse lymphocytaire T :

### 2.2.1. Conséquences de l'engagement du CD28 sur le lymphocyte T :

Physiologiquement, la seule liaison de la molécule CD28 aux molécules B7 n'est pas suffisante pour entraîner l'activation du lymphocyte T et conduire à son expansion et à sa différenciation. Le CD28 est donc une molécule de costimulation qui agit en synergie avec le TCR. Sans signal de costimulation, l'engagement du TCR n'entraîne pas non plus l'activation du lymphocyte T (Cf : Figure 4).

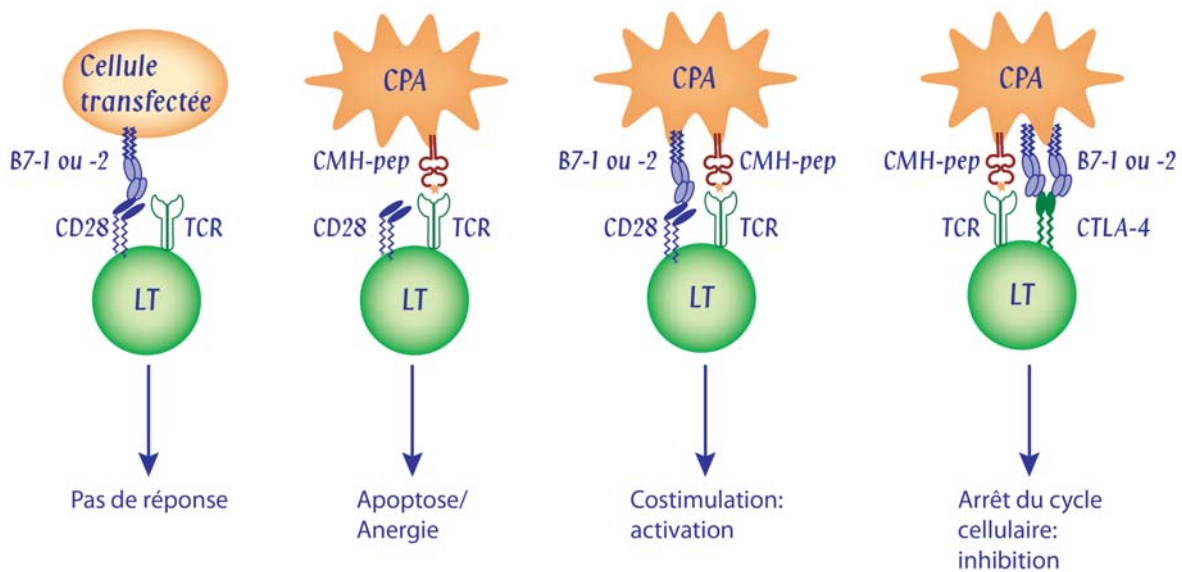


Figure 4: Le devenir du lymphocyte T dépend des engagements moléculaires établis avec la cellule présentatrice d'antigènes.

L'engagement seul de la molécule CD28 par la molécule B7 n'entraîne aucune réponse au niveau du lymphocyte T. L'engagement seul du TCR n'est pas suffisant pour activer pleinement le lymphocyte T. Celui-ci entre alors, soit dans un état anergique rendant le lymphocyte T insensible à une nouvelle stimulation pendant un certain temps, soit dans un état d'apoptose. L'engagement conjoint du TCR et du CD28 entraîne la pleine activation du lymphocyte T. Enfin, une fois activée, la cellule T augmente l'expression en surface de la molécule CTLA-4, qui inhibe le lymphocyte T, bloque sa prolifération et contrôle ainsi la réponse immune.

### 2.2.1.1. CD28 et sélection thymique :

Les lymphocytes T se différencient au sein du thymus où ils sont confrontés à une sélection négative et à une sélection positive. La sélection négative (une délétion) touche les lymphocytes T qui reconnaissent trop fortement un complexe [peptide du soi]-[CMH du soi]. Le rôle de la voie de costimulation CD28/B7 dans la sélection thymique est controversé. Walunas TL et coll ont utilisé des souris transgéniques pour un TCR  $\gamma\delta$  (G8). Ces lymphocytes T G8 sont sélectionnés positivement chez des souris d'haplotype H-2d et négativement (délétion) chez des souris d'haplotype H-2b. Pour déterminer le rôle de la molécule CD28 dans la sélection thymique, ces souris H-2d/G8 et H2-b/G8 ont été croisées avec des souris CD28KO (H-2d ou H-2b). Dans l'environnement H-2d favorisant une sélection positive, un nombre équivalent de lymphocytes T G8 est retrouvé dans la rate de souris possédant la molécule CD28 et dans les souris CD28KO. De même, dans un environnement H-2b favorisant la déplétion, les lymphocytes T G8 ne sont que très faiblement exprimés dans les splénocytes des souris possédant la molécule CD28 et dans les souris CD28KO. Ces résultats suggèrent que la molécule CD28 n'est pas nécessaire à la sélection positive ou négative des lymphocytes T $\gamma\delta$  (G8) (Walunas, Sperling et al. 1996). Une étude plus récente utilise des souris dont le génome contient le gène du superantigène Mtv (mammary tumor viruses). La présence de ce superantigène constitue un modèle d'étude de la sélection thymique négative. Les souris possédant le superantigène Mtv-6 n'ont plus de lymphocytes T V $\beta$ 3<sup>+</sup>, les souris Mtv-8 et Mtv-9 n'ont plus de lymphocytes T V $\beta$ 11<sup>+</sup> et V $\beta$ 12<sup>+</sup>. Pour analyser le rôle du trinôme CD28/CTLA-4/B7 dans la sélection thymique, ces souris ont été croisées avec des souris KO pour B7-1, B7-2 et pour CD28. La délétion thymique des lymphocytes T V $\beta$ 3<sup>+</sup>, V $\beta$ 11<sup>+</sup> et V $\beta$ 12<sup>+</sup> n'a plus lieu lorsque les molécules B7-1 et B7-2 sont absentes. Par contre, l'absence de molécules CD28 empêche uniquement la délétion des clones V $\beta$ 11<sup>+</sup> et V $\beta$ 12<sup>+</sup>. La molécule CD28 agit donc différemment sur la délétion des clones V $\beta$ 11<sup>+</sup> et V $\beta$ 3<sup>+</sup>. Une différence d'avidité entre le superantigène Mtv-8 pour le TCR V $\beta$ 11<sup>+</sup> et le superantigène Mtv-6 pour le TCR V $\beta$ 3<sup>+</sup> peut expliquer la nécessité ou non de la liaison CD28/B7 pour engendrer la délétion (Buhlmann, Elkin et al. 2003). L'étude de thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> a permis de montrer que l'engagement d'un TCR de faible avidité provoque un flux calcique entrant biphasique associé à la survie et donc à une sélection positive. Par contre, un flux calcique entrant monophasique et de plus forte intensité est observé après l'engagement d'un TCR de forte avidité et conduit à la délétion du lymphocyte. Lorsque la

molécule CD28 est engagée en présence d'un signal TCR de faible avidité, le flux calcique entrant est monophasique et plus intense. Ainsi l'engagement du CD28 peut convertir un signal TCR de faible avidité en un signal de forte avidité conduisant à délétion du lymphocyte (Freedman, Liu et al. 1999), (Teh and Teh 2001). Les expérimentations réalisées par Walunas TL et coll faisaient peut-être intervenir des liaisons [TCR]-[CMH-peptide] d'une avidité suffisante pour induire la délétion. Dans ses conditions, la liaison CD28/B7 n'a probablement pas un rôle primordial lors du processus de délétion. L'étude des souris CD28KO conforte l'idée que le rôle du CD28 dans la délétion thymique est d'abaisser le seuil d'activation d'un lymphocyte T de faible avidité pour le complexe [CMH du soi]-[peptide du soi] présenté. Les souris CD28KO possèdent un thymus plus gros que les souris sauvages. Ainsi les souris CD28KO possèdent plus de thymocytes que les souris sauvages et présentent un défaut de délétion des thymocytes de faible avidité car la liaison CD28/B7 qui abaisse le seuil d'activation du TCR n'est pas fonctionnelle (Noel, Alegre et al. 1998). Chez les souris CD28KO, l'avidité moyenne des TCR et donc aussi des TCR allogéniques, est probablement plus faible que chez une souris sauvage. Le répertoire d'une souris CD28KO serait donc différent de celui d'une souris sauvage.

#### 2.2.1.2. CD28 et seuil d'activation du TCR :

Viola et Lanzavecchia ont analysé le seuil d'activation de lymphocytes T humains  $V\beta 2$  en comparant trois ligands. Les trois ligands induisent une internalisation du TCR, avec une cinétique différente. Le même seuil d'activation a été détecté pour la synthèse d'IFN $\gamma$  et la prolifération suite à une activation par ces ligands. Viola et Lanzavecchia en concluent que le lymphocyte T « compte » le nombre de ses TCR engagés. Ainsi, le lymphocyte T répond si le seuil est atteint, et ce, de façon indépendante de la nature du stimulus. Lors d'une stimulation des lymphocytes T  $V\beta 2$ , le seuil d'activation de ces lymphocytes T diffère suivant la présence ou non de cellules exprimant la molécule B7-1. Ainsi, la voie de costimulation CD28/B7 diminue le seuil d'activation du TCR en renforçant la synapse immunologique (Viola and Lanzavecchia 1996). En effet, en quelques minutes des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine) mises en présence de cellules L exprimant la molécule B7-1 entrent en contact. Progressivement (après 15 à 30 min) le CD28 s'accumule au niveau de la zone de contact avec la cellule L présentant des molécules B7-1. La Figure 5 illustre ce phénomène TCR indépendant (Acuto, Mise-Omata et al. 2003). D'après les auteurs cette

observation ne peut être faite si les 30 derniers acides aminés C-terminaux du CD28 sont délétés.

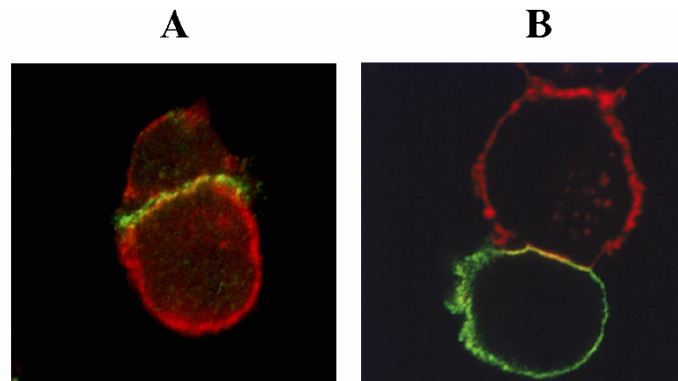


Figure 5: Accumulation du CD28 au niveau de la zone de contact entre deux cellules.

Le CD28 s'accumule au niveau de la zone de contact étroit entre la cellule T et la cellule L. Des cellules Jurkat (lignée lymphocytaire T humaine) ont été incubées avec des cellules L exprimant la molécule B7-1 (531-B7) A, ou bien avec des cellules L n'exprimant pas de B7-1 (531) B, pendant 20 minutes à 37°C. L'anticorps FITC anti-CD28 montre bien l'accumulation du CD28 au niveau de l'interaction entre les deux cellules lorsque les cellules L expriment la molécule B7-1. L'actine, en rouge, est marquée après une perméabilisation de la membrane par la phalloïdine-TexRed (Acuto, Mise-Omata et al. 2003).

### 2.2.1.3. CD28 et synapse immunologique :

Le contact entre un lymphocyte T et une CPA fait intervenir des liaisons moléculaires et provoque un rapprochement localisé entre ces deux cellules. Cette zone de contact est appelée « synapse immunologique ». La reconnaissance entre le TCR et la molécule de complexe majeur d'histocompatibilité est un phénomène actif induisant un réarrangement dans la distribution des molécules de surface et aboutissant à la formation d'une synapse immunologique. Avant l'activation, les molécules sont regroupées en amas à la surface de la cellule. La liaison du TCR provoque un flux entrant de  $Ca^{2+}$  à l'origine du regroupement des amas moléculaires (Grakoui, Bromley et al. 1999). Une augmentation du flux calcique entrant est observée après l'engagement du CD28 (Grakoui, Bromley et al. 1999), (Wulfing and Davis 1998), associé à celui provoqué par le TCR, permet le transport des amas de molécules de surface jusqu'à la synapse immunologique. Ce transport est dépendant de l'actine et de la myosine (Wulfing and Davis 1998). L'enrichissement cytoplasmique en protéine kinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) localisée juste sous la synapse immunologique et essentiel à la transduction du signal via le TCR n'est plus observé chez des souris CD28 KO (Huang, Lo et al. 2002). Enfin, l'engagement du CD28 induit le recrutement de radeaux lipidiques enrichis en glycosphingolipides et en cholestérol. Ces radeaux lipidiques sont

riches en molécules de liaison telles que la molécule LAT (linker for activation of T cell) est en protéines kinases telles que p56<sup>lck</sup> et p59<sup>fyn</sup> essentielles à la transduction du signal via le TCR (Martin, Schneider et al. 2001). La formation de la synapse immunologique constitue l'origine de la réponse immune car elle permet de co-localiser les acteurs du signal issu du TCR. Il a été démontré que le CD28 est un acteur essentiel de la formation de ces synapses immunologiques. Ainsi le regroupement des TCR au sein de la synapse immunologique est dépendant de l'engagement de CD28. Wülfing C et coll ont montré que le blocage de l'interaction CD28/B7 par des anticorps anti-B7 entraînait une diminution de l'accumulation des TCR au niveau de la zone de contact intercellulaire et que cette accumulation était transitoire et diffuse (Wulfing, Sumen et al. 2002). De même, la surface de la synapse immunologique, sa forme, et la densité moléculaire sont altérées lorsque l'interaction CD28/B7 est bloquée (Wetzel, McKeithan et al. 2002).

#### 2.2.1.4. CD28 et activation de facteurs de transcription :

Le signal transduit via le TCR active massivement les facteurs de transcription tels que NF-AT, NF- $\kappa$ B, et AP-1, essentiels pour l'expression précoce de gènes dans la cellule stimulée. En augmentant le flux calcique entrant, la liaison des molécules CD28/B7 permet d'activer des enzymes calcium dépendantes responsables de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-AT (nuclear factor of activated T cell) (Diehn, Alizadeh et al. 2002). Cet effet est dû à une augmentation de l'activation de la phospholipase PLC $\gamma$ -1 dépendante du signal CD28/B7. Les promoteurs des gènes codant pour le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulation factor) et l'IL-2 contiennent des régions de 10pb, appelées CD28 response element, dont l'activation dépend du signal de costimulation émis par la molécule CD28. L'engagement du CD28 induit également l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) ((Acuto, Mise-Omata et al. 2003) pour revue). L'utilisation d'un gène codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur dépendant de la fixation d'AP-1 (activator protein-1) a permis à Rincon M et coll de démontrer que la fixation d'AP-1 sur le promoteur était dépendante du flux calcique entrant (additionnel à celui provoqué par l'engagement du TCR) et donc de la liaison CD28/B7 (Rincon and Flavell 1994). Le facteur de transcription AP-1 peut à lui seul engendrer l'activation d'un gène, mais il a été démontré qu'il pouvait également s'associer au facteur NF-AT ou NF- $\kappa$ B pour activer la transcription du gène codant pour l'IL-2 (Kane, Lin et al.

2002), (Fraser, Irving et al. 1991). Cette synergie permet une pleine activation du lymphocyte T, l'IL-2 constituant le signal 3 d'activation du lymphocyte (Cf Figure 6).

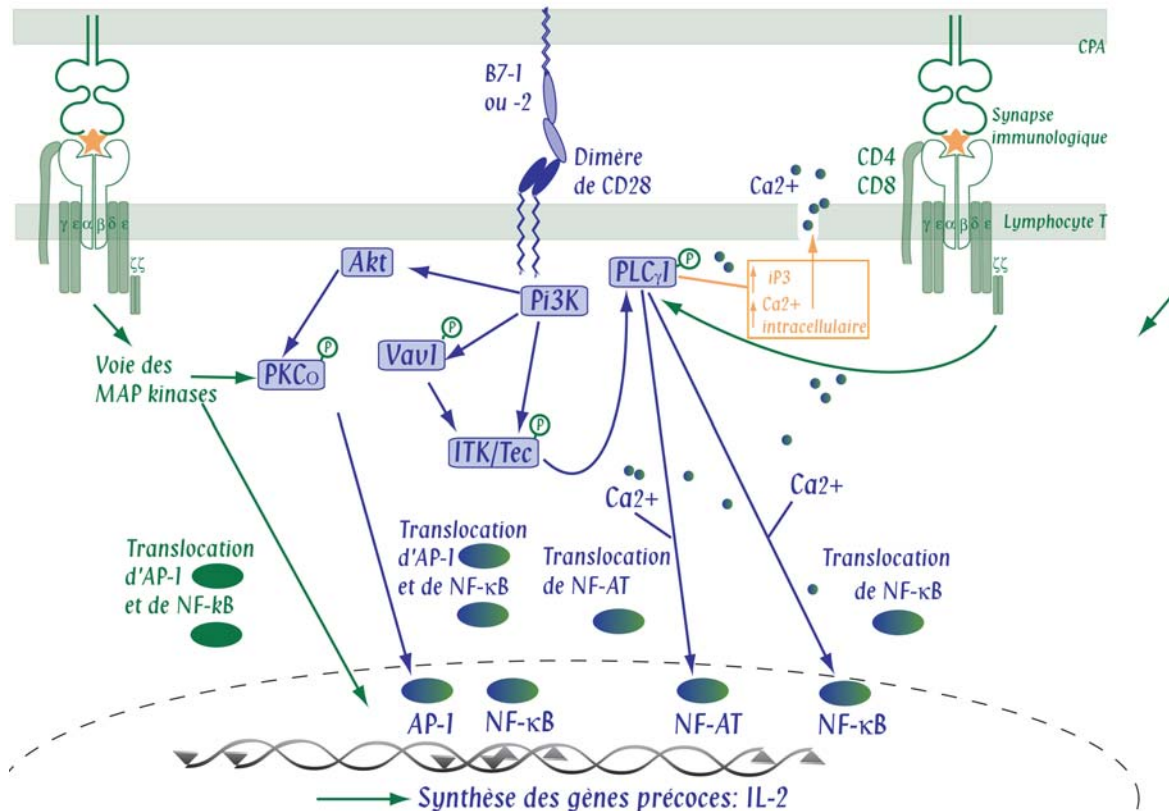


Figure 6: Schéma récapitulatif du signal issu du CD28 induisant la translocation de facteurs de transcription.

L'activation lymphocytaire T nécessite une reconnaissance TCR-[CMH-peptide] ainsi qu'une activation du CD28 par fixation aux molécules B7. Le signal issu du CD28 possède des composantes majeures qui sont une augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de la protéine Pi3K et l'activation de la PLC $\gamma$ . Le recrutement de radeaux lipidique va permettre de co-localiser au niveau de la synapse immunologique de nombreuses molécules essentielles à la transduction du signal. La liaison du CD28 active la Pi3K qui va recruter et activer Vav1 (phosphorylation). Vav1 va permettre l'activation de ITK/Tec d'une part et le réarrangement du cytosquelette à l'origine du recrutement des radeaux lipidiques d'autre part. L'activation du CD28 entraîne la modification conformationnelle de la PLC $\gamma$ . L'activation de la PLC $\gamma$  entraîne une augmentation de la concentration d'inositol triphosphate à l'origine du relargage du Ca $^{2+}$  des vésicules intracellulaires dans le cytoplasme. Cette augmentation du Ca $^{2+}$  intracellulaire permet l'ouverture des canaux calciques et l'entrée massive de Ca $^{2+}$  dans la cellule. La translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et NF-AT est réalisée par la PLC $\gamma$  calcium dépendante. La translocation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B peut être réalisée par la PKC $\theta$ , calcium indépendant. Toute cette signalisation issue de l'activation du CD28 est également sous la dépendance du TCR, en effet, le signal du CD28 amplifie des signaux qui émanent du TCR. (Schéma réalisé d'après la revue (Acuto, Mise-Omata et al. 2003)).

### 2.2.1.5. CD28 et survie cellulaire :

L'engagement du TCR peut induire la survie ou la mort du lymphocyte T suivant la présence ou non du signal de costimulation. Il a été démontré que le signal émanant du CD28 est à l'origine d'une protection active contre la mort cellulaire car il augmente l'expression de Bcl-xl, molécule anti-apoptotique (Boise, Minn et al. 1995). L'activation de la PKB et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B semblent être liée à cette surexpression de Bcl-xl (Jones, Parsons et al. 2000). Noel PJ et coll ont démontré que l'addition d'anticorps anti-CD28 à une stimulation de lymphocytes T par des anticorps anti-CD3 augmente la survie de lymphocytes T sauvages mais n'augmente pas la survie de lymphocytes T issus de souris CD28KO. L'ajout de CTLA4Ig dans le milieu de culture entraîne une diminution de la viabilité des lymphocytes T sauvages. La voie de costimulation CD28/B7 est à l'origine la survie des lymphocytes sauvages dans ce contexte. L'ajout d'un inhibiteur des caspases bloque l'entrée en apoptose des cellules T dont le TCR est engagé sans signal de costimulation. Ainsi l'engagement du CD28 induit des signaux essentiels à la survie des lymphocytes T naïfs activés pour la première fois (Noel, Boise et al. 1996). Une nouvelle stimulation de lymphocytes T récemment activés aboutit à une entrée en apoptose de ces lymphocytes. Il s'agit ici d'un processus appelé AICD (activation induced cell death). L'AICD joue un rôle extrêmement important dans le contrôle de la réponse immune en empêchant l'emballement du système immunitaire. Cette AICD est dépendante des interactions Fas-FasL et de l'interaction TNF $\alpha$ -TNFR2. Ainsi, des cellules activées pendant 48 heures sont plus sensibles à l'entrée en apoptose par la voie TNF $\alpha$ -TNFR2. Cette liaison TNF $\alpha$ -TNFR2 entraîne une diminution de l'expression d'ARNm codant pour la molécule Bcl-xl. Un signal de costimulation via la molécule CD28 protège la cellule de l'apoptose induite par la voie TNF $\alpha$ -TNFR2, et restaure l'expression de Bcl-xl (Lin, Hwang et al. 1997). D'autre part le CD28 protège la cellule d'une apoptose FAS/FASL dépendante (Collette, Razanajaona et al. 1997). L'activation de cellules issues de la lignée DWT6.11 (hybridome stable de cellules T murines transfectées par de l'ADNc de CD28 humain) par des anticorps anti-CD3 entraîne une augmentation de la synthèse d'ARNm codant pour le FasL. La stimulation de ces cellules par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 prévient cette augmentation de synthèse d'ARNm codant pour la FasL. Le CD28 inhibe donc l'expression de FasL qui dépendant de l'engagement du CD3 (Collette, Razanajaona et al. 1997). Ainsi, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de souris CD28KO montrent une plus grande susceptibilité à une apoptose Fas-FasL dépendante (Kishimoto and Sprent



1999). La liaison Fas/FasL peut entraîner deux types d'activation. Le type I induit l'activation d'un grand nombre de procaspases-8 permettant la cascade d'activation des caspases. Le type II induit une faible activation des procaspases-8 et fait intervenir la mitochondrie pour amplifier ce signal. L'activation de type II peut être inhibée par la surexpression de Bcl-2 et Bcl-xl (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Une surexpression de la molécule c-FLIP<sub>S</sub> est détectable après la stimulation du CD28. Cette molécule c-FLIP<sub>S</sub> tout comme la molécule c-FLIP<sub>L</sub> empêche l'activation des procaspases-8. La molécule c-FLIP<sub>S</sub> contribue donc à l'effet antiapoptotique de la voie de costimulation CD28/B7 (Kirchhoff, Muller et al. 2000). Enfin, la liaison des molécules CD28/B7 permet la synthèse de l'ARNm codant pour l'IL-2 (Kane, Lin et al. 2002) et apporte donc un facteur de survie essentiel aux lymphocytes qui ont été activés.

### 2.2.2. Conséquences de l'engagement du CTLA-4 sur le lymphocyte T :

Le CTLA-4 est un inhibiteur du signal transduit par le TCR. Son rôle est important pour prévenir l'auto-immunité et pour contrôler des réponses cellulaires T. Des souris déficientes en CTLA-4 développent spontanément un désordre lymphoprolifératif s'accompagnant de l'infiltration de nombreux organes par des lymphocytes T activés de façon polyclonale (Waterhouse, Penninger et al. 1995), (Tivol, Borriello et al. 1995). Les réponses auto-immunes présentes chez les souris CTLA-4 KO sont les conséquences d'une absence de contrôle de la voie de costimulation CD28/B7. Ainsi, des souris doubles KO pour les molécules CTLA-4 et CD28 ne présentent plus de désordres lymphoprolifératifs, d'infiltrats tissulaires, ou d'activation polyclonale de leurs lymphocytes T (Mandelbrot, Oosterwegel et al. 2001). De plus des souris KO pour les molécules CTLA-4, B7-1 et B7-2 sont viables et ne présentent plus les dommages présentés par les souris CTLA-4 KO (Mandelbrot, McAdam et al. 1999). Toutes ces expériences montrent le rôle inhibiteur primordial de la voie CTLA-4/B7 sur le contrôle de la voie de costimulation CD28/B7.

#### 2.2.2.1. Mise en surface de la molécule CTLA-4 :

Le CTLA-4 est localisé au niveau intracellulaire près du centre organisateur des microtubules (MTOC) ; ainsi sa mise en surface nécessite la réorganisation du cytosquelette et est dépendante de l'engagement du TCR et du CD28 (Alegre, Noel et al. 1996). Egen JG et coll ont démontré que l'accumulation du CTLA-4 au niveau de la synapse immunologique était proportionnelle à la force du signal TCR/CMH-peptide (Egen and Allison 2002); de plus

cette accumulation dépend de la tyrosine Y<sup>165VKM</sup> du motif intra-cellulaire de la molécule CTLA-4 (Leung, Bradshaw et al. 1995). La phosphorylation de Y<sup>165VKM</sup> permet la dissociation entre les vésicules contenant le CTLA-4 et la molécule AP50, un constituant du manteau de clathrine entourant la vésicule endosomiale, et donc la mise en surface des molécules contenues dans la vésicule endosomiale (Zhang and Allison 1997). Le CTLA-4, lui aussi localisé au niveau de la synapse immunologique lors de l'interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide, se retrouve proche de la molécule CD28 ce qui laisse supposer une éventuelle compétition pour la liaison aux molécules B7 (Egen and Allison 2002). Il a récemment été démontré que la localisation du CTLA-4 dans la synapse immunologique dépend de sa fixation à la molécule B7-1 (Pentcheva-Hoang, Egen et al. 2004). Ainsi le CTLA-4 peut inhiber l'activation du lymphocyte T par un mécanisme passif (dû à la forte affinité de la molécule CTLA-4 pour les molécules B7 par rapport aux molécules CD28) et par un mécanisme actif impliquant la transduction d'un signal intracellulaire.

#### 2.2.2.2. Inhibition du signal transduit par le TCR :

La liaison du TCR au complexe CMH-peptide induit une transduction de signal via les corécepteurs CD3. Cette transduction est réalisée par une cascade de phosphorylation ciblant tout d'abord les motifs ITAM sur toutes les chaînes polypeptidiques du TCR à savoir les chaînes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  et la molécule ZAP-70. L'engagement du CTLA-4 inhibe la liaison de la tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> avec ZAP-70. Cette inhibition peut-être liée à la présence de tyrosines phosphatases de type 1, connues pour inhiber de nombreux signaux de transduction au sein des cellules hématopoïétiques, sur la partie intracytoplasmique de la molécule CTLA-4 (Guntermann and Alexander 2002), (Plas, Johnson et al. 1996). De plus, le CTLA-4 inhibe le recrutement des radeaux lipidiques permettant le rapprochement des protéines kinases essentielles à la transduction du signal via le TCR (Martin, Schneider et al. 2001). Le CTLA-4 agit ainsi tel un frein dès le début de la cascade de phosphorylation qui correspond à la transduction du signal antigénique. Le CTLA-4 a également des effets sur l'activation massive de facteurs de transcription consécutive à l'engagement du TCR et du CD28. Ainsi il a 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- $\kappa$ B et AP-1 (Olsson, Riesbeck et al. 1999), (Pioli, Gatta et al. 1999). La synthèse d'IL-2, activée par les liaisons TCR/CMH-peptide et CD28/B7, est inhibée suite à l'engagement du CTLA-4 qui empêche l'activation des facteurs de transcription nécessaires à cette synthèse (Cf : Figure 7). Enfin, le CTLA-4,

constitutivement exprimé sur les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, est essentiel à leur fonction lors de l'activation du TCR, mais les mécanismes impliqués restent méconnus (Takahashi, Tagami et al. 2000).

### 2.2.2.3. Blocage de la prolifération et apoptose :

Les conséquences de l'activation du CTLA-4 à la surface de lymphocyte T dépendent de l'état d'activation de ce même lymphocyte. La liaison CTLA-4/B7 inhibe la réponse proliférative de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et bloque ces cellules entre les phase G0 et G1 du cycle cellulaire (Blair, Riley et al. 1998). Ce blocage est dû à l'inhibition de la production de protéines impliquées dans la progression dans le cycle cellulaire, comme les cyclines D3 et cdk4, partiellement dépendantes de l'IL-2, et la cycline cdk6, indépendante de l'IL-2. Enfin, le CTLA-4 protège la protéine p27 inhibitrice du cycle cellulaire, d'une dégradation (Brunner, Chambers et al. 1999). Lorsque le CTLA-4 est engagé sur des lymphocytes T activés, les conséquences ne sont plus un arrêt du cycle cellulaire, mais une entrée en apoptose. Ainsi le CTLA-4 induit une apoptose indépendante de l'activation de la voie Fas lorsqu'il s'agit de lymphocytes T préactivés (Scheipers and Reiser 1998) (Cf : Figure 7).

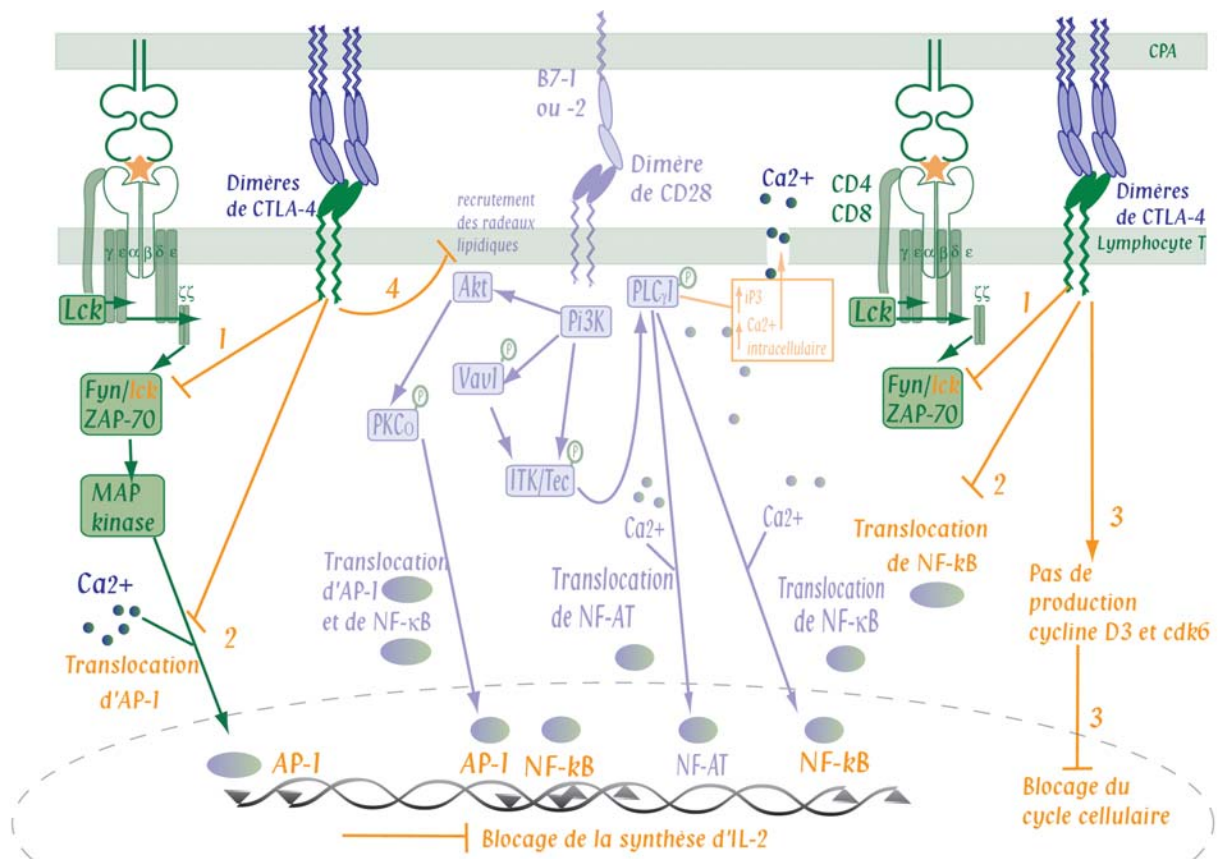


Figure 7: Schéma récapitulatif des signaux inhibiteurs issus du CTLA-4.

L'engagement du CTLA-4 induit le recrutement de phosphatases qui vont déphosphoryler la protéine kinase  $p56^{lck}$  l'empêchant ainsi de se lier à ZAP70 ce qui provoque un arrêt de la cascade de phosphorylation (1). La cascade de phosphorylation à l'origine du recrutement et de l'activation des  $PLC\gamma-1$  et  $PKC\theta$  n'étant plus active, il n'y a plus de translocation des facteurs de transcription AP-1, NF- $\kappa$ B. Il n'y a donc plus de synthèse d'IL-2 (2). Le CTLA-4 bloque le lymphocyte T entre les phases G0 et G1 du cycle cellulaire (3), et empêche le recrutement de radeaux lipidiques (4).

### 2.2.3. Les molécules CTLA4Ig :

Pour étudier les propriétés de la molécule CTLA-4 et notamment pour découvrir ses ligands, P Linsley a construit une molécule de fusion entre la partie extracellulaire de la molécule CTLA-4 et la portion Fc d'une immunoglobuline : le CTLA4Ig (Linsley, Brady et al. 1991) (Cf Figure 8). Grâce à cette protéine recombinante, les molécules B7-1 et -2 ont été décrites comme les ligands de la molécule CTLA-4. Cette molécule a également été utilisée pour bloquer le signal de costimulation CD28/B7 par blocage des molécules B7 (Linsley, Wallace et al. 1992). L'intérêt thérapeutique du CTLA4Ig s'est développé, il est d'ailleurs testé cliniquement en phase II (Abrams, Lebowhl et al. 1999).

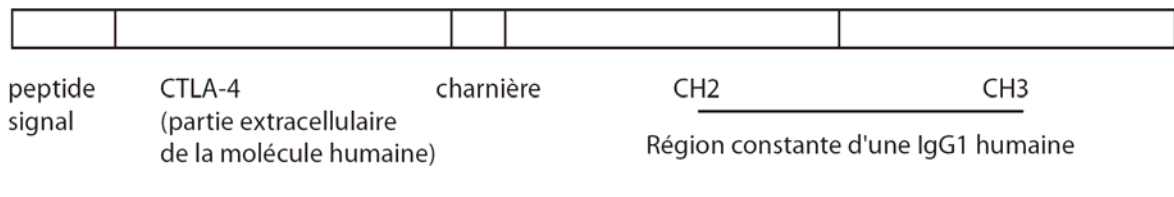


Figure 8 : Schématisation de la construction des molécules BMS-188667 et BMS-224818.

La molécule BMS-188667 (Abatacept) correspond à la molécule CTLA4Ig originelle. La partie CTLA-4 de la molécule CTLA4Ig de première génération correspond exactement à la portion extracellulaire du CTLA-4 humain. Le CTLA4Ig (BMS-188667) lie la molécule B7-2 avec une avidité quatre fois plus faible que lorsqu'il se lie à la molécule B7-1 (Moreland, Alten et al. 2002).

La molécule BMS-224818 (LEA29Y) correspond à la molécule CTLA4-Ig de deuxième génération. Cette molécule possède une partie CTLA-4 mutée par rapport à la portion extracellulaire du CTLA-4 humain. L'aniline en position 29 a été remplacée par une tyrosine et la leucine en position 104 a été remplacé par un acide glutamique. Ces mutations rendent la molécule plus affine pour B7-1 et B7-2. Ainsi, le LEA29Y est deux fois plus affin pour la molécule B7-2 que ne l'est le CTLA4Ig de première génération. De même, le LEA29Y est quatre fois plus affin pour la molécule B7-2 que ne l'est le CTLA4Ig de première génération (Moreland, Alten et al. 2002).

#### 2.2.4. CTLA-4 ligands des molécules B7 :

Initialement considérée comme une protéine bloquant l'interaction entre les molécules B7 et CD28, CTLA4Ig joue un rôle dans la stimulation des molécules B7 (Grohmann, Orabona et al. 2002), (Fallarino, Grohmann et al. 2003). La molécule CTLA4Ig interagit avec les molécules B7, portées par les cellules dendritiques, et provoque une augmentation de l'expression de l'enzyme indoleamine 2, 3-dioxygénase (IDO) à l'origine du catabolisme du tryptophane (un aa essentiel à la survie du lymphocyte T) et d'une inhibition des réponses cellulaires T (Grohmann, Orabona et al. 2002). L'activité de cette enzyme joue un rôle important dans la tolérance foeto-maternelle (Mellor, Chandler et al. 2002). Mellor AL et coll ont transfecté des cellules provenant d'une lignée fibroblastique murine avec un plasmide codant pour IDO. Des lymphocytes T murins, mis en culture dans des conditions de stimulation allogénique en présence de cette lignée surexprimant IDO, ne prolifèrent pas mais possèdent des marqueurs d'activation. De plus, le transfert adoptif de ces lignées à des souris naïves diminue le nombre de cellules T alloréactives. Ainsi IDO agit *in vivo* et *in vitro* sur la

prolifération des lymphocytes T (Mellor, Keskin et al. 2002). La présence de L-kynurenine (produit de dégradation du tryptophane par l'enzyme IDO) lors d'une MLR (réaction mixte lymphocytaire) inhibe la prolifération des cellules mononuclées sanguines humaines. Après 5 jours de stimulation dans ces conditions de culture, les cellules mononuclées sanguines sont lavées puis restimulées. Aucune prolifération n'est détectée lorsque les cellules mononuclées sanguines sont restimulées par les mêmes cellules que celles utilisées en MLR primaire. Par contre une réponse à une stimulation par des cellules différentes est possible. Les produits de dégradation du tryptophane (révélateur de l'activité d'IDO) n'agissent donc que sur les lymphocytes T activés sans affecter les lymphocytes T naïfs (Frumento, Rotondo et al. 2002) Enfin, l'activation d'IDO par un traitement au CTLA4Ig inhibe l'activation de lymphocyte T chez des souris sauvages mais pas chez les souris IDO KO (Mellor, Baban et al. 2003) (Cf Figure 9).

Les cellules régulatrices  $CD4^+CD25^+$  naturelles ou induites expriment la molécule CTLA-4 en surface. Activées avec des anticorps anti-CD3, elles induisent le catabolisme du tryptophane dans la cellule dendritique et ce de façon CTLA-4 dépendante. Ce processus fait intervenir les molécules B7 mais aussi la production de cytokines (Fallarino, Grohmann et al. 2003). Ainsi, la protéine de fusion CTLA4Ig, mais aussi la molécule CTLA-4 elle-même, peuvent induire l'activation d'IDO dans les cellules dendritiques. *In vivo*, l'utilisation du CTLA4Ig induit la survie d'allogreffe d'îlots pancréatiques. Le traitement avec du 1-MT (1-méthyl-tryptophane) dès le jour de la greffe empêche l'action du CTLA4Ig et induit dès lors le rejet du greffon (Grohmann, Orabona et al. 2002). Enfin il a été démontré, *in vitro*, que le CD28-Ig possède une capacité beaucoup plus faible à activer IDO que ne le fait le CTLA4Ig (Munn, Sharma et al. 2004).

Certain types cellulaires peuvent exprimer IDO lorsqu'elles sont exposées à de l' $IFN\gamma$ . Cependant des cellules dendritiques déficientes pour le récepteur à l' $IFN\gamma$  peuvent synthétiser IDO ; l' $IFN\gamma$  n'est donc pas essentiel à l'induction d'IDO (Mellor and Munn 2004). IDO est une protéine qui peut-être synthétisée sans fonction enzymatique. Ainsi, les cellules dendritiques spléniques  $CD8\alpha^+$  de souris sont capables de cataboliser le tryptophane lorsqu'elles sont exposées à de l' $IFN\gamma$ . Par contre, les cellules dendritiques  $CD8\alpha^-$  ne peuvent pas cataboliser le tryptophane alors qu'une analyse par Western blot révèle la même quantité de protéine IDO intracytoplasmique que dans les cellules  $CD8\alpha^+$  (Mackler, Barber et al. 2003).

Ces dernières découvertes offrent donc du relief aux stratégies d'immunosuppression ciblant spécifiquement la molécule CD28 tout en laissant libre l'interaction CTLA-4/B7.

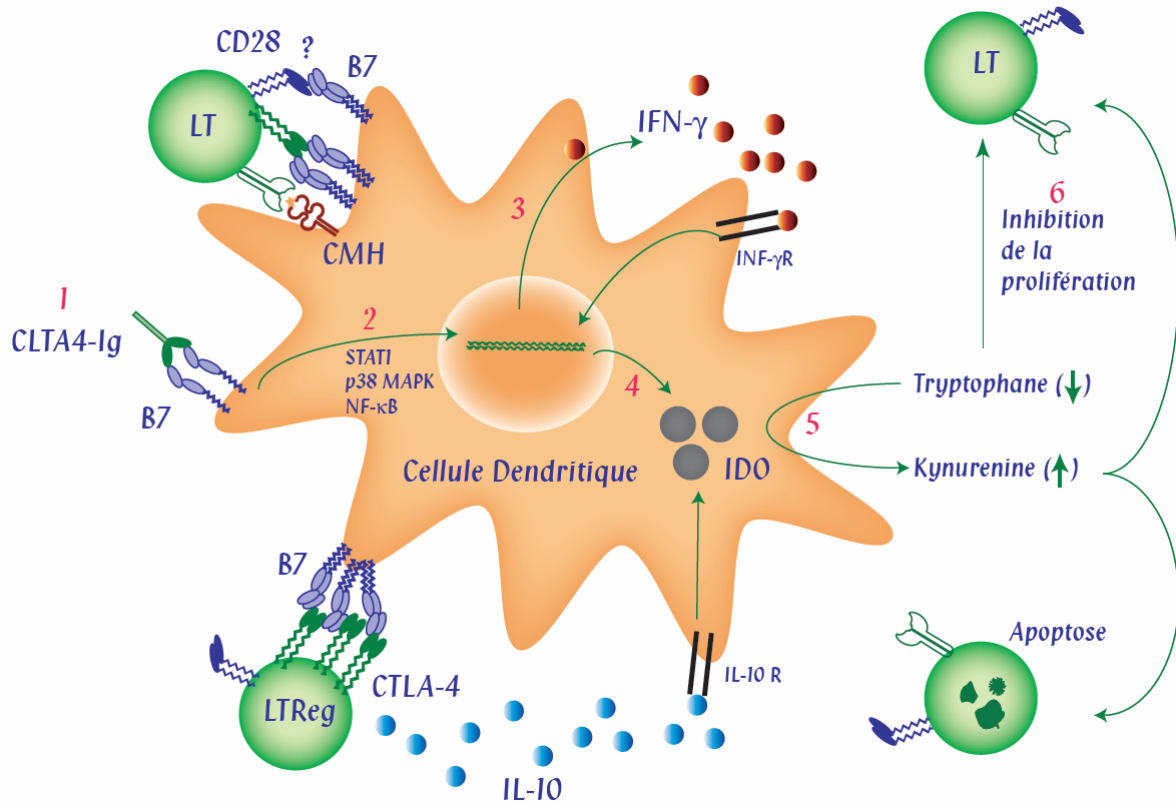


Figure 9: Modèle d'induction de tolérance par la signalisation B7 des cellules dendritiques.

La molécule de CTLA4Ig se fixe aux molécules B7 et induit un signal au sein des cellules dendritiques. Le signal transduit par la molécule B7 est dépendant de STAT1, p38MAPK et NFκB (1). La cellule dendritique stimulée produit et excrète de l'INFγ (2). Cet INFγ aura un rôle autocrine ou paracrine et va permettre la synthèse d'IDO (3). IDO dégrade le tryptophane en kynurénine (4). Le manque de tryptophane et l'abondance de ses catabolites inhibent la prolifération lymphocytaire T et peut induire leur apoptose (5). L'inhibition de l'expansion clonale des lymphocytes T aboutit à l'établissement d'un état de tolérance (6). La présence d'IL-10 peut également aider à l'activation d'IDO. Les rôles exacts des molécules CD28 et CTLA-4 membranaire sur l'activation d'IDO sont moins clairs mais ils peuvent y contribuer d'autant plus que les cellules régulatrices synthétisent de l'IL-10. D'après Finger EB et Bluestone JA, nature immunology 2002 (Finger and Bluestone 2002).

## 2.3. Protéines de la famille CD28/B7 :

<i>Molécule de costimulation</i>	<i>CD28</i>	<i>ICOS</i>	<i>CTLA-4</i>	<i>PD-1</i>	<i>BTLA-4</i> ( <i>B and T lymphocyte attenuator</i> )
<i>Expression</i>	<i>constitutive</i>	<i>Inductible sur les lymphocytes T activés ou mémoires</i>	<i>Inductible sur les lymphocytes T activés ou mémoires</i>	<i>Inductible sur les lymphocytes T et B</i>	<i>Inductible sur les lymphocytes T et B</i>
<i>Ligand(s) et expression</i>	<i>B7-2&gt;B7-1</i> <i>B7-2 faibles niveaux constitutifs, B7-1 et B7-2 sont inductibles sur les CPA</i>	<i>ICOSL</i> <i>CPA</i>	<i>B7-1&gt;B7-2</i> <i>B7-2 faibles niveaux constitutifs, B7-1 et B7-2 sont inductibles sur les CPA</i>	<i>PD-L1, PD-L2</i> <i>CPA, T reg</i>	<i>B7x</i> <i>Tissus lymphoïdes et non lymphoïdes</i>
<i>Fonctions</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\uparrow</math> prolifération des LT</li> <li>• <math>\uparrow</math> synthèse de cytokines dont l'IL-2</li> <li>• prévient l'anergie</li> <li>• <math>\uparrow</math> survie cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• orientation vers un phénotype Th2 (orientation et différenciation)</li> <li>• synthèse d'IL-4, IL-10, IL-13, IL-17</li> <li>• prévient l'anergie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> prolifération des LT</li> <li>• <math>\downarrow</math> synthèse de cytokines <ul style="list-style-type: none"> <li>• induit l'anergie</li> </ul> </li> <li>• <math>\downarrow</math> survie cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> prolifération des LT</li> <li>• <math>\downarrow</math> synthèse de cytokines <ul style="list-style-type: none"> <li>• induit l'anergie</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> prolifération des LT <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\downarrow</math> synthèse d'IL-2</li> </ul> </li> <li>• arrêt du cycle cellulaire</li> </ul>

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des protéines de la famille CD28/B7 réalisé à partir de plusieurs revues.

((Rothstein and Sayegh 2003), (Rudd and Schneider 2003), (Sharpe and Freeman 2002), (Carreno and Collins 2003)).



#### 2.4. Souris CD28KO et transplantation :

Les souris CD28KO possèdent des réponses cytotoxiques normales envers un pathogène fortement virulent (Shahinian, Pfeffer et al. 1993). *In vitro*, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD28KO prolifèrent moins que les lymphocytes T sauvages, de même les lymphocytes T CD28KO stimulés produisent moins d'IL-2 que les lymphocytes T sauvages. Les CTL CD28KO présentent les mêmes capacités cytotoxiques et prolifératives que les CTL sauvages *in vivo* et *in vitro*. Les souris CD28KO rejettent une greffe de peau dans un délai un peu plus long que les souris sauvages (Kawai, Shahinian et al. 1996), (Ha, Bingaman et al. 2001). Le traitement avec de l'anti-CD40L accélère le rejet observé en absence de la molécule CD28 (Ha, Bingaman et al. 2001). De même, les souris CD28KO-CD40LKO ont une cinétique de rejet équivalent aux souris sauvages. Le rejet de greffe de peau chez les souris CD28KO ou chez des souris CD28KO-CD40LKO est dépendant des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> car leur déplétion prolonge la survie du greffon (Habiro, Kotani et al. 2003), (Ha, Bingaman et al. 2001).

Dans le cas de greffes cardiaques chez des souris CD28KO (Szot, Zhou et al. 2001) ou chez des souris sauvages, le traitement avec de l'anti-CD40L prolonge la survie du greffon. La déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> par des anticorps déplétants prolonge une survie du greffon alors que seul le traitement par des anticorps anti-CD4 déplétants chez des souris sauvages augmente la survie du greffon. Chez les souris CD28KO, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont un rôle dans le rejet de greffe cardiaque, alors que chez les souris sauvages les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> semblent être les acteurs essentiels du rejet (Szot, Zhou et al. 2001).

Les souris CD28KO possèdent des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dont les capacités d'activation et de prolifération sont modifiées. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont les essentiels effecteurs du rejet de greffe cardiaque chez les souris sauvages. Chez les souris CD28KO, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, moins affaiblis par l'absence de CD28, prennent le relais et entraînent le rejet. A l'issue de ces travaux nous pouvons conclure que l'absence de molécule CD28 n'est pas suffisante pour éviter un rejet de greffe.

## 2.5. Modèles expérimentaux de ciblage thérapeutique du CD28 :

Peu d'études sont actuellement menées sur l'inhibition sélective du CD28, elles concernent essentiellement les maladies auto-immunes et la transplantation. Peu de réactifs sont aujourd'hui à notre disposition pour cibler spécifiquement le CD28 sans interférer avec la liaison CTLA-4/B7. Ces réactifs sont des anticorps bloquants, cytotoxiques, superagonistes. Dans la partie concernant le ciblage thérapeutique du CD28, seules les expérimentations *in vivo* ciblant spécifiquement le CD28 par des anticorps anti-CD28 seront abordées et comparées au blocage des molécules B7.

### 2.5.1. Les anticorps anti-CD28 :

#### 2.5.1.1. Chez la souris :

L'anticorps anti-CD28 (37.51) ne reconnaît pas le site de fixation à la molécule B7 et ainsi ne bloque pas l'interaction CD28/B7 (Yu, Albert et al. 2004). Des souris transgéniques pour un TCR spécifique de l'ovalbumine ont été traitées avec l'anti-CD28 en présence du peptide antigénique. Le profil cytokinique des splénocytes a été analysé et il révèle des taux d'IL-2, d'IL-6, d'IL-10, d'IL-15 et d'IFN $\gamma$  plus importants chez les souris traitées à l'OVA+anti-CD28 que chez les souris traitées uniquement à l'OVA. Ainsi l'anti-CD28 (37.51) augmente l'activation des cellules T *in vivo*. Le traitement d'une GVHD avec cet anti-CD28 (37.51) est efficace : il transmet un signal agoniste entraînant une immunosuppression qui n'est pas due à une neutralisation de la molécule CD28 mais à un autre mécanisme. Pour comprendre le mécanisme impliqué, Yu XZ et coll ont transféré des cellules CD8<sup>+</sup> issues de souris sauvages ou de souris CD28KO à des receveurs syngéniques ou allogéniques, traités ou non avec l'anti-CD28 (37.51). Chez les receveurs syngéniques, les cellules injectées se divisent lentement et ne sont pas affectées par l'anticorps anti-CD28. Chez les receveurs allogéniques, les cellules T CD8<sup>+</sup> de donneurs sauvages ou CD28KO prolifèrent énormément. Le traitement avec de l'anti-CD28 ne modifie pas l'expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> mais augmente de façon importante leur entrée en apoptose. Des résultats similaires ont été retrouvés avec les cellules T CD4<sup>+</sup>. Ainsi, l'anti-CD28 (37.51) est un anticorps déplétant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> alloréactifs en induisant leur apoptose. La surexpression du gène anti-apoptotique Bcl-x1, suite à l'activation massive du CD28 par l'anticorps anti-CD28, ne protège les lymphocytes T de la mort par apoptose. Cette apoptose est indépendante des

voies Fas et TNF, mais elle est dépendante de la production d'IFN $\gamma$  par les cellules du donneur (Yu, Albert et al. 2004). Yu XZ et coll ont utilisé des souris transgéniques pour le TCR 2C dont on connaît la spécificité et l'avidité pour plusieurs antigènes. L'anti-CD28 n'a pas d'effet déplétant sur les lymphocytes T dont le TCR interagit avec une avidité moyenne au complexe CMH-peptide. Par contre, lorsque cette avidité est élevée, l'anti-CD28 est déplétant (Yu, Martin et al. 2003). (Cf Tableau 4)

#### 2.5.1.2. Chez le rat :

Deux anticorps anti-CD28 appelés JJ316 et JJ319 ont été développés dans le laboratoire de Thomas Hunig (Tacke, Clark et al. 1995). *In vitro*, des lymphocytes T stimulés avec un anticorps anti-CD3 ne prolifèrent pas. L'ajout sous forme soluble d'anticorps anti-CD28 (JJ319 ou JJ316) induit la forte prolifération des lymphocytes T et la production massive d'IL-2 (Tacke, Hanke et al. 1997). Le JJ316 possède une propriété particulière : en l'absence de stimulation par le TCR il peut induire à lui seul une prolifération et une sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T. Il est ainsi appelé superagoniste. Le JJ319 se lie plus rapidement que le JJ316 à la molécule CD28, ce qui suggère que le motif reconnu par le JJ316 n'est pas immédiatement accessible ou ne correspond pas à la forme native du CD28. Cependant, ces deux anticorps forment un complexe de stabilité équivalant avec la molécule CD28. *In vivo*, l'injection par voie intra-péritonéale de 1mg de JJ316 provoque une prolifération importante des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au niveau de la rate et des ganglions. Six fois plus de lymphocytes T sont retrouvés au niveau de la rate et des ganglions alors que la nombre de lymphocytes T $\gamma\delta$ , de cellules NK, et de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> n'est que faiblement augmenté. Il est intéressant de noter que l'expansion de ces lymphocytes CD4<sup>+</sup> se fait de façon oligoclonale sans augmentation du marqueur d'activation CD25. L'expansion *in vivo* n'est donc pas dépendante de l'IL-2. Cet effet n'est que transitoire et le nombre de cellules redevient normal après deux semaines (Tacke, Hanke et al. 1997).

Au niveau moléculaire, les deux anticorps ne reconnaissent pas la même partie de la molécule CD28. Ainsi, la fixation et la fonction du superagoniste JJ316 est dépendante de l'intégrité de la boucle C'D de la molécule CD28. L'épitope reconnu par le JJ319 est localisé tout près du site de fixation de la molécule B7 (Luhder, Huang et al. 2003) (Cf Figure 10). *In vitro*, l'activation dépendante du JJ316 et indépendante du TCR n'entraîne pas de production d'IL-2, ni de phosphorylation de la chaîne du TCR ou de ZAP70 (Luhder, Huang et al. 2003), (Bischof, Park et al. 2000). Dengler et coll ont démontré que le JJ319 est un anticorps

modulant (Dengler, Szabo et al. 1999). Ces deux anticorps ont été testés en transplantation ; le JJ319 est plus approprié pour inhiber les réponses alloréactives que le JJ316 (Otto, Feuerlein et al. 2002). (Cf Tableau 4)

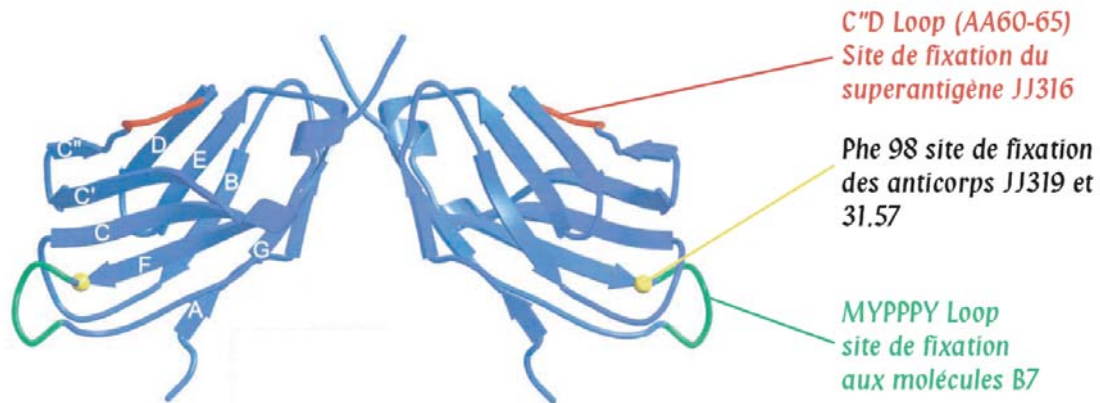


Figure 10 : Lühder F et coll proposent les sites de fixation des anticorps JJ319, JJ316 (reconnaissant le CD28 de rat) et 31.57 (reconnaissant le CD28 de souris).

Le superagoniste JJ316 reconnaît l'intégralité de la boucle C'D (représenté en rouge). Le JJ319 nécessite la présence d'une valine en position 98 de la chaîne d'aa constituant la molécule de CD28. Les anticorps JJ319 et anti-CD28 31.57 possèdent tout les deux des épitopes proche du site de liaison à la molécule B7 (Luhder, Huang et al. 2003).

### 2.5.1.3. Chez l'homme :

L'équipe de Hunig a également développé des anticorps anti-CD28 humain superagonistes. *In vitro*, les anticorps 9D7 et 5.11A1 entraînent la prolifération de lymphocytes T humains de façon indépendante de la liaison TCR. Comme pour le JJ316, les anticorps 9D7 et 5.11A1 reconnaissent l'intégrité de la boucle C'D de la molécule CD28 humaine tout comme le JJ316 reconnaît l'intégrité de la boucle C'D de la molécule CD28 de rat (Cf Figure 10) (Luhder, Huang et al. 2003).

Tso.J.Jun et coll ont breveté (TN228-IgG2m3 ; brevet US n°2004/116675 AI) un anticorps anti-CD28 humain « silencieux ». Cet anticorps possède une portion Fc mutée : la valine en position 234 et la glycine en position 237 ont chacune été remplacées par une alanine (Cole, Anasetti et al. 1997). De part ces mutations, la portion Fc de l'IgG2m3 n'est alors plus reconnue par les récepteurs Fcγ des cellules (Cole, Anasetti et al. 1997). Cet anticorps inhibe la prolifération des cellules mononuclées sanguines humaines en MLR (suivant la dose utilisée). Mais les résultats de cette équipe restent assez flous et n'ont pas fait l'objet de publications scientifiques.

Nunès J et coll ont développé plusieurs anticorps anti-CD28 humain dont les propriétés agonistes diffèrent suivant l'épitope reconnu et leur affinité pour la molécule CD28. Parmi ces anticorps, certains (CD28.1, CD28.3, CD28.5) n'entraînent pas de signaux de costimulation et d'induisent pas la production d'IL-2 par des cellules Jurkat en présence de Phorbol-12-Myristate-13Acétate. Ces trois anticorps entraînent un flux calcique moins important que les autres anti-CD28 lors de leur fixation. De par son avidité plus importante pour le CD28, les fragments Fab de l'anti-CD28.3 inhibent *in vitro* la prolifération de lymphocytes T humains en MLR (Vanhove, Laflamme et al. 2003). A partir de cet anticorps, une protéine de fusion entre un fragment ScFv et l' $\alpha$ -1 antitrypsine a été construite en vue d'une utilisation thérapeutique chez l'homme. (Cf Tableau 4)

<i>Espèce ciblée</i>	<i>Classe d'anticorps</i>	<i>Mode d'action présumé</i>	<i>Références</i>
<i>Souris</i>	<i>IgG de hamster anti-CD28 (clone 37.51)</i>	<i>Anticorps déplétant</i>	<i>(Yu, Albert et al. 2004)</i>
	<i>IgG de hamster anti-CD28 (clone PV1)</i>	<i>Fragments Fab bloquants</i>	<i>(Perrin, June et al. 1999)</i>
<i>Rat</i>	<i>IgG murin anti-CD28 (clone JJ316)</i>	<i>superagoniste</i>	<i>(Tacke, Clark et al. 1995; Tacke, Hanke et al. 1997)</i>
	<i>IgG1k murin anti-CD28 (clone JJ319)</i>	<i>Internalisation du CD28</i>	<i>(Tacke, Clark et al. 1995; Tacke, Hanke et al. 1997)</i>
<i>Homme</i>	<i>IgG murin anti-CD28 (clone 9D7et 5.11A1)</i>	<i>superagoniste</i>	<i>(Luhder, Huang et al. 2003)</i>
	<i>Anticorps muté anti-CD28 (TN228-IgG2m3)</i>	<i>silencieux</i>	<i>brevet US n°2004/116675 AI</i>
	<i>IgG1 murin anti-CD28 (clone CD28.1, CD28.3, CD28.5)</i>	<i>Fragments Fab CD28.3 bloquants</i>	<i>(Nunes, Klasen et al. 1993)</i>
	<i>ScFv murin anti-CD28 humain couple à l'<math>\alpha</math>-1 antitrypsine</i>	<i>Molécule bloquante</i>	<i>(Vanhove, Laflamme et al. 2003)</i>

Tableau 4 : Récapitulatif des réactifs anti-CD28 et de leur mécanismes d'action.

### 2.5.2. Blocage du CD28 dans les maladies autoimmunes :

Certaines maladies autoimmunes peuvent être causées par une absence de régulation des clones T autoréactifs par les cellules régulatrices.

L'EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) est un modèle murin d'étude de la sclérose en plaque. Cette maladie est déclenchée chez la souris par immunisation avec de la MBP (myelin basic protein) ou par transfert adoptif de cellules de ganglions lymphatiques spécifiques de la MBP. Il a tout d'abord été montré que les molécules B7 jouaient un rôle central dans les modèles d'EAE (Perrin, Scott et al. 1996). Les effets de la molécule CTLA4Ig ont été étudiés dans ce modèle ; ils dépendent du moment choisi pour appliquer le traitement. Ainsi le CTLA4Ig peut induire une suppression ou une augmentation des signes cliniques de la maladie. De plus, Hurwitz AA et coll ont traité des souris développant une EAE avec des anticorps anti-CTLA-4 pendant l'induction de la maladie. Il en résulte une sévère augmentation de son développement ainsi qu'une augmentation de l'inflammation et de la démyélinisation dans le cerveau. L'engagement de la molécule CTLA-4 implique donc un signal inhibiteur régulant la sévérité clinique de cette maladie (Hurwitz, Sullivan et al. 1997). Perrin PJ et Racke MK ont clairement démontré que les anticorps anti-B7-1 diminuent les effets de la maladie alors que les anticorps anti-B7-2 les augmentent (Racke, Scott et al. 1995). Suite à ces travaux on peut se demander quel est le rôle de la voie de costimulation CD28/B7 dans la maladie. Perrin PJ et coll ont bloqué spécifiquement le CD28 par des fragment Fab d'un anticorps monoclonal anti-CD28 pendant l'induction ou suite à l'établissement de la maladie, ce qui a permis d'améliorer les signes cliniques de l'EAE (Perrin, June et al. 1999).

L'EAN (experimental autoimmune neuritis) est un modèle animal du syndrome de Guillain-Barré qui provoque une démyélinisation du système nerveux périphérique chez l'homme. L'EAN peut être induite chez l'animal par immunisation avec de la myéline du système nerveux périphérique ou bien avec les protéines P2 ou P0 en association avec de l'adjuvant complet de Freund. Les lymphocytes T CD4 helper jouent un rôle primordial dans l'établissement et l'évolution de la maladie. Le blocage de la molécule CTLA-4 par un anticorps lors de l'immunisation de la souris ou 40 jours après l'immunisation de la souris aggrave considérablement les signes cliniques de la maladie (Zhu, Zou et al. 2001). Des souris CD28KO immunisées avec la protéine P0 en adjuvant complet de Freund ne manifestent aucun signe clinique de la maladie et ne développent aucun anticorps contre la

protéine PO contrairement aux souris sauvages immunisées (Zhu, Ljunggren et al. 2001). Schmidt J et coll ont traité des rats immunisés développant l'EAN avec un anticorps superagoniste anti-CD28 (JJ316). Ce traitement délivré avant ou pendant l'immunisation, diminue l'infiltration des lymphocytes T au niveau du nerf sciatique et donc diminue l'incidence de la maladie. Schmidt J et coll stipulent que le JJ316 induit une activation polyclonale à l'origine de variation des facteurs pouvant contrôler la migration cellulaire (Schmidt, Elflein et al. 2003).

L'EAU (experimental autoimmune uveoretinitis) est un modèle murin d'uvéorétinite (maladie autoimmune atteignant l'uvée et la rétine) et peut être déclenché chez la souris par une immunisation avec différents antigènes rétiens ou bien par transfert de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes rétiens. Silver PB et coll ont étudié le blocage du CD28 ou des molécules B7 pendant la première immunisation. L'utilisation d'anticorps anti-B7-1 diminue significativement la maladie tandis que les anticorps anti-B7-2 diminuent le score de la maladie mais pas de façon statistiquement significative. Néanmoins, ces traitements protègent la souris contre les premiers épisodes de la maladie, c'est-à-dire lors de la première immunisation. Cependant, ces traitements n'induisent pas de tolérance à long terme car des souris traitées ne présentant plus d'anticorps anti-B7 circulant développent la maladie lors d'une deuxième immunisation. Un blocage spécifique de la molécule CD28 avec des anticorps anti-CD28 prévient le développement de la maladie lors de la première immunisation mais ne prévient pas son développement lors de la seconde immunisation (Silver, Hathcock et al. 2000).

La CIA (collagen-induced-arthritis) est un modèle murin d'arthrite rhumatoïde qui peut se développer chez des souris immunisées contre le collagène de type II en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund. Des souris déficientes pour le gène CD28 deviennent résistantes à l'induction de la maladie (Tada, Nagasawa et al. 1999). Tellander AC et coll ont analysé les effets des anticorps anti-B7-1, anti-B7-2, anti-CD28 et anti-CTLA-4 dans la CIA. Dans cette étude, les anticorps anti-B7 diminuent la sévérité de la maladie tandis que les anticorps anti-CD28 retardent la survenue de la maladie. Les anticorps anti-CTLA-4 quant à eux n'ont aucune conséquence sur la CIA. Notons cependant que cette étude a été réalisée avec l'anticorps anti-CD28 issu du clone 37.51 connu pour son activité agoniste (Yu, Albert et al. 2004). De plus sa clairance est plus importante que celle des anticorps anti-B7. Il serait donc utile de recommencer cette étude avec un anticorps anti-CD28 différent (Tellander, Pettersson et al. 2001).

### 2.5.3. Blocage du CD28 en transplantation :

Marder BA et coll ont analysé l'impact du polymorphisme des molécules de costimulation sur le devenir du greffon hépatique. Trois variations alléliques ont été détectées dans le gène codant pour la molécule CTLA-4. Le premier est retrouvé au niveau du promoteur, le second au niveau du premier exon et le troisième au niveau des microsatellites. Ce polymorphisme est lié au développement de maladies autoimmunes. Un polymorphisme retrouvé dans le troisième intron du gène codant pour la molécule CD28 n'entraîne, quant à lui, aucune maladie auto-immune. Slavcheva et coll ont cherché à savoir s'il existait une association entre ces différents allèles et les rejets de greffons rénaux ou hépatiques. Ainsi, la combinaison de certains allèles entre donneur et receveur est associée à une augmentation des épisodes de rejet aigu. Cependant il ne semble pas exister de lien entre l'incidence des épisodes de rejets aigus et la perte des greffons dans les cohortes étudiées (Marder, Schroppel et al. 2003). Il faut cependant noter que la molécule CTLA-4 codée par ces différents allèles n'est pas fonctionnelle. Cette étude nous laisse donc supposer qu'une interaction CTLA-4/B7 fonctionnelle permettrait d'éviter les épisodes de rejets observés. Ainsi, une stratégie de blocage spécifique de la molécule CD28 tout en laissant libre l'interaction CTLA-4/B7 devrait diminuer les risques de rejets aigus.

La GVHD (graft-vs-host disease) résulte d'une activation des cellules T du donneur en réponse aux alloantigènes présentés par l'hôte. Le blocage des voies CD28/CTLA-4/B7 par la molécule CTLA4Ig induit une suppression de la GVHD (Wallace, Johnson et al. 1994). Yu XZ et coll ont utilisé l'anticorps anti-CD28 (37.51) déplaçant les lymphocytes T allo-réactifs. Ce traitement est plus immunosuppresseur que le blocage des molécules B7 par du CTLA4Ig (Yu, Bidwell et al. 2000). Ainsi, l'administration d'un anticorps anti-CD28 agoniste va engendrer la déplétion des lymphocytes T activés (c'est-à-dire les lymphocytes du greffon dirigés contre l'hôte) en épargnant les lymphocytes T non activés ne reconnaissant pas l'hôte.

Il a été démontré lors d'une greffe cardiaque chez la souris, que l'utilisation de la molécule CTLA4Ig induisait une tolérance (Turka, Linsley et al. 1992), de plus l'inhibition spécifique de la molécule B7-2 par des anticorps anti-B7-2 induit la survie du greffon si, et seulement si, l'interaction CTLA-4/ B7-1 est préservée (Judge, Wu et al. 1999). A la lueur des nouvelles découvertes on pourrait supposer que l'enzymeIDO puisse jouer un rôle dans ce phénomène (Cf partie « CTLA-4 ligands des molécules B7 »). Ainsi, Dengler TJ et coll ont ciblé spécifiquement le CD28 en transplantation cardiaque chez le rat par l'utilisation de



l'anticorps modulant JJ319. Ce traitement agit de façon dose-dépendante sans pour autant aboutir à une induction de tolérance (Dengler, Szabo et al. 1999). Dong VM et coll ont étudié les conséquences du blocage du CD28 dans un modèle de rejet chronique de greffe cardiaque entre des souches de rats dont les molécules du complexe mineur d'histocompatibilité sont différentes. Le développement du rejet chronique est aboli après traitement par l'anticorps anti-CD28. Dans une autre combinaison de souches, le rejet aigu peut être évité par l'association de faibles doses de CsA et d'anti-CD28 qui entraînent alors des survies à long terme (Dong, Yuan et al. 2002). Enfin, Laskowski IA et coll ont testé l'inhibition du CD28 lors d'une greffe rénale chez le rat dans une combinaison de souches où il n'y a pas de développement de rejet aigu. Ainsi une simple injection d'anti-CD28 le jour de la greffe chez le rat prévient le développement d'un rejet chronique (Laskowski, Pratschke et al. 2002). Cependant, dans ces études sur le blocage spécifique du CD28 en transplantation, les analyses ne sont que purement descriptives. Aucune analyse des différentes populations cellulaires n'a été réalisée pour essayer d'identifier les mécanismes cellulaires responsables de la survie des greffons.

Cette stratégie de blocage spécifique de la molécule CD28 lors d'une transplantation chez l'homme peut être envisagée dans le sens où il existe des anticorps anti-CD28 bloquants. Cependant, l'utilisation de cet anticorps engendrerait des problèmes car, étant bivalent, sa fixation pourrait provoquer la dimérisation de la molécule CD28 et par là même son activation (Damle, Doyle et al. 1988). L'utilisation de fragment Fab de cet anticorps éviterait la dimérisation du CD28, mais dans ce cas, la faible taille du fragment Fab sera à l'origine de sa rapide élimination par le rein. Ainsi, à l'INSERM U643 nous avons développé une molécule de fusion le SC28-Haat consistant en l'assemblage d'un fragment ScFv (single chain Fv) d'un anticorps anti-CD28 humain bloquant avec l' $\alpha$ 1 anti-trypsine (Vanhove, Laflamme et al. 2003). De part sa partie ScFV, cette protéine de fusion n'entraîne pas la dimérisation de la molécule CD28 humaine, et de part sa partie  $\alpha$ 1 anti-trypsine la taille de la protéine devient suffisamment élevée pour éviter son élimination précoce par le rein (Cf Figure 11). Nous avons étudié les propriétés de cette molécule *in vitro* (Vanhove, Laflamme et al. 2003) et cette molécule est actuellement testée en essais précliniques chez le babouin.

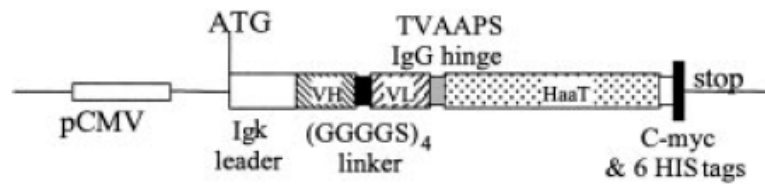


Figure 11 : Schéma de la construction de la protéine de fusion scFv28.3-HaaT (SC28-Haat).

Le fragment d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) code pour les régions variables des chaînes VH et VL de l'anticorps anti-CD28.3 (anti-CD28 humain) et pour l' $\alpha$ -1-antitrypsine

### 3. La Tolérance :

Le système immunitaire est adapté pour réagir à de nombreux types d'agressions. Il possède également des « garde fous » lui permettant d'une part de contrôler sa propre activation et, d'autre part, d'éviter le développement de clones autoimmuns. Ainsi l'organisme possède des cellules régulatrices naturelles permettant le contrôle du système immunitaire. La tolérance est un phénomène actif qui inhibe certaines réactions immunitaires. Les mécanismes de tolérance peuvent se développer au niveau du thymus ; il s'agit alors du développement d'une tolérance centrale. En transplantation, la tolérance centrale peut être obtenue à la suite de l'établissement d'un chimérisme ou d'un micro chimérisme permettant la colonisation du thymus par des cellules de l'hôte et des cellules du greffon. La tolérance périphérique est extra-thymique ; son mécanisme d'action fait intervenir des cellules régulatrices T ou non T, naturelles ou induites. L'induction d'une tolérance immunitaire est désirable dans deux situations : 1) dans le cas des maladies autoimmunes pour les prévenir ou en diminuer les symptômes. 2) dans le cadre d'une greffe d'organe. Un état opérationnel de tolérance immunologique en transplantation se définit comme l'acceptation à long terme d'un greffon fonctionnel après arrêt complet des traitements immunosuppresseurs. Une tolérance implique non seulement tous ces aspects mais est aussi associée à l'absence de rejet chronique dans le cadre des greffes vascularisées. Ainsi, de nombreuses stratégies d'induction de tolérance sont à l'étude ; elles ciblent le développement d'immunosuppresseurs plus spécifiques, ou le développement d'immunosuppresseurs d'induction. Chez l'homme, un état de tolérance est observé chez de rares patients qui pour des raisons médicales ou personnelles

ont arrêté leur traitement immunosuppresseur, et possèdent malgré tout un greffon rénal fonctionnel sans signe de rejet aigu. Leur étude permettra sans doute de comprendre quel type de mécanisme est à l'origine de leur tolérance même si seul leur sang, leur sérum et leurs urines peuvent être analysés. Ethiquement il est délicat de demander une biopsie du greffon de ces patients. Il devient donc important de commencer à développer des outils pouvant révéler la signature d'un état de tolérance chez un patient. Ainsi, un réseau européen s'est mis en place afin d'étudier une cohorte importante de patients cliniquement tolérants. L'étude de ces patients fait intervenir plusieurs techniques qui permettront peut-être de découvrir une signature de l'état de tolérance. A l'INSERM (unité U643, Nantes), le phénotype des leucocytes sanguins de ces patients est étudié ainsi que leur transcriptome (technique des puces à ARN) et leur répertoire lymphocytaire T (technique du T-land-scape) (S Brouard et al, *in press*).

Expérimentalement chez l'animal, l'état de tolérance est défini par plusieurs facteurs qui sont, d'une part, la survie à long terme du greffon, d'autre part l'acceptation d'une seconde greffe de même haplotype que la première et le rejet d'une greffe d'un autre haplotype. Enfin, l'état de tolérance est également défini par l'absence de rejet chronique.

De nombreux protocoles d'induction de tolérance sont actuellement à l'étude :

- Le développement d'un chimérisme mixte permet l'induction d'une tolérance spécifique du greffon par transplantation de moelle osseuse du donneur. Un chimérisme mixte (coexistence des cellules allogéniques du donneur et des cellules du receveur) peut-être obtenu par un traitement non myélo-ablatif suivi d'une greffe de moelle osseuse. Ce chimérisme mixte peut aboutir à une tolérance d'organes greffés comme le coeur. Il permet la présence de cellules hématopoïétiques présentatrices d'antigènes provenant à la fois du receveur et du donneur. Les cellules T de même haplotype que le greffon réagissant fortement contre le receveur sont éliminées par sélection thymique ce qui minimiserait les risques de réaction du greffon contre l'hôte (GVHD : graft vs host disease) (Tomita, Khan et al. 1994).

- Le blocage des voies de costimulation évitant la pleine activation du lymphocyte T.

- Le ciblage de récepteurs lymphocytaire T : CD2, CD3, CD4, CD25.

### 3.1. *Les cellules régulatrices :*

Les cellules régulatrices ont le pouvoir de contrôler la réactivité des lymphocytes T effecteurs. Des cellules régulatrices T naturelles  $CD4^+CD25^+$  sont retrouvées chez les individus sains. Des cellules régulatrices T induites de type CD4 ou CD8 peuvent se développer à l'issue de traitements. D'autres types de cellules non-T peuvent avoir un pouvoir régulateur sur l'activation des lymphocytes T. Parmi ceux-ci on retrouve les AMAC $\phi$  (alternatively activated macrophages), les cellules dendritiques immatures, les cellules dendritiques tolérogènes et d'autres types cellulaire dont la nature exacte reste encore à découvrir.

#### 3.1.1. Les cellules régulatrices T :

##### 3.1.1.1. Les cellules régulatrices T $CD4^+CD25^+$ naturelles :

Dans les années 70, Gershon fut le premier à décrire des cellules naturelles (dites cellules suppressives Ts) dont le pouvoir suppresseur diminuait les réponses autoimmunes (Gershon 1975).

##### *Origine et fonctions des cellules régulatrices naturelles $CD4^+CD25^+$ :*

L'étude des cellules régulatrices a été affinée chez la souris à la fin des années 90 ; des populations similaires ont été identifiées chez l'homme et le rat. Sakaguchi SN et coll ont identifié une sous population au sein des lymphocytes T  $CD4^+$  périphériques naifs coexprimant la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (IL-2R, CD25). Ces cellules  $CD4^+CD25^+$  sont importantes pour le contrôle des lymphocytes T autoréactifs *in vivo*. Le transfert de lymphocytes T  $CD4^+CD25^-$  dans une souris *nude* induit le développement de maladies autoimmunes. Un deuxième transfert (peu de temps après le premier) de cellules  $CD4^+CD25^+$  inhibe le développement de maladies de façon dose-dépendante (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995). La thymectomie de souris, âgées de trois jours induit le développement de maladies autoimmunes pouvant être liées à la disparition des cellules  $CD4^+CD25^+$  résidentes du thymus (Suri-Payer, Amar et al. 1998). Les cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$  sont différentes des lymphocytes T  $CD4^+$  activés exprimant, suite à cette activation, le marqueur CD25, car les cellules régulatrices naturelles possèdent un pouvoir régulateur *in vitro* et *in vivo* que ne possèdent pas les cellules T  $CD4^+$  nouvellement activées. Jordan et coll ont

analysé la sélection thymique des cellules régulatrices naturelles en croisant des souris transgéniques exprimant un peptide du virus influenza avec des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de l'influenza, puis ont analysé le développement de lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$ . Ainsi, pendant la sélection thymique trois cas peuvent se présenter suivant l'affinité du TCR pour le complexe [CMH de classe II]-[peptide du soi] :

- une faible affinité conduit à la sélection des lymphocytes T  $CD4^+$  classiques
- une affinité de niveau intermédiaire sélectionne les cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$
- une forte affinité conduit à la déplétion (Jordan, Boesteanu et al. 2001).

Les cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$  sont essentiellement retrouvées dans le thymus chez les souris âgées de 2 ou 7 jours, tandis que chez les souris adultes la majeure partie est retrouvée en périphérie (Jordan, Boesteanu et al. 2001). La déplétion des cellules  $CD4^+CD25^+$  par des anticorps provoque des maladies autoimmunes chez la souris adulte. Les lymphocytes T  $CD4^+CD25^+$  issus du thymus sont donc des cellules régulatrices naturelles des lymphocytes T autoréactifs. Les cellules régulatrices naturelles ne prolifèrent pas suite à une stimulation allogénique ou polyclonale ; elles sont anergiques. En coculture, leur pouvoir suppressif dépend de la sécrétion de cytokines (IL-10 et TGF- $\beta$ ) et d'un contact entre la cellule à réguler et la cellule régulatrice. Elles sont responsables de l'homéostasie et du maintien de la tolérance dans les organes lymphoïdes. Enfin, l'activation des cellules régulatrices naturelles est spécifique d'un antigène mais leur action est antigène non-spécifique (Thornton and Shevach 2000) (Cf Tableau 5).

*Phénotype des cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$  :*

Tout comme les cellules  $CD4^+CD25^-$ , les cellules  $CD4^+CD25^+$  voient l'expression de leur marqueur CD25 augmenter en surface suite à leur stimulation. Alors que les cellules  $CD4^+$  (non régulatrices) activées perdent ensuite progressivement leur marqueur d'activation CD25, les cellules régulatrices naturelles retrouvent leur niveau initial de CD25 en surface (Kuniyasu, Takahashi et al. 2000). Les cellules régulatrices naturelles sont en train d'être caractérisées au niveau de leur phénotype; elles sont reconnaissables par différents marqueurs dont les rôles exacts sont encore controversés. Ainsi les cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$  chez la souris expriment de façon constitutive les molécules GITR (glucocorticoid-induced TNF-related receptor) (Shimizu, Yamazaki et al. 2002) et CTLA-4

(Takahashi, Tagami et al. 2000). La stimulation du GITR par des anticorps sur des cellules  $CD4^+CD25^+$  fraîchement isolées annule leur pouvoir suppresseur. *In vivo* ce traitement induit le développement de maladies autoimmunes (Shimizu, Yamazaki et al. 2002). Les conséquences du blocage de la molécule CTLA-4 par des anticorps anti-CTLA-4 sont controversées car ce blocage peut induire un arrêt des propriétés régulatrices (Takahashi, Tagami et al. 2000) ou bien n'avoir aucun effet (Chai, Tsang et al. 2002). Enfin, le facteur de transcription FoxP3 (transcription factor forkhead box P3) est un autre marqueur des cellules régulatrices naturelles  $CD4^+CD25^+$ . Les souris FoxP3 KO développent un syndrome lymphoprolifératif semblable à celui des souris CTLA-4 KO (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Chez ces souris FoxP3 KO, les cellules  $CD4^+CD25^+$  n'ont plus de pouvoir inhibiteur. De plus, Hori S et coll ont démontré que chez la souris et chez l'homme présentant des syndromes autoimmuns les cellules régulatrices naturelles n'expriment plus de FoxP3. De plus, par transfert du gène codant pour FoxP3, ils ont pu transformer des cellules  $CD4^+$  naïves en cellules ayant un phénotype semblable à celui des cellules régulatrices naturelles (Hori, Nomura et al. 2003). La présence du facteur de transcription FoxP3 est donc critique pour le développement et l'action des cellules régulatrices et peut être considéré comme un marqueur de la cellule régulatrice. (Cf Tableau 5).

### 3.1.1.2. Les cellules régulatrices T induites :

Les cellules T régulatrices induites se développent à partir des cellules  $CD4^+CD25^-$  ou  $CD8^+CD25^-$  de la périphérie ; elles ne sont pas issues d'une lignée cellulaire unique. Elles n'acquièrent pas leur fonction au sein du thymus car elles peuvent être spécifiques d'un antigène qui n'est pas présenté au sein du thymus. Quatre types de cellules régulatrices T induites sont décrits : les cellules TR1, les cellules Th3, les cellules  $CD4^+CD25^-$  et certaines cellules  $CD8^+$ .

#### *Les cellules régulatrices $CD4^+$ de type Tr1 :*

Les cellules régulatrices Tr1 ont été mises en évidence par l'équipe de Groux H à partir de souris transgéniques pour un TCR spécifique d'un peptide de l'ovalbumine. Ces souris ont été mises en contact journalier avec le peptide de l'ovalbumine (voie orale) en présence d'IL-10. Après ce traitement, les souris développent des lymphocytes T possédant un profil de sécrétion cytokinique différent des profils Th1 ou Th2 connus jusqu'alors. Ainsi les cellules Tr1 produisent de grandes quantités d'IL-10, de l'IL-5, de l'INF $\gamma$ , du TGF- $\beta$  ou

non, et de faibles quantités d'IL-2 et d'IL-4 (Groux, O'Garra et al. 1997). Ces cellules Tr1 ont une faible capacité proliférative après une stimulation polyclonale ; elles ont des capacités immunosuppressives sur les lymphocytes Th1 et peuvent éviter le développement de maladies autoimmunes dépendant de l'activation lymphocytaire T. De plus, *in vitro*, le surnageant de cellules Tr1 activées rends les cellules dendritiques incapables de provoquer une allostimulation (Levings, Bacchetta et al. 2002, pour revue). L'action des cellules régulatrices Tr1 est dépendante d'un facteur soluble et non pas d'un contact cellulaire car l'ajout d'anticorps bloquants anti-IL10 empêche les cellules Tr1 d'exprimer leur pouvoir suppresseur (Groux, O'Garra et al. 1997). Les cellules régulatrices Tr1 sont retrouvées au niveau des sites inflammatoires où elles régulent directement l'inflammation et maintiennent une tolérance périphérique ((Cottrez and Groux 2004), pour revue) (Cf Tableau 5).

*Les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup> de type Th3 :*

Les cellules régulatrices induites Th3 ont elles aussi été découvertes chez la souris après une injection orale de protéine, ici la MBP (myelin basic protein) (Chen, Kuchroo et al. 1994). Elles sont caractérisées par leur grande production de TGF- $\beta$  (Fukaura, Kent et al. 1996). Ces cellules Th3 ont un pouvoir inhibiteur *in vitro* car elles suppriment la prolifération et la synthèse de cytokines par des lymphocytes T spécifiques de la MBP. Cette suppression est dépendante du TGF- $\beta$  car elle n'est plus effective après l'ajout d'anticorps bloquants anti-TGF- $\beta$  (Chen, Kuchroo et al. 1994). Les cellules régulatrices Th3 sont suppressives des lymphocytes Th1 et Th2 et permettent la commutation de classe des IgA (Weiner 2001). (Cf Tableau 5).

*Les cellules régulatrices CD25<sup>-</sup> :*

Des études récentes suggèrent que certaines cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> possèdent des propriétés régulatrices. Ainsi, Stephens LA et coll ont montré que le transfert de cellules CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> thymiques à des souris diabétiques permet de diminuer l'incidence de la maladie, alors que le transfert de cellules thymiques T CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> n'a aucun effet sur l'incidence de la maladie. Par contre, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> mémoires prélevées en périphérie (rate et ganglions lymphatiques) ont un pouvoir régulateur qui diminue l'incidence de la maladie. Afin d'obtenir un résultat similaire aux transferts de cellules CD25<sup>+</sup>, il est nécessaire de transférer 10 fois plus de cellules CD25<sup>-</sup> (Stephens and Mason 2000). De telles observations ont également été décrites dans des modèles de

transplantation. Graca L et coll ont montré que le transfert de cellules  $CD4^+CD25^-$  permet d'éviter un rejet de greffe de peau chez une souris qui diffère du donneur par les molécules du complexe mineur d'histocompatibilité. Là encore, le nombre de cellules  $CD4^+CD25^-$  nécessaire à cette suppression est beaucoup plus important que le nombre de cellules  $CD4^+CD25^+$  utilisées (Graca, Thompson et al. 2002). Enfin, dans modèle d'induction de tolérance après transfert de sang du donneur, l'obtention de rats tolérant à long terme leur greffon (>100j) semble être lié au développement de mécanismes régulateurs. Ainsi, *in vitro*, les cellules T  $CD25^+$  tout comme les cellules T  $CD25^-$  ne prolifèrent pas suite à une stimulation par les cellules du donneur. *In vivo*, des cellules  $CD25^-$  issues des animaux tolérants sont capables de transférer la tolérance à des animaux nouvellement greffés alors que les  $CD25^+$  issues du même animal tolérant ne le font pas. Dans ce modèle, les cellules régulatrices  $CD25^-$  ont un mécanisme d'action plus proche de celui des cellules régulatrices naturelles  $CD25^+$  que de celui des cellules régulatrices induites de type Tr1 et Th3 (nécessité d'un contact cellulaire) (Degauque et al. en préparation).

#### *Les cellules régulatrices $CD8^+$ :*

Certains lymphocytes T  $CD8^+CD28^-$  sont également appelés lymphocytes T suppresseurs (LTs). Ces cellules  $CD8^+CD28^-$  peuvent être générées *in vitro* après plusieurs cycles de stimulation de cellules mononuclées sanguines humaines par des cellules dendritiques allo ou xénogéniques (Liu, Tugulea et al. 1998). Les LTs sont restreints par la molécule de CMH de classe I et suppriment, de façon spécifique de l'antigène, les réponses lymphocytaires T  $CD4^+$  helper en empêchant, d'une part leur production d'IL-2 et, d'autre part, leur surexpression de la molécule CD40L (Liu, Tugulea et al. 1998). L'action suppressive des LTs nécessite un contact cellulaire entre les LTs et les cellules présentatrices d'antigènes qui les activent. Pour ce faire, la cellule présentatrice réalise un lien physique entre le LTs, reconnaissant ses molécules de CMH de classe I, et les lymphocytes T  $CD4^+$  helper, reconnaissant ses molécules de CMH de classe II (Li, Liu et al. 1999). Les LTs inhibent la surexpression du CD40L à la surface des lymphocytes T  $CD4^+$  helper. Cette voie CD40-CD40L qui permet à la CPA de surexprimer ses molécules de costimulation telles que les molécules B7-1 et B7-2 n'étant plus active, les CPA ne sont plus capables d'activer pleinement les lymphocytes T  $CD4^+$  helper (Liu, Tugulea et al. 1998, Li, 1999 #199). Les LTs induisent l'expression de récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 sur les CPA. Cette expression est à l'origine de la non stimulation des lymphocytes T  $CD4^+$  helper. Ainsi, l'utilisation d'anticorps anti-ILT3 et anti-ILT4 restaure partiellement la prolifération des lymphocytes T



CD4<sup>+</sup> (Chang, Ciubotariu et al. 2002). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> ont été retrouvés en plus grand nombre chez des patients ayant subi une greffe cardiaque que chez des personnes non greffées. Les LTs de ces patients qui ne montrent pas de signe de rejet aigu expriment de façon plus importante la molécule CD27 par rapport aux patients rejetant leur greffon (Colovai, Mirza et al. 2003). Ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> des patients ne développant pas de rejet ne sont pas cytotoxiques envers les cellules du donneur et présentent la molécule inhibitrice CD94 (KIR : killing inhibitory receptor).

Chez la souris, d'autres types de cellules régulatrices CD8<sup>+</sup> ont été mis en évidence. Ainsi, l'inoculation d'un antigène de l'ovalbumine dans la chambre antérieure de l'œil induit des lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène (Faunce and Stein-Streilein 2002). Le développement de ces cellules régulatrices nécessite la production d'IL-10 et est restreint par la présence de cellules CD1d<sup>+</sup>. Les lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup> sont induits par des cellules NKT CD4<sup>+</sup> Classe II (Nakamura, Sonoda et al. 2003). Un développement de lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup> est également observé suite à une allogreffe de cornée et dépend là aussi de la présence de cellules NKT (CD1d<sup>+</sup>) étant donné qu'un traitement avec des anticorps anti-CD1d déplétants ou que des souris J $\alpha$ 281KO (NKT KO) rejettent leur greffe de cornée (Sonoda, Taniguchi et al. 2002).

Type de cellule	Origine	Phénotype	Rôle in vivo	Observations in vitro	Action	Lieu d'activation	Références
Cellules régulatrices naturelles $CD4^+CD25^+$	thymus	CD25, GITR, CTLA-4, FoxP3	-Inhibition des clones T alloréactifs -contrôle de l'homéostasie	-Anergiques -inhibition des cocultures	-Inhibent la synthèse d'IL-2 -Synthèse d'IL-10 et de TGF- $\beta$ -Activation antigène dépendante -Action antigène indépendante -contact cellulaire	Essentiellement retrouvées dans les organes lymphoïdes	(Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995), (Suri-Payer, Amar et al. 1998), (Thornton and Shevach 2000), (Takahashi, Tagami et al. 2000), (Shimizu, Yamazaki et al. 2002).
Cellules régulatrices Tr1	périphérie	CD25, CTLA-4,	-Inhibition des clones T alloréactifs	-Faibles capacités prolifératives - Suppression des lymphocytes Th1	-Synthèse d'IL-10, de l'IL-5, de l'INF $\gamma$ -Pas ou peu de production de TGF- $\beta$ -Indépendant d'un contact cellulaire -Action antigène indépendante	Retrouvées au niveau des sites inflammatoires	(Groux, O'Garra et al. 1997), (Levings, Bacchetta et al. 2002), (Cottrez and Groux 2004).
Cellules régulatrices Th3	périphérie	CD25, CTLA-4,	-Aide à la commutation de classe des IgA -Suppression de l'EAE	- Suppression des lymphocytes Th1 et Th2	-Synthèse de TGF- $\beta$ -Activation antigène dépendante -Action antigène indépendante -indépendant d'un contact cellulaire		(Fukaura, Kent et al. 1996), (Chen, Kuchroo et al. 1994), (Weiner 2001).

Tableau 5: Récapitulatif non exhaustif des caractéristiques des cellules régulatrices T naturelles et induites chez la souris.

Les cellules régulatrices naturelle et ou induites partagent de nombreuses caractéristiques interspèces (REF STEPH pour revue)

### 3.1.2. Le rôle des cellules dendritiques dans la génération des cellules T régulatrices :

Les cellules dendritiques ne semblent pas être à l'origine des cellules régulatrices naturelles puisqu'elles ne sont pas capables d'induire une sélection positive mais uniquement des sélections négatives au sein du thymus ((Groux, Fournier et al. 2004) pour revue).

Les cellules dendritiques peuvent jouer un rôle dans l'induction d'une tolérance périphérique ((Fairchild and Waldmann 2000) pour revue). *In vitro*, des cellules dendritiques immatures peuvent induire la différenciation de cellules humaines de type Tr1 (Jonuleit, Schmitt et al. 2000), (Dhodapkar, Steinman et al. 2001). Ainsi en contrôlant l'activation des cellules dendritiques, il est possible de contrôler le niveau d'activation lymphocytaire T. En l'absence d'inflammation, les cellules dendritiques peuvent phagocyter des protéines du soi ou des cellules du soi en fin de vie, sans pour autant devenir matures, tout en continuant à migrer au niveau des organes lymphoïdes (Hirao, Onai et al. 2000). Ces cellules dendritiques immatures ne sont pas capables d'activer pleinement un lymphocyte T naïf en lymphocyte effecteur, mais peuvent permettre leur différenciation en Tr1 (Jonuleit, Schmitt et al. 2000). Ce modèle peut également s'appliquer avec des peptides du non-soi : l'injection de cellules dendritiques immatures chargées avec un peptide de l'influenza chez des sujets sains aboutit à l'inhibition spécifique des cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques de ce peptide et à l'apparition d'une population lymphocytaire sécrétant de grandes quantités d'IL-10 (Dhodapkar, Steinman et al. 2001). Une autre étude montre que la stimulation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> allogéniques humains par des cellules dendritiques matures conduit à leur différenciation en cellules Th1 et à leur expansion massive. Par contre, la stimulation avec des cellules dendritiques immatures de façon répétée aboutit à une inhibition de la prolifération des lymphocytes T ainsi stimulés. Cette inhibition n'est pas levée par une stimulation avec des cellules dendritiques matures (Jonuleit, Schmitt et al. 2000). Nouri-Shirazi M et coll ont démontré que des cellules dendritiques immatures peuvent rendre les lymphocytes T tolérants à une reconnaissance directe ou indirecte (Nouri-Shirazi and Guinet 2002). Ainsi, il a été démontré que l'injection de cellules dendritiques immatures prolonge la survie du greffon cardiaque (Fu, Li et al. 1996), (Lutz, Suri et al. 2000). Le pouvoir tolérogène de ces cellules régulatrices dépend du contexte dans lequel elles ont été stimulées. Ainsi, si leur stimulation les amène à produire de grandes quantités d'IL-10 mais pas d'IL-12, les lymphocytes T auxquels elles vont présenter leur complexe [CMH-peptide] vont se différencier en Tr1 (Akbari, DeKruyff et al. 2001).

Enfin, il a été montré que des cellules dendritiques myéloïdes immatures développées *in vitro* sont, dans certain cas, résistantes à des stimuli de maturation tel que le LPS, le TNF- $\alpha$  et le CD40-L, ce qui laisse de l'espoir pour des protocoles d'induction de tolérance *in vivo* utilisant ces cellules.

### 3.1.3. Le lien entre les cellules T régulatrices naturelles et les cellules régulatrices induites, la tolérance infectieuse :

Les cellules régulatrices naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> issues du thymus nécessitent un contact cellulaire pour le maintien de la tolérance, alors que les cellules régulatrices induites (TR1, Th3) agissent indépendamment d'un contact cellulaire. Waldman et coll ont les premiers émis l'existence d'une tolérance infectieuse (Qin, Cobbold et al. 1993). Jonuleit H et coll ont démontré que les cellules régulatrices naturelles peuvent éduquer des cellules naïves. Ainsi, la co-incubation de cellules régulatrices humaines CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> avec des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> déplétées en cellules régulatrices aboutit à l'anergie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peuvent à leur tour inhiber l'activation conventionnelle de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper. L'éducation de la cellule CD4<sup>+</sup> par la cellule régulatrice naturelle dépend d'un contact cellulaire, alors que la transmission de cette régulation entre la cellule CD4<sup>+</sup> régulatrice induite et la cellule CD4<sup>+</sup> helper ne dépend pas d'un contact cellulaire mais plutôt de facteur soluble comme le TGF- $\beta$  (Jonuleit, Schmitt et al. 2002), ou l'IL-10 (Dieckmann, Plottner et al. 2001) (Cf Figure 12).

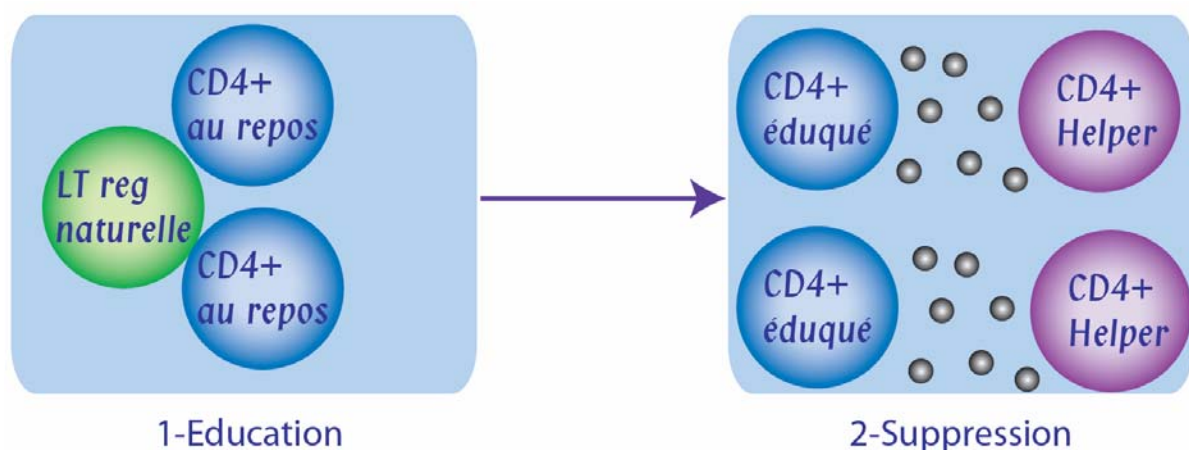


Figure 12: La tolérance infectieuse.

Les cellules T régulatrices naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> éduquent par un contact cellulaire les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> au repos (1). La cellule T CD4<sup>+</sup> est éduquée et est capable à son tour d'induire une suppression. La suppression émanant de la cellule T CD4<sup>+</sup> éduquée dépend de la

*production de cytokines suppressives (TGF- $\beta$  et IL-10) et est donc indépendante d'un contact cellulaire (2).*

Stassen M et coll ont isolé des cellules régulatrices humaines naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> puis les ont séparées suivant leur phénotype pour l'expression d'intégrines  $\alpha_4\beta_7$  ou  $\alpha_4\beta_1$ . Ces intégrines sont nécessaires à la migration des lymphocytes T, l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  se lie au molécules d'adhésion de l'endothélium de sites d'inflammation alors que l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  se au niveau des vaisseaux des muqueuses. Les cellules régulatrices naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $\alpha_4\beta_7$ ) permettent la conversion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules T produisant de grande quantité d'IL-10, donc ressemblant aux cellules régulatrices induites Tr1, alors que les cellules régulatrices naturelles CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $\alpha_4\beta_1$ ) induisent des cellules régulatrices de type Th3. Les cellules ainsi éduquées voient une augmentation de l'expression du facteur de transcription FoxP3 (Stassen, Schmitt et al. 2004), (Stassen, Fondel et al. 2004), (Stassen, Jonuleit et al. 2004).

### *3.2. Stratégies d'induction de la tolérance par blocage des molécules de costimulation :*

L'induction d'un état de tolérance pour un organe transplanté constitue l'axe principal de la recherche en transplantation. L'état de tolérance est obtenu dans de nombreux modèles expérimentaux. Cependant, la notion de tolérance recouvre des réalités différentes selon les équipes de recherche. On peut définir un état de tolérance par plusieurs facteurs :

1-Survie à long terme du greffon (chez les rongeurs).

2-Acceptation d'une seconde greffe (même organe ou organe différent) de même haplotype que la première et rejet d'une greffe d'haplotype différent.

3-Absence de rejet chronique.

4-Maintien des capacités de réponse immune du receveur suite à une immunisation.

5-Absence de traitement immunosuppresseur au moment de l'analyse.

Nous avons préalablement vu que les cellules dendritiques immatures ont un pouvoir tolérogène *in vivo* et un pouvoir suppresseur sur les lymphocytes T *in vitro*. Les cellules dendritiques matures expriment de grandes quantités de molécules ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), de molécules CD40 et de molécules B7-1 et B7-2. Ce sont des molécules de costimulation qui permettent l'activation du lymphocyte T après la stimulation

de son TCR. L'activation, l'expansion et la différenciation lymphocytaire T ont un rôle central dans le rejet de greffe. L'inhibition de l'activation lymphocytaire T par le blocage des molécules de costimulation est l'une des stratégies étudiées pour induire un état de tolérance. Parmi celles-ci on retrouve :

-Le blocage de l'adhésion et de la migration lymphocytaire T par des anticorps anti-ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et anti-LFA-1 (lymphocyte function associated antigen), qui a permis d'induire un état de tolérance dans différents modèles.

-Le blocage de la voie CD40/CD40L qui active à la fois le lymphocyte T et la CPA en utilisant la molécule recombinante CD40-Ig ou des anticorps anti-CD40L. Cette inhibition induit également la tolérance dans différents modèles expérimentaux.

-Enfin, le blocage de la voie de costimulation CD28/B7, par la molécule CTLA4Ig ou par un anticorps anti-CD28 bloquant, peut induire la tolérance. Cette tolérance n'est pas observée suite à un traitement par des anticorps anti-B7.

Les tableaux 4, 5, et 6 résument ces trois stratégies d'induction de tolérance par blocage des voies de costimulation et font état des critères choisis pour évaluer la tolérance. Les travaux regroupés dans ces tableaux ont été sélectionnés car les auteurs affirment avoir un état de tolérance. L'apparition ou non d'un rejet chronique au sein de ces greffons n'a été que rarement analysée. Aussi, les modèles expérimentaux d'induction de tolérance faisant état du développement d'un rejet chronique ne seront pas mentionnés. Les trois stratégies d'induction de tolérance sélectionnées sont applicables chez l'homme car il existe d'ores et déjà des molécules humanisées pouvant être testées en phase préclinique.

### 3.2.1. Blocage de ICAM et LFA-1 :

La molécule ICAM-1 est une molécule d'adhésion retrouvée sur les lymphocytes activés T et B, sur les cellules NK activées et sur les cellules endothéliales. La molécule LFA-1 est une molécule d'adhésion exprimée à la surface des lymphocytes T, B, des cellules NK et des granulocytes. Le Tableau 6 résume les protocoles d'induction de tolérance bloquant les molécules ICAM-1 et LFA-1 par l'utilisation d'anticorps.

<i>Modèle</i>	<i>Espèce</i>	<i>Stratégie de blocage</i>	<i>Critères pour évaluer la tolérance</i>	<i>Références</i>
<i>Greffe de neurones</i>	<i>Rat</i>	<i>Anti-ICAM-1 + anti-LFA-1 + transfert de splénocytes irradiés du donneur</i>	<i>Régénération nerveuse</i>	<i>(Genden, Mackinnon et al. 1998)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Souris</i>	<i>Anti-ICAM-1 + anti-LFA-1</i>	<i>Survie indéfinie du greffon</i>	<i>(Isobe, Suzuki et al. 1997)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>Anti-ICAM-1 + anti-LFA-1</i>	<i>2de greffe (peau) prolongée *</i>	<i>(Bashuda, Takazawa et al. 1996)</i>

*Tableau 6: Modèle d'induction de tolérance par blocage des molécules ICAM-1, LFA-1 en transplantation.*

*(\* la seconde greffe est de même haplotype que la première greffe, une greffe d'haplotype différent est rejetée).*

Des anticorps anti-LFA-1 (RAPTIVA® ; Efalizumab) ont été testés en essais cliniques de phase III. Ils ont montré une faible efficacité pour prévenir le rejet des transplantés rénaux à haut risque (Matthews, Ramos et al. 2003). Ce traitement donne par contre des résultats très encourageants pour traiter le psoriasis (Matthews, Ramos et al. 2003).

### 3.2.2.

Blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L :

Le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L en transplantation a été étudié en utilisant des anticorps cytolytiques anti-CD40L ou en utilisant la molécule CD40-Ig. Le Tableau 7 résume les principaux traitements bloquant cette voie CD40/CD40L qui permettent l'induction d'un état de tolérance.

<i>Modèle</i>	<i>Espèce</i>	<i>Stratégie de blocage</i>	<i>Critères pour évaluer la tolérance</i>	<i>Références</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>Anti-CD40L et transfert de splénocytes du donneur</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Sebille, Brouard et al. 2003)</i>
<i>Greffe de foie</i>	<i>Rat</i>	<i>AdCD40Ig</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Nomura, Yamashita et al. 2002)</i>
<i>Greffe de moelle</i>	<i>Souris</i>	<i>Anti-CD40L</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Ito, Kurtz et al. 2001), (Seung, Iwakoshi et al. 2000)</i>
<i>Greffe d'îlots</i>	<i>Souris</i>	<i>Anti-CD40L + anti-CD45RB</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) prolongée *</i>	<i>(Rothstein, Livak et al. 2001)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>AdCD40Ig + AdRANKIg</i>	<i>Diminution des lésions chroniques</i>	<i>(Guillonneau, Louvet et al. 2004)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>AdCD40Ig + Anti-ICOS</i>	<i>Absence de rejet chronique</i>	<i>(Guillonneau C et al en préparation)</i>
<i>Greffe d'îlots pancréatiques</i>	<i>Souris</i>	<i>Anti-CD40L + anti-LFA-1</i>	<i>Survie du greffon</i>	<i>(Nicolls, Coulombe et al. 2002)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat (modèle de rejet chronique)</i>	<i>Anti-CD40L</i>	<i>Plus de rejet chronique</i>	<i>(Yuan, Dong et al. 2002)</i>

Tableau 7: Blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L en transplantation et induction d'une tolérance.

(\* la seconde greffe est de même haplotype que la première greffe, une greffe d'haplotype différent est rejetée).

Le blocage de la voie CD40/CD40L par des anticorps anti-CD40L offrait des résultats encourageants pour son application chez l'homme (Kirk, Burkly et al. 1999). Cependant, ce traitement induit de nombreuses thromboses car le CD40L est présent sur les plaquettes activées (Aukrust, Damas et al. 2004). Les essais cliniques ont donc dû être arrêtés. Le CD40 est exprimé sur les cellules B et parfois sur les cellules endothéliales activées. Les



études précliniques bloquant spécifiquement le CD40 sont en cours de développement (Boon, Laman et al. 2002).

### 3.2.3. Blocage de la voie de costimulation CD28/B7 :

Le Tableau 8 résume les différents protocoles bloquant la voie de costimulation CD28/B7 par l'utilisation de la molécule CTLA4Ig, ou le blocage spécifique du CD28 aboutissant à la survie à long terme et à un état dit de tolérance.

<i>Modèle</i>	<i>Espèce</i>	<i>Stratégie de blocage</i>	<i>Critères pour évaluer la tolérance</i>	<i>Références</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Souris</i>	<i>CTLA4Ig + anti-ICAM-1 + Injection de cellules dendritiques immatures</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Wang, Zhang et al. 2003)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>AdCTLA4Ig + anti-ICOS</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (coeur) acceptée *</i>	<i>(Guo, Fujino et al. 2003)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>CTLA4Ig + anti-ICOS</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Kosuge, Suzuki et al. 2003)</i>
<i>Greffe Pulmonaire</i>	<i>Rat</i>	<i>CTLA4Ig</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Shiraishi, Yasunami et al. 2002)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>AdCTLA4Ig</i>	<i>Survie à long terme</i>	
<i>Greffe cardiaque et greffe de moelle osseuse</i>	<i>Rat</i>	<i>CTLA4Ig</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Li, Thanikachalam et al. 2001)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Rat</i>	<i>CTLA4Ig + cellules spléniques et cellules de la moelle osseuse du donneur.</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (peau) acceptée *</i>	<i>(Jin, Zhang et al. 2003)</i>
<i>Greffe cardiaque</i>	<i>Souris</i>	<i>CTLA4Ig + Anti-LFA-A</i>	<i>Pas de signe histologique de rejet chronique</i>	<i>(Corbascio, Ekstrand et al. 2002)</i>
<i>Greffe rénale</i>	<i>Rat</i>	<i>CTLA4Ig</i>	<i>2<sup>de</sup> greffe (coeur) acceptée *</i>	<i>(Sayegh, Akalin et al. 1995)</i>
<i>Greffe rénale</i>	<i>Rat (modèle de rejet chronique)</i>	<i>Anti-CD28 + CsA</i>	<i>Plus de rejet chronique</i>	<i>(Laskowski, Pratschke et al. 2002)</i>
<i>Greffe rénale</i>	<i>Rat</i>	<i>Anti-CD28 (JJ319)</i>	<i>Pas de rejet chronique, pas d'immunosuppression de l'animal</i>	<i>(Haspot et al, soumis)</i>

Tableau 8: Blocage de la voie de costimulation CD28/B7 en transplantation et induction d'une tolérance.

*(\* la seconde greffe est de même haplotype que la première greffe, une greffe d'haplotype différent est rejetée).*

La plupart des travaux regroupés dans ces tableaux (4, 5, 6) font preuve d'un état de tolérance par l'acceptation d'une seconde greffe. Cependant, rares sont ceux qui analysent leur greffon et l'absence de rejet chronique n'est que trop rarement mentionnée.

L'utilisation de la molécule CTLA4Ig et le blocage spécifique de la molécule CD28 offrent des résultats prometteurs quant à l'induction d'un état de tolérance chez l'homme. La molécule CTLA4Ig (LEA29Y) est actuellement en cours d'essais cliniques en phase II et III en transplantation rénale dans 12 sites multicentriques.

Des molécules ciblant spécifiquement le CD28 comme la molécule Sc28AT sont également en cours de développement (Vanhove, Laflamme et al. 2003). La molécule Sc28AT est actuellement étudiée chez le babouin ; sa cross-réactivité (homme-babouin) est établie ce qui permettra de commencer son étude sur des protocoles de transplantation chez les grands animaux.

Nous avons vu combien l'interaction CD28/B7 est importante pour l'activation lymphocytaire T. Le blocage de l'interaction CD28/B7 est testé en ciblant les molécules B7 soit par des anticorps anti-B7 ou soit par du CTLA4Ig. Malheureusement, les anticorps anti-B7 ne fournissent pas de résultats concluants tant au niveau des maladies autoimmunes qu'en transplantation. La molécule CTLA4Ig possède des propriétés particulières (induction d'IDO) et des résultats prometteurs sont obtenus en transplantation, y compris chez l'homme. Cependant, le blocage des molécules B7 peut avoir deux effets opposés car il n'empêche pas seulement l'interaction CD28/B7 mais il bloque aussi l'interaction CTLA-4/B7 qui transduit un signal inhibiteur et régulateur au lymphocyte T. Aussi, il semble plus judicieux de ne cibler que le CD28 en laissant libre l'interaction CTLA-4/B7. L'inhibition sélective de la molécule CD28 est une stratégie thérapeutique en développement.

En 1993, Nunes J et coll ont publié des résultats concernant des anticorps anti-CD28 humain (Nunes, Klasen et al. 1993). Cependant, l'utilisation de ces anticorps lors d'une stimulation allogénique peut exercer un effet agoniste. Parmi les anticorps décrits, le CD28.3 possède des fragments Fab dont l'avidité pour la molécule CD28 est supérieure aux fragments Fab des autres anticorps anti-CD28 développés par Nunes. Les fragments Fab issus de l'anticorps anti-CD28.3 peuvent inhiber l'interaction moléculaire CD28/B7 (Vanhove, Laflamme et al. 2003). Nous avons donc testé le fragment Fab anti-CD28.3 *in vitro* sur des cellules humaines afin de vérifier ses capacités inhibitrices en MLR. Cependant un fragment Fab ne peut être utilisé, *in vivo*, car sa clairance est trop élevée. L'anticorps CD28.3 a été utilisé pour produire une protéine de fusion réunissant la partie ScFv et l' $\alpha$ 1-antitrypsine. Cette protéine de fusion Sc28AT est un antagoniste du CD28 ; elle est utilisable *in vivo* chez l'homme.

En 1995, Tacke M et coll ont développé des anticorps anti-CD28 de rat. Parmi ceux-ci, le clone JJ319 induit une internalisation de CD28 *in vivo* (Dengler, Szabo et al. 1999). Nous avons donc étudié *in vivo* chez le rat les conséquences de l'internalisation du CD28 lors de l'établissement d'une GVHD ou lors d'une immunisation. Enfin, l'étude du blocage spécifique du CD28 lors d'une transplantation rénale chez le rat et l'analyse des mécanismes impliqués dans le maintien à long terme du greffon ont été analysées.

## Résultats :

Les travaux présentés dans cette thèse ont porté sur l'étude du blocage du CD28. Deux situations ont été étudiées, *in vivo* chez le rat, dans des conditions où le système immunitaire était activé par une immunisation ou une transplantation. Le blocage du CD28 a également été étudié, *in vitro*, sur des cellules humaines. Nos résultats ont permis, d'une part, de mettre en évidence le rôle du CD28 dans l'activation lymphocytaire T directe et, d'autre part, de mettre en évidence le développement de cellules régulatrices « atypiques » de phénotype TCR<sup>-</sup> CMH de classe II<sup>-</sup> B7<sup>+</sup>.

#### 4. Comparaison entre le blocage spécifique du CD28 ou des molécules B7 dans des conditions de stimulation directe ou indirecte.

##### *4.1. Objectifs de l'étude et modèle utilisé :*

Les effets du blocage du CD28 ont été comparés avec ceux du blocage des molécules B7 sur la réponse immune à un antigène soluble ou à une stimulation alloantigénique. Pour ce faire nous avons utilisé des fragments Fab anti-CD28.3 humains, la molécule recombinante CTLA4Ig (BMS-188667) dite de première génération et un anticorps anti-CD28 de rat (JJ319). Les souches de rats utilisées, LEW.1A (RT1<sup>a</sup>) et LEW.1W (RT1<sup>u</sup>), sont de même fond génétique et ne diffèrent que par leurs molécules de CMH de classe I et II. *In vivo*, l'analyse a porté sur l'inhibition du CD28 par l'anticorps anti-CD28 de rat (JJ319) lors de l'établissement d'une GVHD ou lors d'une immunisation par un antigène nominal.

4.2. *Résultats :*

*Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses.*

Fabienne Haspot, Florence Villemain, Geneviève Laflamme, Flora Coulon, Daniel Olive, Jérôme Tiollier, Jean-Paul Soulillou, and Bernard Vanhove

ITERT-INSERM U437, Nantes; INSERM U119, Marseille; and Sangstat Europe, Lyon, France

Article publié en mars 2002 dans **BLOOD**

## Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses

Fabienne Haspot, Florence Villemain, Geneviève Laflamme, Flora Coulon, Daniel Olive, Jérôme Tiollier, Jean-Paul Souillou, and Bernard Vanhove

**Immunosuppression with B7 antagonists might have 2 opposite effects: reducing T-cell costimulation through CD28 but also preventing CTLA-4 from transmitting its negative regulatory signal. We therefore hypothesized that a selective blockade of CD28 might be qualitatively different from blocking B7. It was previously reported that CD28 modulation prolongs allograft survival in the rat and reverses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. However, whether CD28 or B7 blockade results in similar immunosuppression on alloimmune and self-restricted responses to soluble antigens has not yet been investi-**

**gated. Here, we addressed this issue in vitro with antagonist anti-CD28 Fab fragments and in vivo using the modulating anti-rat JJ319 monoclonal antibody. As in the inhibition of B7 with CTLA4 immunoglobulin, anti-CD28 Fab fragments inhibited allogenic T-cell proliferation in mixed cultures. In vivo modulation of CD28 blocked the expansion of alloreactive T cells and promoted their apoptosis. In contrast, selective blockade of CD28 did not modify T-cell proliferative responses and antibody production to soluble antigens, whereas blocking B7 with CTLA4 immunoglobulin did. Our data show that blocking CD28, while leaving CTLA4-B7**

**interactions undisturbed, inhibits alloreactive CD4<sup>+</sup> T-cell expansion but does not modify the response to nominal antigens presented in the context of a self-major histocompatibility complex. That B7 engagement is needed for self-restricted responses whereas engagement of CD28 is not essential adds to the suggestion that another unidentified ligand of B7 might deliver a costimulatory signal in the absence of CD28. (Blood. 2002;99:2228-2234)**

© 2002 by The American Society of Hematology

### Introduction

Complete activation of T cells requires the delivery of at least 2 signals by antigen-presenting cells (APCs). The first is provided through T-cell receptor (TCR) engagement of the peptide-major histocompatibility complex (MHC) on the APC, and the second is provided by the interaction of accessory receptors on T cells with their ligands on APCs and is referred to as costimulation. The CD28 molecule on T cells binds to B7-1 or B7-2 on APCs, thereby providing signal 2 for the initiation of naive T-cell responses. In conjunction with a TCR stimulus, it allows high-level interleukin-2 (IL-2) production and provides an essential survival signal for T cells,<sup>1</sup> thereby preventing apoptosis or the induction of anergy that may occur in response to signal 1 alone. CD28 regulates T-cell cycle entry and progression through the G1 phase in an IL-2-independent manner, resulting in the activation of cyclins.<sup>2</sup> After activation, T cells up-regulate the surface expression of CTLA-4, a homologue of CD28, that binds the same ligands with higher affinity and serves as a negative regulator of T-cell activation. In addition to its competition with CD28 for binding to B7 molecules, CTLA-4 recruits phosphatases that dephosphorylate activated molecules in the CD3 complex, and it reduces nuclear translocation of RelA, which leads to a suppression of the production of multiple cytokines produced by Th1 and Th2 cells, including IL-2, interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-3, IL-4, and IL-10.<sup>3</sup> Actually, direct

antagonism of the TCR-mediated signal by CTLA-4, independent of CD28, has been shown to be sufficient to explain its inhibitory effect.<sup>4</sup>

Despite evidence that CTLA-4 is a regulator of T-cell responses, some observations indicate that CTLA-4 may be of relatively minor importance for the down-regulation of primary immune responses.<sup>5</sup> In addition, though lymphoproliferative disease is observed in CTLA-4-deficient mice, arguing for a role of CTLA-4 in inhibiting T-cell expansion, it is not observed in chimeric recipients when wild-type and CTLA-4<sup>-/-</sup> T cells coexist.<sup>6</sup> Moreover, it was reported that a CTLA-4-B7 interaction can also costimulate T-cell clonal expansion and production of cytolytic T cells.<sup>7,8</sup> In vivo studies with B7 antagonists have demonstrated a central role for B7-mediated costimulation in antibody response,<sup>9</sup> autoimmune disease,<sup>10-13</sup> and graft rejection,<sup>14,15</sup> but the respective participation of CTLA-4 and CD28 in these responses is not completely defined.

In vitro studies with murine and human T-cell clones have indicated that antigenic stimulation in the absence of costimulation signaling through B7/CD28 causes the T cells to enter a state of long-term hyporesponsiveness, known as anergy, connected to the failure to induce IL-2 gene transcription.<sup>16</sup> Immunosuppression with B7 antagonists, however, might have 2 opposite effects—reducing T-cell costimulation through CD28 and preventing CTLA-4

From ITERT-INSERM U437, Nantes; INSERM U119, Marseille; and Sangstat Europe, Lyon, France.

Submitted July 6, 2001; accepted October 25, 2001.

Supported in part by the Fondation Progreffe and by the postgenome program, grant 109, of the French government (MENRT).

**Reprints:** Jean-Paul Souillou, ITERT, INSERM U437, CHU Hotel Dieu, 30 Bld Jean Monnet, 44093 Nantes, France; e-mail address: bvanhove@nantes.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2002 by The American Society of Hematology

from transmitting its negative regulatory signal. Therefore, we hypothesized that selective blockade of CD28 could be more effective at inducing immunosuppression and anergy than B7 blockade. Expected molecular consequences of the selective blockade of CD28 with an unmodified CTLA-4–B7 interaction would be a block in the transition from G0 to G1 and an induction of the antiapoptotic factor Bcl-xL in resting CD4<sup>+</sup> T cells,<sup>17</sup> whereas it would induce Fas-independent cell death in activated CD4<sup>+</sup> T cells.<sup>18</sup> Indeed, selective blockade of CD28 molecules was shown to reduce the reactivity of autoreactive cells in experimental autoimmune encephalomyelitis<sup>19</sup> and in experimental autoimmune uveoretinitis,<sup>11</sup> and it was more immunosuppressive than blocking the ligands for CD28 and CTLA-4 in graft-versus-host disease (GVHD).<sup>20</sup> Selective blockade of CD28 also delayed allograft rejection in the rat.<sup>21</sup> This selective immunosuppression, however, did not induce long-term tolerance.<sup>11,21</sup> The extent to which blocking CD28 would modify antibody responses depends on the type of immunization, because responses to viral infection<sup>22</sup> or immunization with cardiomyosin<sup>23</sup> are impaired in CD28<sup>-/-</sup> mice whereas responses to keyhole limpet hemocyanin (KLH) are normal.<sup>24</sup>

Here, we added to these studies a comparison between the effects of antagonizing B7 versus CD28 on immune responses to nominal antigens and to direct allorecognition. Using either Fab fragments of an anti-human CD28 antibody<sup>25</sup> *in vitro* or the modulating anti-rat CD28 JJ319 antibody<sup>21</sup> *in vivo*, we demonstrated that though, as expected, B7 inhibition reduces direct pathway activation of the growth of T cells subjected to allostimulation and immune responses to soluble antigens, selective inhibition of CD28 does not modify the responses of T cells activated against self-MHC-restricted determinants. No modification of antibody responses, antigen-triggered cell proliferation, or cytokine induction was noted. In contrast, it was effective in reducing the proliferation of T cells stimulated through the direct allorecognition pathway *in vitro* and *in vivo*. These data indicate that blocking CD28 results in a qualitatively different effect from blocking B7. In addition, our results match recent data suggesting additional yet unidentified ligands for B7 on T cells.

## Materials and methods

### Animals and cells

Inbred adult rats (200–250 g) from the Lewis (LEW).1A (RT1<sup>a</sup>) and the LEW.1W (RT1<sup>u</sup>) congenic strains were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were 5- to 7-week-old males and were maintained in our animal facility under EOPS conditions according to institutional guidelines. T cells were purified with the rat T-cell enrichment columns (R&D Systems, Minneapolis, MN). Human peripheral CD4<sup>+</sup> T cells were obtained from healthy, unrelated volunteers and were prepared with the Lympho Kwick Th system (Ingen, Rungis, France), according to the manufacturer's instructions.

### Antibodies and reagents

Anti-rat CD28 JJ319 hybridoma was obtained from T. J. Dengler.<sup>21</sup> Isotypic control mouse immunoglobulin IgG1 3G8 was from American Type Culture Collection (Manassas, VA). Anti-human CD28 CD28.3 hybridoma was from INSERM U 119.<sup>25</sup> Antibodies were purified from cell culture supernatant on protein G–Sepharose. Fab fragments were prepared using the Immunopure IgG1 Fab preparation kit (Pierce, Rockford, IL). Affinities of CD28.3 mAb and their Fab fragments were compared by biosensor analysis (Biacore) and were found to be  $4.3 \times 10^{-9}$  and  $1.7 \times 10^{-9}$ , respectively. Purified CTLA4 immunoglobulin was obtained from R. Peach

(Bristol-Myers Squibb, Stamford, CT). Keyhole limpet hemocyanin was from Sigma (St Louis, MO), and dinitrophenol-conjugated ovalbumin was a gift from F. Nisol (University of Louvain, Belgium). Antibodies were given intraperitoneally at a dose of 1 mg/injection. CTLA4 immunoglobulin was given intraperitoneally at a dose of 0.5 mg/injection.

### Proliferation assays

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or CD4<sup>+</sup> T cells, or rat T cells were seeded in triplicate at a final concentration of  $10^5$  cells/well in RPMI 1640 (Sigma), glutamine, nonessential amino acids, sodium pyruvate, and antibiotics, and 10% heat-inactivated autologous serum (plus  $5 \times 10^{-5}$  M 2-βME for rat cells) and were cultured for 5 days with  $2 \times 10^4$  allogeneic dendritic cells (for rat) or  $10^5$  PBMCs (human) irradiated at 30 Gy. Proliferation was measured by 1 μCi (37 Bq) <sup>3</sup>H incorporation after 16-hour incubation. Results expressed are cpm per triplicate or proliferation indexes: (cpm MLR – cpm stimulating cells alone)/(cpm responding cells alone).

### Immunizations and self-restricted responses

LEW.1A rats were immunized in the footpad with 50 μg KLH in complete Freund adjuvant. Serum and draining lymph nodes were harvested 11 days after injection. Triplicate 0.2-mL cultures of draining lymph node cells ( $3 \times 10^5$ /well) were cultured in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 2-ME, glutamine, nonessential amino acids, sodium pyruvate, antibiotics, and 0 to 50 μg/mL KLH. Cultures were incubated for 72 hours and were pulsed with [<sup>3</sup>H] thymidine (1.0 μCi (37 Bq)/10 μL per well) for the last 16 hours. Data are presented as stimulation indexes (average counts per minute in cultures with stimulus divided by those in control cultures without stimulus) or Δcpm (Δcpm = mean cpm in cultures with stimulus – mean cpm in control cultures without stimulus).

### Assay for DNP- and KLH-specific antibody production

Serum levels of anti-dinitrophenol (DNP) and anti-KLH IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, and IgM subclasses were determined by enzyme-linked immunosorbent assay, as described previously.<sup>26</sup> Briefly, 96-well microtiter plates (Immulon, Chantilly, VA) were coated with bovine γ globulin–DNP or with KLH at 5 μg/mL. After blocking the plates with gelatin (Sigma) and incubating serum serial dilutions in 0.1% phosphate-buffered saline–Tween 20 for 2 hours at 37°C, plates were developed using horseradish peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-rat individual isotypes (IgG1, MARG1-2; IgG2a, MARG2a-1; IgG2b, MARG2b-3; IgG2c, MARG2c-5; IgM, MARM-4; generous gift from H. Bazin, University of Louvain, Belgium). The concentration of anti-DNP antibody was estimated using standard curves generated by incubating the DNP-coated plates with anti-DNP rat monoclonal antibody (IgG1, LODNP-1; IgG2a, LODNP-16; IgG2b, LODNP11; IgM, LODNP34; generous gift from H. Bazin). Titer comparisons were performed in the linear range of the assay. Titers of anti-DNP IgG2c responses and anti-KLH antibody responses are represented as the serum dilution needed to reach an OD<sub>405</sub> of 0.5 in the assay.

### Graft-versus-host disease induction and monitoring of cell proliferation *in vivo*

A 1:1 mixture of mononuclear cells from rat spleen and mesenteric lymph nodes was resuspended at  $5 \times 10^7$  cells/mL in RPMI containing 5 μM 5-6-carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE; Molecular Probes, Eugene, OR) and was incubated at 37°C for 20 minutes, as previously described.<sup>27</sup> Unbound CFDASE or the deacetylated form, CFSE, was quenched by 3 washes in complete medium. CFSE-labeled cells ( $2 \times 10^8$ ) were injected intravenously in congenic or allogeneic rats treated 24 hours earlier with whole-body sublethal irradiation of 8 Gy using a cobalt Co 60 source. Recipients were killed after 3 days for analysis of spleen and mesenteric lymph node cells. Sensitivity of FL1 detection was adjusted so that residual recipient T cells could be distinguished from CFSE-labeled cells that divided up to 9 times.



## Flow cytometry

At the time of harvest, spleen and mesenteric lymph node cells were washed in cold phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide. At least  $2 \times 10^5$  cells per sample were stained with biotin-conjugated monoclonal antibody specific for CD4 (W3/25), CD8 (ox8), CD25 (ox39), and CD62L (ox85) or with biotin-conjugated Annexin-V (Immunotech, Marseille, France) followed by PC5-conjugated streptavidin (Immunotech). Cytometry was performed on a Becton Dickinson FACSCalibur single-laser cytometer using standard Cell Quest acquisition analysis software, and fluorescence compensation was achieved using the appropriate single-fluorochrome-labeled samples. Twenty thousand events in the lymphocyte acquisition gate were collected. Analysis of cell division (CFSE-fluorescence profile) was restricted to the CD4<sup>+</sup> subset of CFSE-labeled cells.

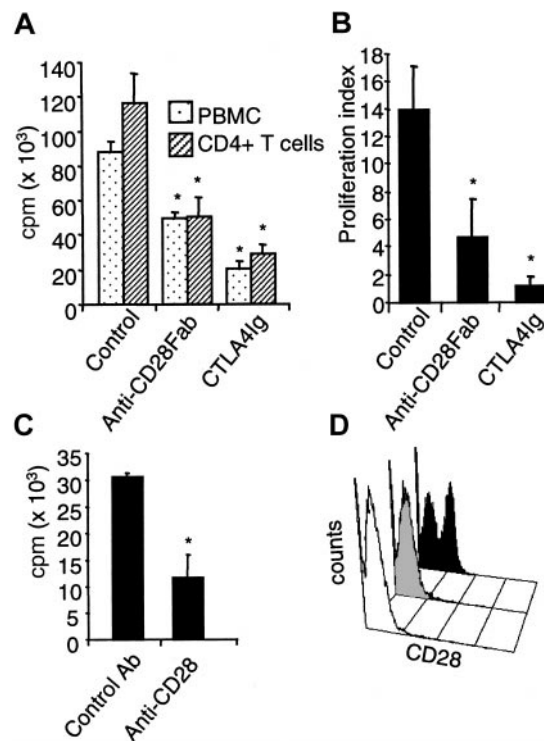
## Quantitation of cytokine mRNA

Cells ( $4 \times 10^6$ ) from mixed lymphocyte reactions were collected after 5 days of culture. Cells were lysed in guanidinium isothiocyanate, and total RNA was extracted as previously described.<sup>28</sup> Total RNA (10  $\mu$ g) was treated with DNase (Promega, Charbonnières, France) and was retro-transcribed using 100  $\mu$ M oligo dT (Gibco BRL), 10 mM dithiothreitol (Promega), 0.5 mM each of 4 dNTPs, 40 U RNase OUT, and 200 U M-MLV reverse transcriptase. Quantitative polymerase chain reaction was carried out in a 7700 Sequence Detector TaqMan (Perkin Elmer) using the following primers: IL-2, 5'-AAACACAGCTACAACCTGGAGCA-3' and 5'-GCTGATTAAGTCCCTGGGTCTT-3'; IFN- $\gamma$ , 5'-TGTCCAACGCAAAGCAATACA-3' and 5'-TTCGCTCCCTGTTTGTAGTG-3'; IL-4, 5'-CACCGAGTTGACCGTAACAGAC-3' and 5'-TACTCTGGTTGGCTTCCTTCAC-3'; IL-5, 5'-TGTATGCCATCCCCACAGAA-3' and 5'-TTCCACAGTACCCCTTGC-3'; HPRT, 5'-ATTGACTGGCAAAA-CAATGCA-3' and 5'-TCCAACACTTCGTGGGGTCC-3'.

## Results

### Selective blockade of CD28 reduces T-cell proliferation in primary and secondary mixed lymphocyte reaction

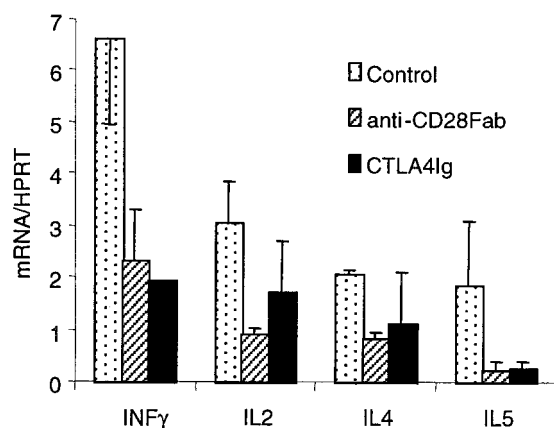
To compare a selective blockade of CD28 with a blockade of B7, we first assayed the effect of monovalent Fab fragments from a blocking anti-CD28 antibody with that of CTLA4 immunoglobulin on mixed lymphocyte reactions (MLRs) using pure T cells as proliferating responders. The direct presentation pathway accounts for 90% of the measured proliferation in this setting.<sup>29</sup> Allogenic proliferation of PBMCs or CD4<sup>+</sup> T cells was typically reduced by 60% in the presence of optimal doses of anti-CD28 Fab fragments (10  $\mu$ g/mL), whereas CTLA4 immunoglobulin (5  $\mu$ g/mL) reduced proliferation to 75% in human MLR and nearly completely in rat MLR (Figure 1A-B). Proliferation was reduced to the same extent with anti-CD86 antibodies (data not shown). A similar reduction of proliferation was obtained ex vivo using CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells from rats treated with the modulating JJ319 anti-CD28 antibody, stimulated with allogenic APCs (Figure 1C-D). The observed reduction of T-cell proliferation with CD28 or B7 blockade was paralleled by a reduction in the production of IFN- $\gamma$  and IL-2 in human MLR (Figure 2). Up-regulation of messenger RNA for IL-4 and IL-5 was also inhibited by anti-CD28 Fab and CTLA4 immunoglobulin. In secondary stimulation in vitro with donor APC, the addition of anti-CD28 Fab or CTLA4 immunoglobulin reduced proliferation by 40% to 50% (Figure 3), showing that the inhibition of CD28 or B7 also blocked the proliferation of primed alloimmune cells to a similar extent.



**Figure 1. Specific CD28 blockade reduces human and rat T-cell proliferation in primary MLR.** (A) Human PBMCs or CD4<sup>+</sup> T cells ( $10^5$ ) were stimulated with  $10^5$  allogenic irradiated PBMCs with 10  $\mu$ g/mL control IgG, anti-human CD28 Fab fragments, or 5  $\mu$ g/mL CTLA4 immunoglobulin, and proliferation was measured after 5 days. Mean  $\pm$  SD of triplicates from 1 of 8 representative experiments is shown. (B) Purified LEW.1A rat T cells ( $10^5$ ) from spleen were stimulated with  $2 \times 10^4$  irradiated LEW.1W rat dendritic cells, incubated with 5  $\mu$ g/mL control IgG, anti-rat CD28 Fab fragments, or CTLA4 immunoglobulin and processed as in panel A. Data are mean  $\pm$  SD of 3 experiments. (C) LEW.1A rats received 1 mg modulating anti-rat CD28 JJ319 intraperitoneally at days 0 and 2, and spleens were collected at day 3;  $10^5$  purified T cells were then challenged with  $2 \times 10^4$  irradiated allogenic dendritic cells without further addition of antibody in vitro. (D) Expression of CD28 on spleen cells from rat treated with modulating anti-CD28 mAb. The white histogram indicates the background level of fluorescence with secondary antibody alone; shaded histogram, spleen lymphocytes at day 3 from a rat treated with 1 mg anti-CD28 mAb at days 0 and 2; and black histogram, spleen lymphocytes at day 3 from a rat treated with 1 mg control IgG at days 0 and 2. \*indicates significant at  $P < .05$ .

### Down-modulation of CD28 in vivo inhibits donor T-cell expansion and development of graft-versus-host disease

To investigate whether the reduced proliferation of allogeneic T cells by selective CD28 blockade we observed in vitro could also be evidenced in vivo, we followed up the fate and function of T cells that recognize recipient alloantigens after in vivo transfer. We used a model in which CFSE-labeled spleen cells from LEW.1A rats were transplanted into sublethally irradiated allogeneic LEW.1W recipients. In this model, donor CD4<sup>+</sup> T cells engraft, expand, and represent more than 95% of proliferating cells, resulting in lethal GVHD within 13 days. Sublethally irradiated recipients were treated with modulating anti-CD28 mAb, CTLA4 immunoglobulin, or mouse IgG. On day 3, CFSE<sup>+</sup> donor cells in recipient spleen and mesenteric lymph nodes were analyzed for CFSE fluorescence intensity, expression of CD25, and binding of Annexin V on donor CD4<sup>+</sup> T cells. Fifty percent of CFSE-labeled CD4<sup>+</sup> T cells recovered after 3 days either had undergone no division (ie, their fluorescence was maximal) or had undertaken a single mitosis. Because halving of CFSE intensity was also found in syngenic controls on 50% of the cells, we considered one division as not related to allogeneic stimulation. Homeostatic growth (more than one division) of syngenic CFSE-labeled CD4<sup>+</sup> T cells in irradiated



**Figure 2. Specific CD28 blockade reduces cytokine production in primary MLR.** Human PBMCs ( $10^5$ ) were stimulated with  $10^5$  allogenic irradiated PBMCs with 10  $\mu$ g/mL control IgG, anti-human CD28 Fab fragments, or 10  $\mu$ g/mL CTLA4 immunoglobulin. Total mRNA was extracted from 48 wells after 5 days, retrotranscribed, and analyzed by quantitative polymerase chain reaction. Results (mean  $\pm$  SD of 3 measurements) are relative numbers of transcripts reported to HPRT.

recipients was significant (10% or 15% of transplanted cells in mesenteric lymph nodes or spleen, respectively) but was weaker than the proliferating allogenic CD4<sup>+</sup> T cells, which represented 35% or 40% of mononuclear cells in MLN (not shown) and spleen (Figure 4A), respectively. Most (80%) of proliferating allogenic T cells underwent between 6 and 9 mitoses after 3 days.

Treatment of recipients with CTLA4 immunoglobulin reduced recovery of proliferating cells by 60% (10% of allospecific growth instead of 25% in control IgG-treated animals). Treatment of recipients with modulating anti-CD28 mAb was even more efficient and reduced recovery of proliferating cells by more than 80% (5% of allospecific growth instead of 25% in control IgG-treated animals) (Figure 4B). CD25 was expressed on 12% of host (CFSE<sup>-</sup>) mononuclear cells and of donor allogenic cells before 4 mitoses. The proportion of responding CD25<sup>+</sup> cells increased with cycling. Treatment of recipients with CTLA4 immunoglobulin reduced the proportion of CD25-expressing cells by 40%, whereas treatment with anti-CD28 mAb did not (Figure 4C). These data indicate that alloresponsive T cells are activated after several cycles of division and that a selective blockade of CD28 reduces the accumulation of proliferating cells but does not prevent the activation of the few cells that still divide. In contrast B7 blockade was less efficient at inhibiting the accumulation of dividing cells, but it reduced the activation of responding cells. Annexin V bound to less than 5% of host CFSE<sup>-</sup> cells in spleen or MLN. Binding to proliferating (CFSE weak) alloresponsive cells was similarly low. Treatment of recipients with CTLA4 immunoglobulin induced Annexin V binding on 10% to 15% of cells that underwent up to 6 divisions, and this level decreased to 5% after 8 divisions. In contrast, treatment with anti-CD28 mAb induced Annexin V binding on a proportion of cells increasing with proliferation. After 7 division cycles, 35% of cells were entering apoptosis. Interestingly, after 8 and 9 cycles of division (most proliferating allogenic cells were found at this stage), the percentage of Annexin V<sup>+</sup> cells was reduced to reach 20% to 15% (Figure 4D). The effect of anti-CD28 treatment on allospecific growth was also evidenced by the partial prevention of GVHD lethality (data not shown). In conclusion, we found that the modulation of CD28 commits to apoptosis allogenic CD4<sup>+</sup> T cells stimulated in vivo through the direct presentation pathway and that it reduces their proliferation.

### In contrast to alloreactive responses, antibody responses to nominal antigens were not modified by selective down-modulation of CD28

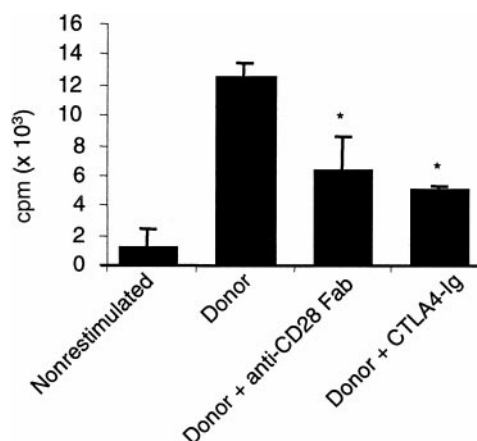
To compare the effect obtained using B7 antagonists with CD28 antagonists on antibody responses, we immunized rats intraperitoneally with 10  $\mu$ g DNP-OVA without adjuvant or with 50  $\mu$ g KLH subcutaneously in CFA and treated them with control IgG, CTLA4 immunoglobulin, or modulating anti-CD28 mAb every 2 days from day 0 until day 6 after immunization. Blood sampling at day 6 of animals treated with anti-CD28 mAb confirmed that CD28 had been fully modulated on PBMCs. Animals treated in parallel and killed on day 6 confirmed that a full modulation of CD28 expression was also obtained on spleen and draining lymph node T cells. Treatment with CTLA4 immunoglobulin inhibited antibody responses of all subclasses measured after 2 weeks, regardless of whether adjuvant was used in immunizations. In sharp contrast, no reduction, in any subclass, could be observed after treatment with anti-CD28 mAb, even when antigen was given without adjuvant (Figure 5A-B). Thus, the antibody response in the rat with fully modulated CD28 was normal.

### Proliferative responses to KLH immunization are unmodified by specific CD28 down-modulation

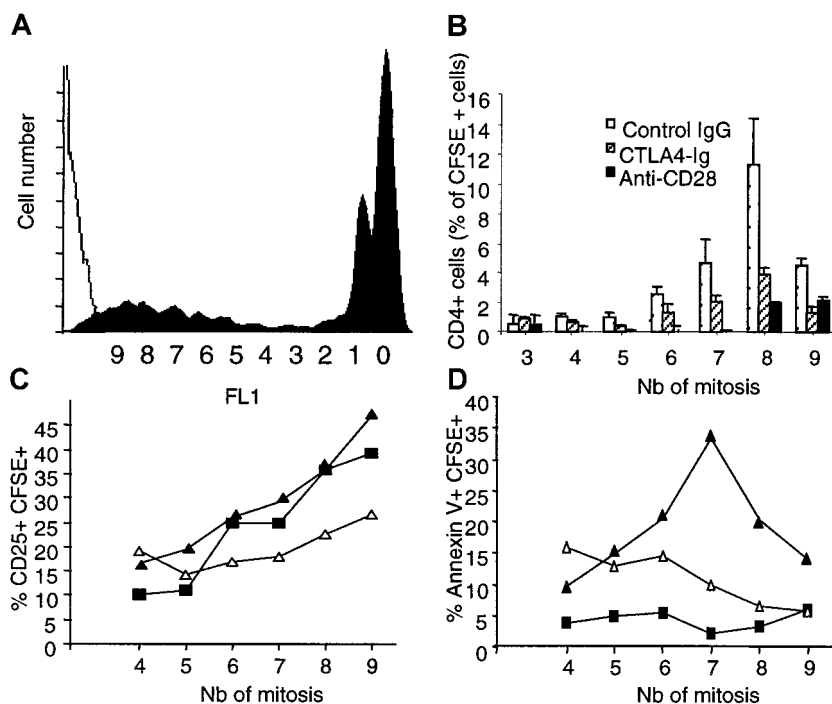
Draining lymph node cells from rats immunized with KLH in Complete Freund Adjuvant (CFA) were restimulated in vitro with KLH, and we measured proliferation after 3 days. Cells from rats treated with control IgG or with anti-CD28 mAb fully responded to this secondary stimulation, whereas proliferation was reduced by 75% if CTLA4 immunoglobulin was infused (Figure 6A). Moreover, the addition of anti-CD28 Fab fragments in vitro in KLH-restimulated cells from immunized untreated animals did not reduce proliferation, whereas CTLA4 immunoglobulin was effective in this setting (Figure 6B). Thus, proliferative responses to soluble antigens can be inhibited by B7 blockade but not by CD28 blockade.

## Discussion

In this study, we investigated the role of CD28 in T-cell responses to alloantigens elicited by the "direct" presentation pathway and to



**Figure 3. Specific CD28 blockade reduces proliferation in secondary MLR.** Human PBMCs ( $10^7$ ) were stimulated with  $10^7$  allogenic irradiated PBMCs. After 7 days, cells were washed and cultivated for 3 days. Then  $2 \times 10^4$  primed cells were restimulated with  $2 \times 10^4$  donor-irradiated PBMCs with 10  $\mu$ g/mL control IgG, anti-human CD28 Fab fragments, or 5  $\mu$ g/mL CTLA4 immunoglobulin. Proliferation was measured after 3 days. Mean  $\pm$  SD of triplicate results from 1 of 4 representative experiments is shown. \*indicates significance at  $P < .05$ .

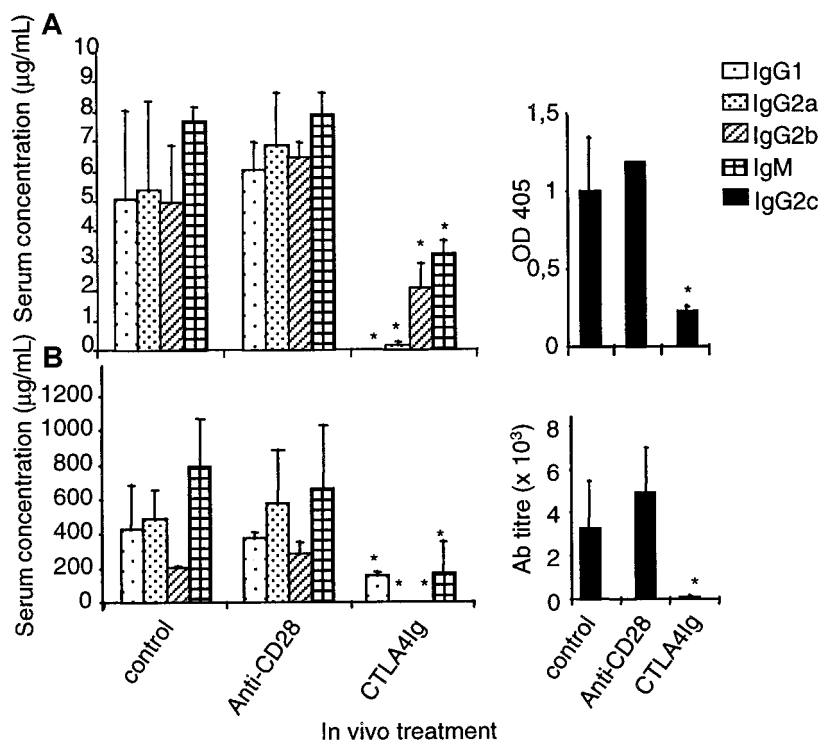


**Figure 4. Modulation of CD28 in vivo reduces allogenic T-cell proliferation in GVHD.** Spleen mononuclear cells from LEW.1A rats ( $3 \times 10^8$ ) were labeled with CFSE and transplanted intravenously into irradiated LEW.1W. Recipients received intraperitoneally 1 mg control IgG or modulating anti-rat CD28 JJ319 or 0.5 mg CTLA4 immunoglobulin at days 0 and 2. At 3 days, spleen lymphocytes were harvested and analyzed by FACS after gating on CD4<sup>+</sup> cells. (A) The black histogram indicates the CFSE profile of control-treated recipients gated on CD4<sup>+</sup> T cells; and the white histogram, FL1 signal of recipient CD4<sup>+</sup> T cells from nontransplanted control. Y axis shows cell number per fluorescence channel. X axis shows halving of fluorescence after each mitosis. (B) The histogram indicates the measurement of alloreactive CD4<sup>+</sup> T cells according to their division status. Data are mean  $\pm$  SD from 3 animals. (C, D) Expression of CD25 and binding of Annexin V on proliferating CFSE<sup>+</sup> cells. (■) Recipients treated with control IgG. (△) Recipients treated with CTLA4 immunoglobulin. (▲) Recipients treated with anti-CD28. Nb indicates the number of mitosis according to fluorescence intensity halving.

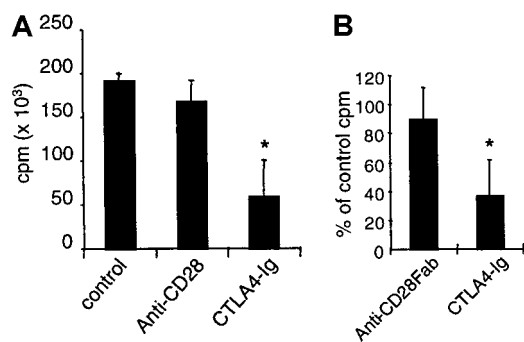
nominal antigens presented in the context of self-MHC molecules. We compared the blockade of CD28 (using Fab fragments from antagonist antibodies or modulating mAb) with that of B7 (using CTLA4 immunoglobulin). Fab fragments do not induce signal transduction, yet they remain capable of efficient blockade of B7 binding.<sup>19</sup>

We show first that anti-CD28 Fab reduced the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in vitro elicited by the direct pathway of allorecognition. CD28 and B7 blockade reduced the production of Th1 and Th2 cytokines in primary MLR. A reduction in TH2 development after CD28 blockade is consistent with the role of CD28 in

increasing IL-4 receptor sensitivity, which drastically promotes Th2 generation through the IL-4-mediated pathway.<sup>30</sup> CD28 and B7 blockade were also effective in secondary stimulation (Figure 3), indicating that naive and primed alloreactive cells equally necessitate costimulation through CD28. In vivo, in a model of GVHD in which mitosis of alloreactive cells can be monitored, the administration of modulating anti-CD28 mAb is effective in the inhibition of allogenic T-cell proliferation. Proliferating cells had an activated phenotype: they expressed high levels of CD25 (and low levels of CD62L, not shown), regardless of whether modulating



**Figure 5. Modulation of CD28 in vivo does not modify antibody responses.** Rats were immunized intraperitoneally with 10  $\mu$ g DNP-OVA without adjuvant (A) or subcutaneously with 50  $\mu$ g KLH in CFA (B). Recipients received intraperitoneally 1 mg control IgG or modulating anti-rat CD28 JJ319 or 0.5 mg CTLA4 immunoglobulin at days 0, 2, 4, and 6. Isotyping of the specific antibody responses was performed by enzyme-linked immunosorbent assay at day 12 (A) or 18 (B). \* indicates significance at  $P < .05$ .



**Figure 6. Inhibition of CD28 does not modify proliferative responses to KLH immunization.** Rats were immunized subcutaneously with 50  $\mu$ g KLH in CFA. Recipients received intraperitoneally 1 mg control IgG or modulating anti-rat CD28 JJ319 or 0.5 mg CTLA4 immunoglobulin, as indicated, at days 0, 2, 4, and 6. Draining lymph node cells were collected after 2 weeks and were restimulated *in vitro* with 2.5  $\mu$ g/mL KLH. Proliferation was measured after 3 days. (A) Mean proliferation of nonrestimulated cells was 5000 cpm. (B) In cultures from immunized but control-treated animals, control IgG, anti-CD28 Fab (10  $\mu$ g/mL), or CTLA4 immunoglobulin (10  $\mu$ g/mL) was added, and proliferation was measured after 3 days. \*indicates significance at  $P < .05$ .

anti-CD28 mAb was given. Administration of CTLA4 immunoglobulin consistently reduced by 40% the percentage of CD25<sup>+</sup> cells in proliferating cells (and increased in proportion the percentage of CD62L<sup>+</sup> cells, not shown). That B7 blockade and not CD28 blockade inhibits activation of alloreactive T cells, whereas CD28 blockade inhibits proliferation more strongly, suggests that B7 delivers an activation signal through a molecule other than CD28. Reports showing that CTLA-4 can promote costimulation *in vivo*<sup>7,8</sup> suggest that a signal through CTLA-4 might promote activation in GVHD. Alternatively, a B7 ligand other than CTLA-4 and CD28, the existence of which was functionally demonstrated recently, might promote activation.

In contrast with data previously reported in mice,<sup>31</sup> proliferating rat T cells did not commit to apoptotic cell death in untreated, allogeneic, irradiated recipients (Figure 4D). In anti-CD28-treated rats, however, it was clear that T cells became increasingly susceptible to apoptosis with each cycle of cell division. Above 8 divisions this susceptibility to apoptosis decreased and was correlated with a higher recovery of alloreactive cells. This commitment to apoptotic cell death with proliferation was not present with B7 blockade (Figure 4), suggesting that the difference lies in the unaltered CTLA-4–B7 interaction when anti-CD28 mAb, but not CTLA4 immunoglobulin, is used, which might promote the inhibition of cell division and cell death. Maximal apoptotic events were measured only after 7 divisions, which refers to reports showing that cross-linking of CTLA-4 on resting CD4<sup>+</sup> T cells blocks transition from G0 to G1 and induces the antiapoptotic factor Bcl-xL,<sup>17</sup> whereas cross-linking CTLA-4 on activated CD4<sup>+</sup> T cells induces Fas-independent cell death.<sup>18</sup> However because of the complex and yet not fully clarified mechanisms of action of CTLA-4 *in vivo* that have been reported so far, ranging from costimulation<sup>7,8</sup> to inhibition,<sup>32</sup> a role for a free CTLA-4–B7 interaction that may inhibit allogeneic T-cell growth in our GVHD model remains speculative. Collectively, these data show that blocking costimulation through CD28 or B7 results in a reduction of alloreactive T-cell proliferation but that the mechanisms are different.

Soluble antigens are processed by self-APCs that expose antigenic peptides in association with self-MHC class 2 molecules. APCs then signal CD4<sup>+</sup> T cells that proliferate and provide help for effector T-cell responses and antibody responses. Molecules stimulated by B7 appear essential for the development of the immune response to self-restricted presentation because CTLA4 immunoglobulin completely blocks the induction of T-dependent alloantibodies.<sup>15</sup> Here, we found that a selective blockade of CD28 in the rat has no effect on self-restricted

responses measured *in vivo* or *ex vivo*, whereas B7 blockade with CTLA4 immunoglobulin clearly inhibits this type of response in primary or secondary stimulation. The strength of immunization does not appear to determine whether CD28 is required as similar results were obtained in a weak (low dose without adjuvant) and in a strong (high dose in CFA) immunization protocol. This suggests at least that B7 molecules are instrumental in self-restricted responses to soluble antigens, independent of CD28, and it would mean that either B7–CTLA-4 interaction is paradoxically required for self-restricted responses to occur or that another, yet unidentified, ligand for B7 on T cells is necessary. The first hypothesis is refuted by numerous studies evidencing suppression of the production of multiple cytokines<sup>3</sup> and cyclins<sup>33</sup> after engagement of CTLA-4, which is clearly identified as a CD28 antagonist. However, other reports have shown that CTLA-4 can actually costimulate T-cell clonal expansion and the production of cytolytic T cells.<sup>7,8</sup> The second hypothesis pertains to the data by Mandelbrot et al<sup>34</sup> showing that B7-dependent costimulation can be evidenced in CD28–CTLA4 double-knockout mice.

Autoreactive T cells that serve as a pool of potentially pathogenic cells are positively selected in the thymus for their low affinity for peptides bound to self-MHC molecules expressed on cortical epithelial cells. Their low affinity is likely caused by the physico-chemical characteristics of the TCR- $\alpha$  CDR3 region, which tends to be cross-reactive and “sticky.”<sup>35</sup> It is, therefore, tempting to attribute the effect of CD28 blockade on several autoimmune disorders reported in mice<sup>19,20,36,37</sup> to the relatively low affinity of the interactions involved. Indeed, Teh and Teh<sup>38</sup> recently reported that the dependence on CD28 for the efficient deletion of self-specific thymocytes is determined by the concentration, affinity/avidity, and length of exposure to the deleting ligand. In transplantation, a proportion of naive T cells can be activated by the recognition of either intact donor MHC–peptide complexes on allogeneic APCs (direct pathway) or by peptides derived from allogeneic molecules presented on self-MHC (indirect pathway). As much as 20% of peripheral T cells appear able to be contacted in such a direct way with allogeneic APCs, but most of the TCR–MHC interactions do not reach an affinity threshold sufficient to result in full activation and proliferation.<sup>39</sup> An interaction of substantially higher affinity is likely to drive alloreactive T-cell proliferation after direct contact with allogeneic APCs. In this study, we show that CD28 blockade appears sufficient to modulate direct allogeneic stimulation of T cells. Stimulation by superantigen, which mimics MHC framework-dependent allorecognition, can also be inhibited.<sup>40</sup> Anti-CD28 treatment<sup>21</sup> or use of CD28<sup>–/–</sup> recipients,<sup>41</sup> however, prolongs survival but does not allow for long-term survival of allogeneic grafts, confirming the idea that CD28 blockade is principally active on the direct pathway responsible for the initiation of rejection.

In conclusion, our data demonstrate that CD28 costimulation is required for full responses of CD4<sup>+</sup> T cells to stimulation by allogeneic APCs but that it is not required for responses to soluble antigens, whereas both types of responses require B7 molecules. Selectively blocking CD28 might be relevant for clinical transplantation because the direct presentation pathway of alloantigens can lead to acute rejection, but the induction of immune tolerance is thought to require a self-restricted response and a free CTLA-4–B7 interaction.

## Acknowledgments

We thank C. Usal and S. Iyer for excellent technical assistance, G. Boulday and J. M. Heslan for technical advice, and R. Peach for purified CTLA4 immunoglobulin. We also thank P. Vusiau for biosensor analysis, F. Nisol and H. Bazin for anti-rat immunoglobulin mAb and DNP-OVA, and M. Brunet for irradiations.

## References

- Kirchhoff S, Muller WW, Li-Weber M, Krammer PH. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol*. 2000;30:2765-2774.
- Boonen GJ, van Dijk AM, Verdonck LF, van Lier RA, Rijksen G, Medema RH. CD28 induces cell cycle progression by IL-2-independent down-regulation of p27kip1 expression in human peripheral T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1999;29:789-798.
- Alegre ML, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol*. 1998;161:3347-3356.
- Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med*. 1998;188:205-210.
- Bachmann MF, Gallimore A, Jones E, Ecabert B, Acha-Orbea H, Kopf M. Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur J Immunol*. 2001;31:450-458.
- Bachmann MF, Kohler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol*. 1999;163:1128-1131.
- Wu Y, Guo Y, Huang A, Zheng P, Liu Y. CTLA-4-B7 interaction is sufficient to costimulate T cell clonal expansion. *J Exp Med*. 1997;185:1327-1335.
- Zheng P, Wu Y, Guo Y, Lee C, Liu Y. B7-CTLA4 interaction enhances both production of antitumor cytotoxic T lymphocytes and resistance to tumor challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:6284-6289.
- Linsley PS, Greene JL, Tan P, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992;176:1595-1604.
- Finck BK, Linsley PS, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA4lg. *Science*. 1994;265:1225-1227.
- Silver PB, Hathcock KS, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol*. 2000;165:5041-5047.
- Lin H, Bolling SF, Linsley PS, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4lg plus donor-specific transfusion. *J Exp Med*. 1993;178:1801-1806.
- Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, et al. 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*. 1995;181:1145-1155.
- Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science*. 1992;257:789-792.
- Guillot C, Coatalem H, Froud D, et al. Indefinite heart allograft survival after adenovirus-mediated gene transfer of TGFb1 or CTLA4lg: International Conference in Molecular Medicine and Gene Transfer; 1999; Heraklion, Greece.
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulat DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 1992;356:607-609.
- Blair PJ, Riley JL, Levine BL, et al. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol*. 1998;160:12-15.
- Scheipers P, Reiser H. Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10083-10088.
- Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1999;163:1704-1710.
- Yu XZ, Bidwell SJ, Martin PJ, Anasetti C. CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2000;164:4564-4568.
- Dengler TJ, Szabo G, Sido B, et al. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation*. 1999;67:392-398.
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993;261:609-612.
- Bachmaier K, Pummerer C, Shahinian A, et al. Induction of autoimmunity in the absence of CD28 costimulation. *J Immunol*. 1996;157:1752-1757.
- Wu Y, Zhou Q, Zheng P, Liu Y. CD28-independent induction of T helper cells and immunoglobulin class switches requires costimulation by the heat-stable antigen. *J Exp Med*. 1998;187:1151-1156.
- Pages FRM, Klasen S, Battifora M, et al. Two distinct intracytoplasmic regions of the T-cell adhesion molecule CD28 participate in phosphatidylinositol 3-kinase association. *J Biol Chem*. 1996;271:9403-9409.
- Gray D, Chassoux D, MacLennan IC, Bazin H. Selective depression of thymus-independent anti-DNP antibody responses induced by adult but not neonatal splenectomy. *Clin Exp Immunol*. 1985;60:78-86.
- Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;171:131-137.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979;18:5294-5299.
- Sébille F, Guillet M, Brouard S, et al. T-cell-mediated rejection of vascularized xenografts in the absence of induced anti-donor antibody response. *Am J Transplant*. 2001;1:21-28.
- Kubo M, Yamashita M, Abe R, et al. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. *J Immunol*. 1999;163:2432-2442.
- Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med*. 1999;5:1298-1302.
- Fallarino F, Fields PE, Gajewski TF. B7-1 engagement of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 inhibits T cell activation in the absence of CD28. *J Exp Med*. 1998;188:205-210.
- Brunner MC, Chambers CA, Chan FK, Hanke J, Winoto A, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol*. 1999;162:5813-5820.
- Mandelbrot DA, Oosterwegel MA, Shimizu K, et al. B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4. *J Clin Invest*. 2001;107:881-887.
- Martin A, Barbesino G, Davies TF. T-cell receptors and autoimmune thyroid disease—signposts for T-cell antigen-driven diseases. *Int Rev Immunol*. 1999;18:111-140.
- Tada Y, Nagasawa K, Ho A, et al. Role of the costimulatory molecule CD28 in the development of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol*. 1999;163:3153-3159.
- Girvin AM, Dal Canto MC, Rhee L, et al. 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*. 2000;164:136-143.
- Teh HS, Teh SJ. The affinity/avidity and length of exposure to the deleting ligand determine dependence on CD28 for the efficient deletion of self-specific CD4+CD8+ thymocytes. *Cell Immunol*. 2001;207:100-109.
- Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001;166:973-981.
- Saha B, Harlan DM, Lee KP, June CH, Abe R. Protection against lethal toxic shock by targeted disruption of the CD28 gene. *J Exp Med*. 1996;183:2675-2680.
- Szot GL, Zhou P, Sharpe AH, et al. Absence of host B7 expression is sufficient for long-term murine vascularized heart allograft survival. *Transplantation*. 2000;69:904-909.

### 4.3. Discussion et perspectives :

Notre travail démontre que le blocage spécifique du CD28, laissant libre l'interaction CTLA-4/B7, diffère du blocage des molécules B7 bloquant à la fois la liaison à la molécule CD28 et à la molécule CTLA-4.

*In vitro*, les expériences réalisées sur des cellules humaines et les cellules de rat montrent que le blocage spécifique du CD28 ou des molécules B7 inhibe la prolifération des lymphocytes T alloréactifs (Figure 1A et 1B). *In vivo*, lors d'une GVHD, l'action des anti-CD28 et du CTLA4Ig diffère. En effet, le blocage spécifique de la molécule CD28 n'empêche pas l'activation des lymphocytes T (surexpression de CD25 et perte du CD62L) contrairement au traitement par le CTLA4Ig. Il a été montré, chez la souris comme chez l'homme, que l'activation de l'enzyme IDO par la stimulation des molécules B7 inhibe la prolifération des lymphocytes T (Munn, Sharma et al. 2004). Cette inhibition est due au catabolisme du tryptophane (aa essentiel pour la survie des lymphocytes T) aboutissant à la production de kynurenine. L'inhibition observée, *in vitro*, après le blocage de la molécule CD28 ou des molécules B7 serait peut-être due à une activation de l'enzyme IDO. En effet, il a été démontré que la molécule CTLA4-Ig fixe les molécules B7 et induit la synthèse d'IDO (Grohmann, Orabona et al. 2002). L'inhibition spécifique du CD28 laisse libre l'interaction CTLA-4/B7, cette interaction CTLA4/B7 pourrait être suffisante pour induire l'activation d'IDO. Ainsi on pourrait s'attendre à obtenir les mêmes résultats entre le blocage spécifique du CD28, laissant libre l'interaction CTLA-4/B7, et le blocage des molécules B7 par du CTLA4Ig. Bloquer IDO en ajoutant du 1-MT dans les MLR inhibées par le Fab anti-CD28 ou le CTLA4-Ig permettrait peut-être de retrouver les capacités prolifératives des lymphocytes T. Afin de tester cette hypothèse, il serait également intéressant d'analyser tout d'abord l'action d'IDO dans le milieu de culture en dosant les produits de dégradation du tryptophane (doser par exemple le Kinurenine). De plus, comme Finger EB le suggérait, certaines cytokines telles que l'IL10 et/ou l'IFN $\gamma$  peuvent jouer un rôle dans l'activation d'IDO (Finger and Bluestone 2002). Il serait donc intéressant d'ajouter des anticorps bloquants anti-IFN $\gamma$  et/ou anti-IL10 pour évaluer le rôle de ces cytokines dans l'inhibition observé avec les Fab anti-CD28 et le CTLA4Ig en MLR. Enfin, comme l'activité d'IDO peut entraîner l'apoptose des lymphocytes T inhibés (Fallarino, Grohmann et al. 2002), il serait intéressant de regarder si, *in vitro*, les lymphocytes T sont plus susceptibles d'entrer en apoptose à l'issue du blocage des molécules B7 ou CD28. Si tel est le cas, le blocage d'IDO devrait diminuer l'apoptose observée. Nous

avons récemment démontré que lors d'une transplantation rénale chez le rat, le traitement d'induction à l'anti-CD28 induit la survie du greffon. Cette survie est accompagnée du développement de mécanismes 100 jours après la greffe régulateurs qui font intervenir en partie l'enzyme IDO. Les lymphocytes T alloréactifs des rats tolérants stimulés par les CPA du donneur sont plus susceptibles que des lymphocytes T naïfs à l'entrée en apoptose (*Haspot et coll, soumis*).

L'anti-CD28 de rat (JJ319) est connu pour ses propriétés modulatrices. Ainsi, après l'injection d'1mg de cet anticorps par voie intrapéritonéale, on observe une internalisation du CD28 à la surface des lymphocytes T de la rate (Figure 1D) et du sang. *In vitro*, les splénocytes d'un rat traité au JJ139 prolifèrent moins que les splénocytes d'un animal non traité suite à une stimulation allogénique (Figure 1D). *In vivo*, lors d'une GVHD, les lymphocytes T injectés sont également inhibés par le traitement au JJ319. Ces lymphocytes T ne prolifèrent que très peu, et ceux qui prolifèrent entrent en apoptose (Figure 4B et D). A l'inverse, ce traitement pourrait induire une très forte prolifération des lymphocytes T alloréactifs conjointement à leur entrée en apoptose. Cette hypothèse n'est cependant pas vérifiable avec le type d'expérimentations que nous avons utilisées. Ces observations sont assez proches de celles de Yu XZ chez la souris, où le traitement avec un anticorps anti-CD28 (37.51) entraîne une déplétion sélective des lymphocytes T reconnaissant un antigène *in vivo* (Yu, Albert et al. 2004). L'anticorps anti-CD28 JJ319 spécifique du rat pourrait réagir comme le clone 37.51 chez la souris en abaissant le seuil d'activation du TCR *in vivo* entraînant une déplétion périphérique des lymphocytes T réactifs (Yu, Martin et al. 2003).

Nous avons suggéré que les réponses de type « directes » nécessiteraient une costimulation par le CD28 alors que les réponses indirectes (restreintes par une molécule du CMH du soi) ne le nécessiteraient pas. Les souris CD28KO immunisées à la DNP-KLH présentent des niveaux d'activation des lymphocytes T helper équivalents aux souris sauvages ainsi qu'une sécrétion d'immunoglobuline semblables à celle des souris sauvages (Wu, Zhou et al. 1998). De même, lors d'une infection virale, le CD28 ne semble pas nécessaire à la réponse immunitaire car des souris CD28 KO répondent comme les souris sauvages à une infection par des virus tels que le MHV-A59 et le LCMV (Gonzales, Fu et al. 2004), (Suresh, Whitmire et al. 2001). Nous observons que la réponse à l'immunisation par un antigène soluble n'est pas altérée par l'inhibition spécifique du CD28 alors qu'elle est altérée lors de l'utilisation du CTLA4Ig (Figure 5A et 5B). de même, le blocage spécifique du CD28 lors de l'une immunisation à la KLH n'inhibe pas la prolifération des lymphocytes T helper *in vitro*

(Figure 6), car l'activation des lymphocytes T répondant à une stimulation de type indirecte est indépendante de la voie de costimulation CD28.

Nous avons observé que le blocage spécifique du CD28 n'empêche pas la surexpression de CD25 et la perte du CD62L par le lymphocyte T alors que le CTLA4Ig inhibe ce processus. On peut donc supposer que d'autres molécules inductibles sur le lymphocyte T activé, comme la molécule CD40L, ne sont pas mises en surface lors de l'utilisation du CTLA4Ig. Or l'interaction CD40/CD40L est nécessaire à la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte (van Kooten and Banchereau 2000). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression en surface de CD40L chez des rats immunisés et traités à l'anti-CD28 ou au CTLA4Ig afin de son absence corrèle avec l'absence de réponse Ig après le traitement au CTLA-4 (Figures 5A et 5B). Nous pourrions également nous demander si les lymphocytes T inhibés avec de l'anti-CD28 présentent des quantités de CTLA-4 membranaire en surface suffisantes pour activer IDO. Il serait intéressant de regarder, lors du blocage spécifique du CD28, l'expression du CTLA-4 membranaire des lymphocytes T hepler activés. En effet, la mise en surface de la molécule CTLA-4 est dépendante de l'activation du CD28

Dans la discussion du papier, nous interprétons l'expérience présentée dans la figure 6 par l'existence d'un autre récepteur des molécules B7. Dans cette expérience, nous avons immunisé des rats par injection de KLH dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite de rat. Nous avons ensuite analysé la prolifération des lymphocytes T issus des ganglions drainant le site d'immunisation. Les résultats présentés dans la figure 6 montrent que les lymphocytes T inhibés avec du CTLA4Ig, *in vivo* pendant l'immunisation, ou bien *in vitro* pendant la restimulation, ne prolifèrent pas. L'inhibition spécifique du CD28 n'a quant à elle aucun effet inhibiteur sur les lymphocytes T répondant à un antigène soluble. Notre première suggestion (existence d'un autre récepteur des molécules B7) s'appuyait sur les travaux de Mandelbrot DA et coll. Ces travaux prouvaient l'existence d'un autre récepteur des molécules B7 car ils démontraient que l'ajout de CTLA4Ig inhibait la prolifération *in vitro* de lymphocytes T CD28/CTLA-4 doubles KO induite par des cellules allogéniques (Mandelbrot, Oosterwegel et al. 2001). Nous suggérons désormais que les observations de Mandelbrot DA et coll sont la conséquence de l'activation d'IDO par la fixation de CTLA4Ig sur les molécules B7. Ainsi les observations faites dans notre modèle, concernant l'inhibition *in vitro* de la prolifération des lymphocytes T stimulés par un antigène soluble en présence de CTLA4Ig uniquement, peuvent également refléter l'activation d'IDO. L'ajout de 1-MT pour



inhiber l'activation d'IDO dans cette situation permettrait de confirmer notre nouvelle interprétation quant au rôle d'IDO dans l'inhibition de réponse à un antigène soluble.

Les résultats que nous avons observés concernant les conséquences des traitements à l'anti-CD28 pendant l'immunisation à un antigène nominal sont également retrouvés lors d'une transplantation. Il est intéressant de constater que, le traitement à l'anti-CD28 (JJ319) lors d'une transplantation cardiaque entre un rat donneur LEW.1W et un receveur LEW.1A augmente la survie du greffon sans bloquer les réponses humorales. Ces animaux présentent des alloanticorps dans leur sérum. Par contre, le traitement par du CTLA4Ig, lors d'une transplantation cardiaque qui augmente lui aussi la survie du greffon, inhibe les réponses humorales. Cependant, il a été démontré que le CTLA4Ig n'induisait pas de tolérance à un antigène (Wallace, Rodgers et al. 1995).

Compte tenu des résultats encourageant que nous avons obtenus en bloquant spécifiquement le CD28, notre équipe a développé une molécule de fusion entre la partie ScFv de l'anticorps CD28.3 humain et l' $\alpha$ 1-antitrypsine. Cette molécule Sc28AT a été testée en MLR et montre des capacités d'inhibition de proliférations de lymphocytes T humains (Vanhove, Laflamme et al. 2003). Cet effet a été confirmé dans un modèle de stimulation par un superantigène *in vitro* avec des cellules humaines. Dans ces conditions, le Sc28AT entraîne une diminution significative de la sécrétion d'IL-2 et d'IFN $\gamma$  ainsi qu'une augmentation de l'apoptose cellulaire. Cette molécule a également été testée chez le babouin sain et sera ensuite testée chez des babouins greffés.

L'inhibition sélective du CD28 a été testée en transplantation rénale, les résultats font l'objet d'une publication soumise qui constitue la deuxième partie des Résultats présentés dans cette thèse.

## 5. Le blocage spécifique du CD28 en transplantation rénale chez le rat entraîne une tolérance et le développement de cellules régulatrices.

### *5.1. Développement d'un protocole d'induction à la greffe rénale chez le rat :*

Les résultats présentés dans cette thèse sous forme de deux articles (un publié et un soumis) ne reflètent pas l'ensemble des travaux effectués durant mes trois ans de thèse. Aussi, il m'a semblé nécessaire d'évoquer certains de mes travaux qui m'ont permis d'établir le modèle d'induction de tolérance sous anti-CD28 qui constitue le cœur du second article présenté. Je vais donc décrire, de façon chronologique, l'approche expérimentale ainsi que les mises au point que j'ai réalisées pour établir un protocole d'induction de tolérance à la greffe rénale chez le rat.

Compte tenu de nos observations initiales (Haspot, Villemain et al. 2002) et des travaux de Dong V.M et coll concernant le blocage du CD28 en transplantation cardiaque (Dong, Yuan et al. 2002), nous avons décidé de caractériser les systèmes régulateurs mis en jeu dans le modèle de transplantation de rein chez le rat, modèle dans lequel l'activité du greffon soutient la vie de l'animal.

L'anticorps anti-CD28 de rat utilisé pendant cette thèse a été produit par nos soins au laboratoire. L'hybridome JJ319 fournit par Hunig T était mis en culture pour produire 1,5L de surnageant par semaine. Après avoir précipité le surnageant, et purifié l'anticorps sur une colonne de protéine G, la fonctionnalité de cet anticorps était évaluée par cytométrie en flux et comparée à une référence. La purification d'1,5L de surnageant permet d'obtenir entre 15 et 20 mg d'anticorps, quantité suffisante pour traiter deux rats greffés (protocole d'induction de tolérance par injection d'anti-CD28 à 4mg/kg de J0 à J7, modèle décrit plus loin).

Le blocage spécifique du CD28 a été testé en transplantation rénale entre un rat donneur LEW.1W et un receveur LEW.1A. Après la néphrectomie d'un rein du rat receveur, le greffon rénal est positionné dans la partie abdominale de l'animal et est directement branché sur la vessie. Sept jours après la transplantation, une néphrectomie controlatérale est réalisée. La survie de l'animal dépend alors de l'acceptation de son greffon. Sans aucun

traitement, le greffon rénal est rejeté en 14 jours c'est-à-dire 7 jours après la néphrectomie controlatérale. La transplantation rénale est plus complexe à réaliser et à réussir qu'une greffe ectopique de cœur. La survie du rat dépend de la réussite de la transplantation car ce greffon est vital pour le receveur. Contrairement à une greffe ectopique cardiaque dont le suivi consiste en une palpation journalière dont l'interprétation (intensité) est laissée au libre arbitre du palpeur, la greffe de rein est beaucoup moins permissive et les problèmes techniques (débranchement de l'uretère, caillot de sang dans l'uretère, mauvaise recirculation sanguine après déclampage, paralysie de l'arrière train) peuvent entraîner la mort de l'animal. Notre étude a dû s'accommoder de pertes engendrées par des problèmes techniques (40%).

Dengler T.J et coll ont démontré que le rejet d'une greffe cardiaque chez le rat pouvait être reculé par traitement avec de l'anti-CD28 (Dengler, Szabo et al. 1999). Ces données nous ont conduit à tester l'effet de l'anti-CD28 dans un modèle de rejet aigu de greffe rénale chez le rat. Le traitement sous anti-CD28 seul (4mg/kg J-1/J2) ne permet pas de prolonger la survie des greffons, les rats meurent 14 jours après la transplantation. Dong V.M et coll ont démontré l'existence d'une synergie entre la CsA et l'anti-CD28 pour éviter le développement du rejet aigu de greffe cardiaque chez le rat (Dong, Yuan et al. 2002). Ainsi, nous avons observé qu'un traitement d'induction associant la CsA (10mg/kg J0 à J3) et l'anti-CD28 (4mg/kg J-1 à J2) entraîne une survie de 100% des greffons rénaux. Cependant le traitement par de la CsA seule (10mg/kg J0/J3) induit également la survie de 100% des greffons rénaux (Cf Figure 13). Ainsi, dans la greffe de rein, un traitement d'induction par la CsA inhibe le rejet aigu alors que 3 jours de traitement avec l'anticorps anti-CD28 ne le font pas.

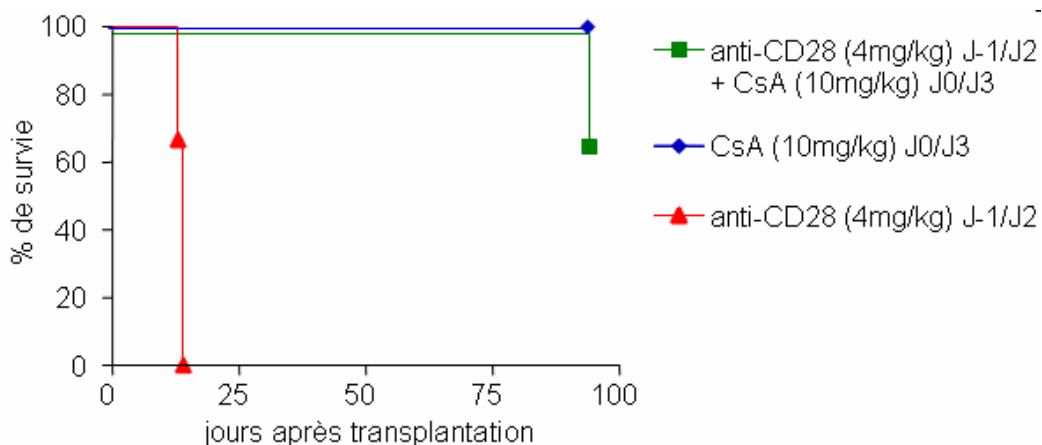


Figure 13: Survie des greffons rénaux.

Les receveurs LEW.1A de reins LEW.1W ont reçu les traitements suivants : anti-CD28 (4mg/kg) de J-1 avant la transplantation à J2 et de la CsA (10mg/kg) de J0 à J3 (n=3) ; CsA (10mg/kg) de J0 à J3 (n=3) ; anti-CD28 (4mg/kg) de J-1 avant la transplantation à J2.

Etant donné que les rats greffés et traités uniquement à la CsA 10mg/kg acceptaient à long terme leur greffon nous avons décidé de diminuer la dose de CsA à 3mg/kg. Associé à un traitement à l'anti-CD28 (4mg/kg ; J-1/J2), la CsA 3mg/kg (J0/J3) induit 60% de survie. Là encore un traitement unique à la CsA induit le même pourcentage de survie des greffons rénaux (Cf Figure 14). La synergie décrit par Dong V.M et coll n'était donc pas retrouvé dans ce modèle de transplantation rénale.

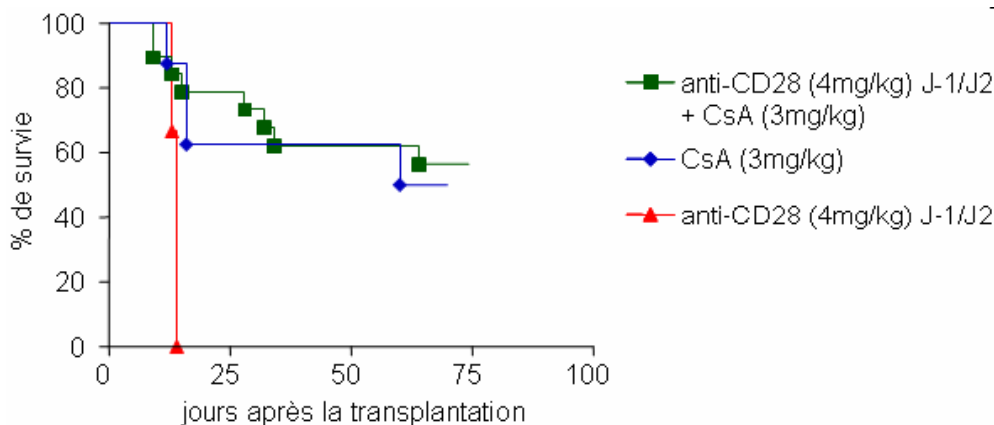


Figure 14: Survie des greffon rénaux.

Les receveurs LEW.1A de greffon rénal LEW.1W ont reçu les traitements suivant : anti-CD28 (4mg/kg) de J-1 avant la transplantation à J2 et de la CsA (3mg/kg) de J0 à J3 (n=19) ; CsA (3mg/kg) de J0 à J3 (n=4) ; anti-CD28 (4mg/kg, de J-1) avant la transplantation à J2 (n=3).

Pour analyser les mécanismes responsables de cette longue survie chez les animaux sous anti-CD28+CsA, nous avons étudié les propriétés prolifératives des différents compartiments cellulaires. Ainsi, les cellules mononuclées du sang périphérique des animaux tolérants ne prolifèrent pas suite à une stimulation par les cellules du donneur (LEW.1W) alors que ces cellules sont capables de répondre à une stimulation par d'autres cellules (BN). Les splénocytes des animaux tolérants sont également inhibés par rapport aux splénocytes naïfs. Des mécanismes régulateurs se sont donc développés au sein du sang et de la rate de ces animaux tolérants. Ces mécanismes régulateurs ne font pas intervenir le compartiment cellulaire T car les lymphocytes T isolés à partir du sang ou de la rate des animaux tolérants prolifèrent suite à une stimulation par les cellules du donneur (Cf Figure 15).

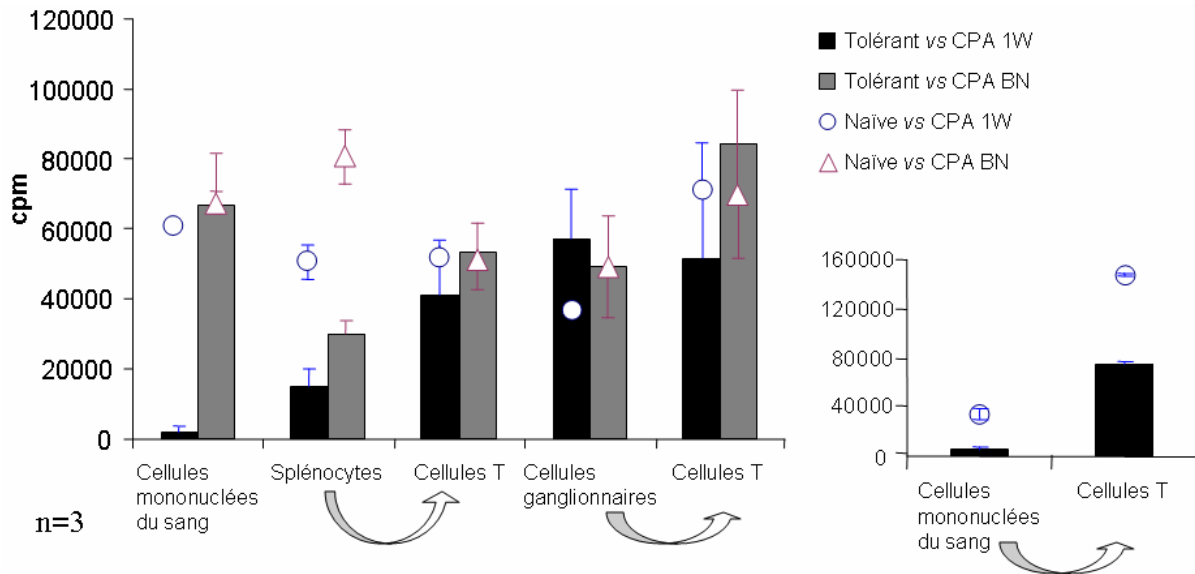


Figure 15 : Analyse des capacités prolifératives de différents compartiments cellulaires des rats tolérants (anti-CD28+CsA 3mg/kg).

Nous avons voulu savoir si ces cellules pouvaient inhiber une MLR constituée de cellules mononuclées du sang périphérique LEW.1A stimulées par des CPA LEW.1W. A cette MLR nous avons ajouté des cellules mononuclées du sang périphérique d'animaux tolérants ou d'animaux naïfs (Cf Figure 16).

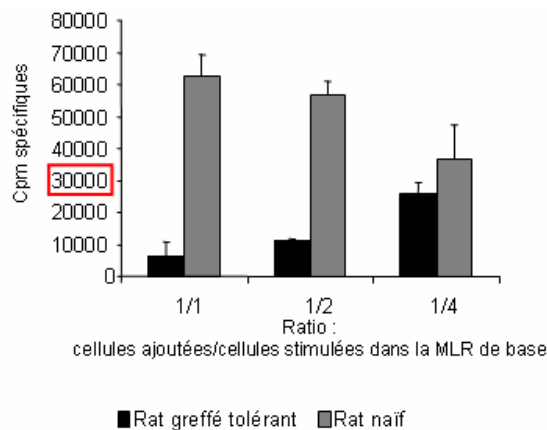


Figure 16 : Inhibition d'une MLR (dont le niveau de prolifération est encadré) par les cellules mononuclées du sang périphérique issues d'animaux tolérants.

Cette inhibition dépend de la quantité de cellules ajoutées à la MLR. (n=3).

Les cellules mononuclées du sang des animaux tolérants sont capable d'inhiber une MLR et ce avec une efficacité dépendante de la quantité de cellules ajoutées, alors que le même type de cellules provenant d'un animal naïf n'a pas cet effet.

Les cellules sanguines des animaux traités uniquement avec de la CsA (3mg/kg) ont également été analysées (Cf Figure 17). Ainsi, les cellules sanguines issues de ces animaux prolifèrent moins que les cellules issues d'animaux naïfs suite à une stimulation par les cellules du donneur. De plus, ces cellules sont capables d'inhiber une MLR.

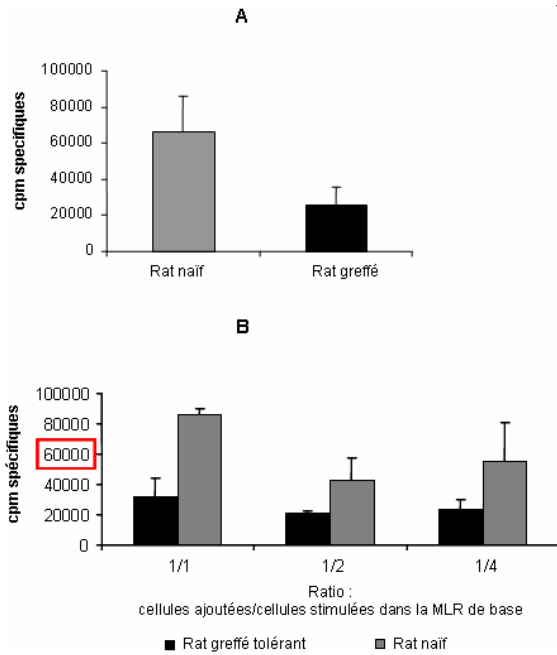


Figure 17 : Comportement des cellules sanguines des rats traités avec de la CsA.

*A, les cellules mononuclées du sang périphérique prolifèrent suite à une stimulation par les cellules du donneur mais moins que des cellules naïves (n=3).*

*B, Les cellules des rats greffés et traités à la CsA inhibent une MLR de base (dont le niveau de prolifération est encadré).*

Dans ce modèle donc, l'activité régulatrice observée est attribuable au traitement par la CsA et l'addition de 3 jours de traitement par un anticorps anti-CD28 ne semble pas modifier les paramètres mesurés. Pour aller plus loin dans l'analyse de ces deux traitements, qui induisent tous les deux la survie des rats transplantés, nous avons analysé par cytométrie en flux les alloanticorps présents dans le sérum de ces animaux greffés (Cf Figure 18).

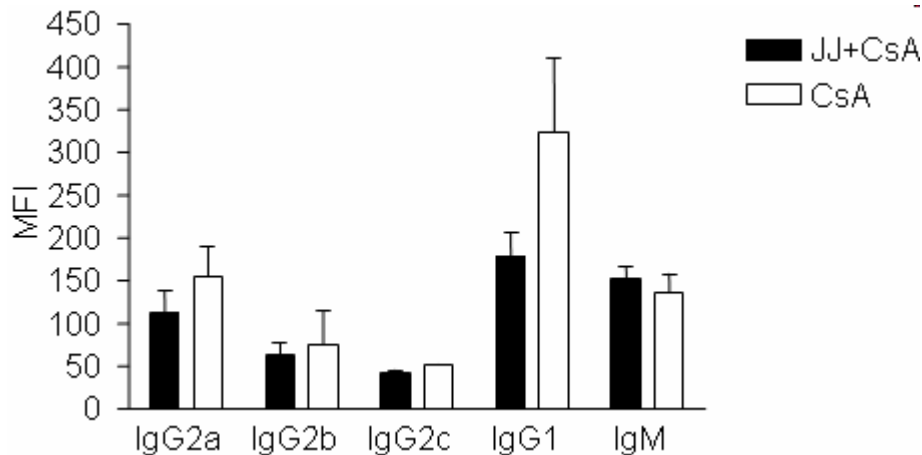


Figure 18 : Le traitement : anti-CD28+CsA (n=5) ou CsA seul (n=2) n'influence pas la production d'alloanticorps chez les rats greffés.

*Cependant, nous constatons que les isotypes IgG2a et IgG1 sont plus représentés que l'isotype IgG2b, ce qui, chez le rat, est signe d'une orientation de la différenciation lymphocytaire T vers un phénotype Th2.*

Quel que soit le traitement, anti-CD28+CsA ou CsA seule, les alloanticorps présents dans le sérum des animaux greffés ont un profil identique.

De plus, une analyse anatomopathologique des greffons rénaux, réalisée en aveugle par rapport aux traitements, révèle que les rats traités avec de l'anti-CD28 (4mg/kg ; J-1 à J2) + CsA (3mg/kg ; J0 à J2) ne présentent aucun signe de rejet chronique plus de 100 jours après la transplantation (n=3). Parmi les rats traités à la CsA seule, un rat sur trois montre des signes de rejet chronique dus à la présence d'une atteinte très focale d'une artère. Ces éléments ne sont cependant pas suffisants pour affirmer que le traitement anti-CD28+CsA diffère du traitement CsA seule.

En augmentant la durée du traitement par les anticorps anti-CD28 (4mg/kg ; J0 à J7), nous nous sommes aperçu qu'il était possible d'obtenir la survie à long terme des greffons allogéniques, en l'absence de co-traitement à la CsA. Le groupe contrôle, traité avec une IgG1 de souris irrelevante chez le rat (3G8 anti-CD16 humain), ne présente pas de prolongation de survie. Ceci nous a permis d'attribuer la survie à l'activité anti-CD28 de l'anticorps et de démarrer l'étude des mécanismes régulateurs associés.

5.2. *Résultats*



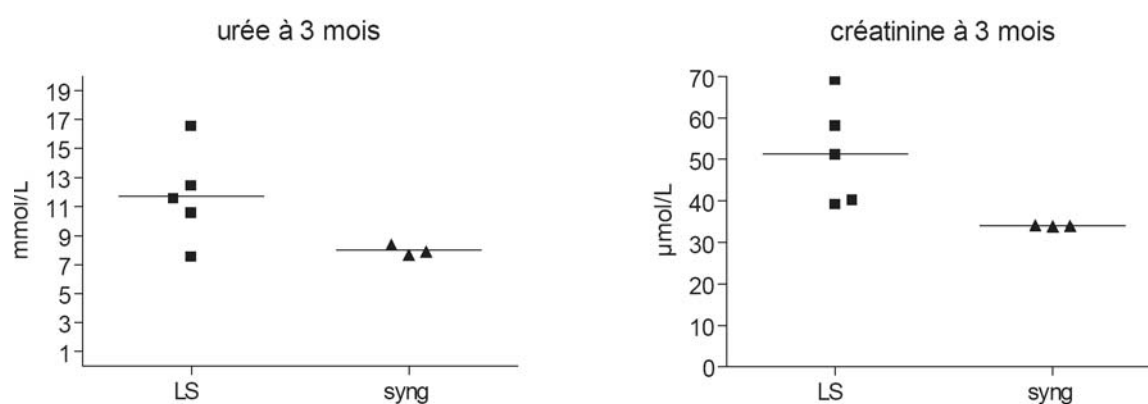
5.3. *Annexe au matériel et méthode*

Antibodies	Isotype	Specificities	Products
JJ319	IgG1	CD28	Hunig T (Wurzburg, Germany)
OX6	IgG1	RT1B (Class II)	ECCC (Salisbury, UK)
OX33	IgG1	CD45RA	ECCC (Salisbury, UK)
OX76	IgG2a	RT1Bac (Class II LEW.1W)	ECCC (Salisbury, UK)
ED-1	IgG1	Macrophages and monocytes	ECCC (Salisbury, UK)
R7-3	IgG1	TCR $\alpha\beta$	ECCC (Salisbury, UK)
3.2.3 or NKRP1	IgG1	CD161 (NKRP-1A)	ECCC (Salisbury, UK)
OX8	IgG1	CD8 $\alpha$	ECCC (Salisbury, UK)
OX42	IgG2a	CD11b/c	ECCC (Salisbury, UK)
3G8	IgG1	Human CD16	ECCC (Salisbury, UK)
OX52	IgG2a	CD6	BD Bioscience (Le Pont de Claix, France)
MARG2a-7	IgG1 $\kappa$	Rat IgG2a	Technopharm (Paris, France)
MARG2b-3	IgG1 $\kappa$	Rat IgG2b	Technopharm (Paris, France)
MARG2c-5	IgG2a $\kappa$	Rat IgG2c	Technopharm (Paris, France)
MARG1-2	IgG1 $\kappa$	Rat IgG1	Technopharm (Paris, France)
MARM-4	IgG1 $\kappa$	Rat IgM	Technopharm (Paris, France)
His24	IgG2b	CD45R	BD Bioscience (Le Pont de Claix, France)
OX81	IgG1	Anti IL-4	ECACC, Wiltshire, UK

3H5	IgG1	CD80 (B7-1)	BD pharmingen (Le Pont de Claix, France)
24F	IgG1	CD86 (B7-2)	BD pharmingen (Le Pont de Claix, France)

#### 5.4. Annexe aux résultats

Le graphique ci-dessous représente les taux d'urée et de créatinine dans le sang de 5 LS et 3 syngéniques.



Les animaux LS ont des valeurs plus dispersées que les animaux syngéniques. Cependant, il faudrait peut-être réaliser les contrôles syngéniques reins LEW1W chez un receveur LEW.1W étant donné que ces paramètres varient suivant les souches de rats.

### 5.5. *Discussion et perspectives :*

Dans cet article, nous avons démontré qu'un traitement d'induction ciblant spécifiquement le CD28 entraîne la survie de 60% des greffons rénaux allogéniques. Cette survie est comparable à la survie des greffons rénaux syngéniques (Figure 1). La greffe de rein étant vitale pour le rat, des problèmes techniques tels qu'une mauvaise ligature entre l'uretère et la vessie peuvent expliquer cette perte de 40%.

L'analyse des différents compartiments lymphocytaires des animaux tolérants révèle une absence de prolifération des cellules sanguines et spléniques envers les CPA du donneur. Cette inhibition de prolifération met en jeu des mécanismes régulateurs présents dans le compartiment non-T (Figure 4). Dans cette étude, seuls les mécanismes impliqués dans le sang ont été analysés en détail. Afin de caractériser la population à l'origine de la suppression observée, nous avons déplété certaines populations cellulaires avant la MLR. Le pouvoir régulateur que nous observons ne semble pas résider pas dans une lignée cellulaire particulière mais est plutôt associée à un phénotype, en l'occurrence l'expression de la molécule B7. En effet, seule la déplétion des cellules B7<sup>+</sup> restaure la prolifération des PBMC de rats tolérants en MLR (Figure 5A). Aussi, les cellules régulatrices B7<sup>+</sup> de nos rats tolérants semblent avoir acquis des propriétés particulières car la déplétion des cellules B7<sup>+</sup> de rats naïfs en MLR n'augmente pas la prolifération de cette MLR. Nous ne pouvons cependant exclure que les populations testées ; les cellules dendritiques, les cellules CD8<sup>+</sup>, les cellules B ou les cellules portant des molécules du CMH de classe II, n'ont individuellement pas de rôle régulateur dans notre modèle. En effet, ces cellules expriment les molécules B7 en surface et la déplétion d'une seule de ces populations n'est peut-être pas suffisante pour lever l'inhibition car d'autres cellules exprimant B7 sont encore présentes dans la culture. Il faut désormais analyser si le pouvoir régulateur des cellules B7<sup>+</sup> est porté par les cellules B7-1<sup>+</sup>, les cellules B7-2<sup>+</sup> ou bien par les cellules double positives. Ces nouvelles déplétions sont actuellement en cours de réalisation. Le phénotype des cellules B7-1<sup>+</sup> ou des cellules B7-2<sup>+</sup> dans le sang des animaux tolérants diffère de celui d'animaux naïfs (Figure 8A et 8B). Les déplétions spécifiques des populations B7-1<sup>+</sup> et B7-2<sup>+</sup> vont affiner notre compréhension sur les mécanismes régulateurs mis en place chez les rats tolérants et vont peut-être nous éclairer sur les résultats hétérogènes obtenus uniquement lors de la déplétion des cellules NK (Figure 5B). Les déplétions NK<sup>+</sup>B7-1<sup>+</sup> et NK<sup>+</sup>B7-2<sup>+</sup> pourront alors être réalisées. Le système de régulation mis en place dans le sang des animaux tolérants semble fonctionner tel une

balance, les cellules NK étant peut-être le type cellulaire portant la majorité de l'effet inhibiteur observé. Cette supposition est attractive car les cellules NK possèdent également du CD28 en surface qui semble être important pour leur activité cytotoxique (Tarazona, Borrego et al. 2002), (Azuma, Cayabyab et al. 1992). Aucune étude n'a jusqu'à ce jour évalué l'effet du JJ319 sur les cellules NK.

Nous avons vu que l'enzyme IDO jouait un rôle partiel dans les mécanismes régulateurs présents au sein des PBMC des rats tolérants (Figure 6A). Il serait intéressant d'identifier la population responsable de sa synthèse. Pour ce faire nous utiliserons un anticorps anti-IDO de rat développé par Hill M et coll et utilisable en immunocytochimie. Nous suggérons qu'il existe un lien entre le pouvoir régulateur des cellules B7<sup>+</sup> et la synthèse d'IDO. Un double marquage IDO/B7 des PBMC des rats tolérants nous permettra de vérifier cette hypothèse. Après avoir identifié la population responsable de la synthèse d'IDO, nous pourrions l'isoler pour comparer le taux d'expression de l'enzyme IDO avec celui de cellules issues d'animaux naïfs. Enfin, le dosage des produits de dégradation du tryptophane par l'enzyme IDO nous permettra de savoir si IDO est fonctionnelle au sein des cellules des rats tolérants.

L'inhibition d'IDO *in vitro* par l'ajout de 1-MT pendant la culture ne restaure pas totalement la prolifération des cellules des rats tolérants (Figure 6A). Par contre, la déplétion des cellules B7<sup>+</sup>CD6<sup>-</sup> restaure totalement la prolifération de ces cellules. Il semblerait donc qu'un autre mécanisme régulateur dépendant des molécules B7 se mette en place indépendamment d'IDO. Il ne fait pas intervenir des facteurs solubles tels que l'IL-10 ou l'IL-4 (Figure 6A). Nous supposons que le mécanisme régulateur mis en place dans ces animaux tolérants ne dépend pas uniquement des cellules B7<sup>+</sup>. Il semblerait que les lymphocytes T réactifs contre les cellules du donneur possèdent également des propriétés particulières. Ces lymphocytes T ont été éduqués *in vivo* par les cellules du greffon. L'interaction CTLA-4/B7 entre les lymphocytes T éduqués et les cellules régulatrices est peut-être à l'origine des mécanismes observés permettant, d'une part l'activation d'IDO, et d'autre part l'inhibition du lymphocyte T. *In vitro*, les mécanismes régulateurs observés ne sont effectifs qu'en présence d'une stimulation par les cellules du donneur (Figure 4). Cette spécificité envers les cellules du donneur suggère que le mécanisme régulateur soit porté par des cellules exprimant les molécules du CMH de classe II<sup>+</sup>. Cependant la déplétion des cellules exprimant les molécules CMH de classe II<sup>+</sup> a prouvé le contraire. Il sera intéressant de regarder si la population B7<sup>+</sup>

ajoutée à une MLR inhibe la prolifération des LT. Les expériences de cultures que nous souhaitons réaliser sont résumées dans le Tableau 9.

Type de MLR	Cellules ajoutées	Résultats escomptés
Lymphocyte T Tol + CPA du donneur	Pas d'ajout	Prolifération
Lymphocyte T naïf + CPA du donneur	Pas d'ajout	Prolifération
Lymphocyte T Tol + CPA du donneur	Cellules B7+ Tol	Inhibition de la MLR
Lymphocyte T Tol + CPA du donneur	Cellules B7+ Naïve	Prolifération
Lymphocyte T naïf + CPA du donneur	Cellules B7+ Tol	Prolifération
Lymphocyte T naïf + CPA du donneur	Cellules B7+ Naïve	Prolifération
Lymphocyte T Tol + CPA tierce partie	Cellules B7+ Tol	Prolifération
Lymphocyte T Tol + CPA tierce partie	Cellules B7+ Naïve	Prolifération
Lymphocyte T naïf + CPA tierce partie	Cellules B7+ Tol	Prolifération
Lymphocyte T naïf + CPA tierce partie	Cellules B7+ Naïve	Prolifération

Tableau 9: Analyse du pouvoir régulateur des cellules B7 positives des PBMC issus de rat tolérants.

Tol : issue d'un rat tolérant, CPA du donneur : CPA LEW.1W.

A l'issue de ces expériences, nous pourrions vérifier notre hypothèse sur la particularité des lymphocytes T, spécifiques des cellules du donneur et issus de rats tolérants. En effet, si l'inhibition de la MLR n'est observée qu'en présence des lymphocytes T et des cellules B7<sup>+</sup> de rat tolérants et si aucune inhibition n'est observée suite à l'ajout de ces cellules B7<sup>+</sup> à une MLR naïve, alors nous pourrions en conclure que seule la présence concomitante des cellules B7<sup>+</sup> et des lymphocytes T particuliers de l'animal tolérant permettent la mise en place de mécanismes régulateurs.

*In vitro*, les lymphocytes T issus des animaux tolérants sont sensibles à l'apoptose seuls ou suite à une stimulation par les cellules du donneur (Figure 7). Il serait intéressant d'analyser la susceptibilité des lymphocytes T de ces mêmes animaux à rentrer en apoptose suite à une stimulation par des cellules tierce partie. Si, dans ces conditions de stimulation, les lymphocytes T ne rentrent pas plus en apoptose que des lymphocytes T naïfs, l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T alloréactifs d'animaux tolérant diffèrent de lymphocytes T naïfs se trouvera renforcée. On pourra ainsi supposer que seuls les lymphocytes alloréactifs des animaux tolérants sont susceptibles à l'entrée en apoptose soit par une surexpression de CTLA-4 en surface soit par un conditionnement effectué *in vivo*.

Nous avons récemment analysé l'expression de CTLA-4 à la surface des lymphocytes T de rats tolérants ou naïfs. Aucun marquage n'a été détecté. Nous allons donc comparer les taux de CTLA-4 intracellulaire entre des rats tolérants et des rats naïfs. Nous couplerons ensuite l'analyse de l'expression du CTLA-4 en surface, après stimulation par des

cellules du donneur, à l'analyse de l'entrée en apoptose de ces mêmes cellules dans les mêmes conditions de culture. Il serait également intéressant d'élargir la caractérisation phénotypique des lymphocytes T des animaux tolérants après stimulation en MLR.

Pour voir si une seconde greffe issue du même donneur que le rein greffé est acceptée ou non, nous allons caractériser l'état de tolérance de ces animaux en réalisant des greffes de peau. Afin de vérifier si la tolérance observée est transférable, nous injecterons des PBMC issus d'animaux tolérants à des rats nouvellement greffés. Plus de 100 jours après l'arrêt du traitement à l'anti-CD28, le rat tolère son greffon rénal et ne présente aucun signe d'immunosuppression. De manière surprenante, des alloanticorps sont détectables dans le sérum de ces rats (Figure 2A et 2B). Ces animaux répondent également à une immunisation par des globules rouges de mouton en sécrétant des anticorps spécifiques ; ils sont donc immunocompétents (Figure 9). Nous avons démontré que le traitement à l'anti-CD28 lors d'une immunisation par un antigène soluble n'entraînait aucune immunosuppression de l'animal (Haspot, Villemain et al. 2002). Cette observation est également valide 100 jours après l'arrêt du traitement.

Les analyses effectuées sur le sang des rats tolérants vont également être réalisées dans la rate et au sein des cellules infiltrant le greffon (GIC). Des transferts de cellules spléniques sont également programmés. Les GIC ont été analysées par immunohistochimie (Tableau I du papier). Nous projetons d'analyser leurs propriétés prolifératives *in vitro* afin de comprendre si ce sont des éléments protecteurs du greffon ou non.

A plus long terme, nous aimerions utiliser ce modèle d'induction de tolérance pour analyser les gènes exprimés de façon différente entre les rats tolérants, les rats rejetants et les rats greffés avec un rein syngénique. Pour ce projet, plusieurs technologies s'offrent à nous : le differential display, les analyses soustractives et les puces à ADN. Nous espérons que ces analyses nous permettront de découvrir une signature de l'état de tolérance sur ou sous-expression d'un ou plusieurs gènes. Cette analyse pourra être effectuée sur l'organe greffé, le sang ou la rate des animaux. Nous allons commencer l'étude par l'analyse du gène TOR1D retrouvé récemment dans plusieurs protocoles d'induction de tolérance dans les souches de rats que nous utilisons (Louvet C et coll soumis).

D'autres expérimentations ont été réalisées en bloquant le CD28 lors d'une transplantation cardiaque. Sans traitement, le greffon est rejeté en 5 à 6 jours. Le traitement avec de l'anti-CD28 de J0 à J7 prolonge la survie du greffon jusqu'à 21 jours. A la différence du cœur, dans la greffe de rein, ce traitement entraîne la survie à long terme des greffons

rénaux. Cette différence peut être due à une variation du nombre de cellules dendritiques contenues dans ces deux organes. L'association d'un traitement à l'anti-CD28 4mg/kg (J -1 à J2) avec de la cyclosporine A (CsA) 10mg/kg (J0 à J3) prolonge la survie de 45% des greffons au delà de 100 jours alors qu'un traitement avec seulement de la CsA (J0 à J3) n'induit que 15 jours de survie. La survie à long terme s'accompagne également du développement de mécanismes régulateurs dans le sang de ces animaux. En effet, les PBMC issues des rats acceptant leur greffon cardiaque ne prolifèrent pas suite à une stimulation par les CPA du donneur. Les lymphocytes T purifiés à partir des PBMC de ces rats sont capables de proliférer. Le pouvoir régulateur est situé dans le compartiment cellulaire non-T. Ce mécanisme régulateur diffère cependant de celui observé lors d'une greffe rénale traitée uniquement à l'anti-CD28. En effet, dans notre modèle de greffe cardiaque, les PBMC des animaux (traités à l'anti-CD28 + CsA) sont capables d'inhiber une MLR entre des PBMC naïf et des CPA du donneur. Les mécanismes régulateurs sont en train d'être analysés.

# Conclusion



## Conclusion

Nous avons vu dans l'introduction que les lymphocytes T sont les effecteurs majoritaires du rejet de greffe car des souris dépourvues de lymphocytes T tolèrent leur greffon (Bolton, Gracie et al. 1989). La pleine activation du lymphocyte T nécessite un signal antigénique d'une part et des signaux de costimulation d'autre part. Le CD28 est l'une des molécules de costimulation majoritaire du lymphocyte T. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le blocage spécifique du CD28, sans empêcher l'interaction CTLA-4/B7, serait immunosuppresseur et inducteur de tolérance.

L'étude du blocage du CD28 a été réalisée *in vitro* sur des cellules humaines et des cellules de rats. Ce blocage inhibe la prolifération des cellules en MLR, que les cellules soient ou non préactivées avant le blocage du CD28. Nous avons également découvert un différentiel entre le blocage spécifique du CD28 par des anticorps anti-CD28 et le blocage des molécules B7 par du CTLA4Ig. Nous savons désormais que cette différence peut-être attribuée à l'activation d'IDO par le CTLA4Ig. Si cette nouvelle découverte concernant IDO peut nous aider à réinterpréter nos résultats il est cependant important de souligner que le message essentiel de l'article n°1 ne s'en trouve pas modifié pour autant : le CD28 est essentiel à l'activation du lymphocyte T par la voie de reconnaissance directe alors qu'il ne semble pas indispensable à l'activation indirecte des lymphocytes T (Haspot, Villemain et al. 2002). A l'issue de ces travaux, il serait donc intéressant d'approfondir le rôle inhibiteur d'IDO sur la sécrétion d'immunoglobuline. Ce rôle différentiel du CD28 lors de l'activation du lymphocyte T rejoint également certains points abordés dans l'introduction. Ainsi, on peut supposer que le CD28 abaisse le seuil d'activation du TCR lors d'une activation de type directe, situation dans laquelle la reconnaissance entre un TCR, sélectionné pour reconnaître le soi, et un CMH allogénique ne semble pas optimal d'un point de vue conformationnel. Lors d'une reconnaissance de type indirecte entre un TCR et un CMH du soi présentant un peptide du non soi, la reconnaissance structurelle est telle que le seuil d'activation du TCR semble être atteint indépendamment de l'engagement du CD28. Cette interprétation est confortée par les données montrant, au niveau du thymus, que le CD28 joue un rôle dans la sélection positive de clones d'affinité modérée (Buhlmann, Elkin et al. 2003).

Nous avons décidé de bloquer spécifiquement la molécule CD28 par des anticorps modulant lors d'une transplantation rénale. Nous avons tout d'abord mis au point le traitement

adéquat pour obtenir une survie à long terme des greffons. Après 8 jours de traitement avec de l'anti-CD28, les greffons survivent à long terme sans développer de rejet chronique malgré la présence d'anticorps anti-donneur. Les mécanismes permettant d'expliquer le maintien de cette tolérance ont été étudiés dans le sang de ces animaux cent jours après la greffe. Les PBMC des rats tolérants ne prolifèrent pas suite à une stimulation par les cellules du donneur. Les cellules non-T B7<sup>+</sup> portent un pouvoir régulateur qui est en partie dépendant d'IDO (*Haspot F et coll soumis*). Nous émettons l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T alloréactifs des rats tolérants peuvent également induire ce pouvoir régulateur par leur molécule CTLA-4 en présence des cellules non-T B7<sup>+</sup> régulatrices. De nombreux points doivent encore être étudiés pour affiner notre compréhension sur ces mécanismes régulateurs et pour essayer de découvrir une signature moléculaire de la tolérance. La présence d'alloanticorps dirigé contre les molécules du CMH de classe II du donneur ne s'accompagne pas du développement d'un rejet chronique ; on pourrait donc supposer que ces anticorps soient à l'origine de la tolérance *in vivo* et de l'inhibition de la prolifération *in vitro*. Cependant, *in vitro*, des expériences de coculture ont été réalisées ; les PBMC de rats tolérants ne sont pas capables d'inhiber une MLR de base (PBMC naïfs vs CPA du donneur), l'inhibition de prolifération des PBMC de rats tolérants n'est donc pas due à la synthèse d'alloanticorps anti-donneur.

Contrairement au CTLA4Ig qui inhibe l'ensemble des réponses immunitaires, bloquer spécifiquement la molécule CD28 possède l'avantage de ne pas empêcher les réponses à un pathogène ou à un virus. Une molécule inhibitrice de la molécule CD28 humaine a été développée. Elle possède la particularité de se fixer sur le CD28 humain sans entraîner sa dimérisation. Cette molécule bloque l'activation des lymphocytes T *in vitro* (Vanhove, Laflamme et al. 2003). Cette molécule pourra donc être testée dans le cadre d'essais cliniques en transplantation et dans des maladies autoimmunes.

# Annexes

*Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody.*

Vanhove B, Laflamme G, Coulon F, Mougin M, Vusio P, Haspot F, Tiollier J, Soulillou JP.

Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, INSERM U437, CHU Hotel Dieu, 30 Bld Jean Monnet, 44093 Nantes, France. bvanhove@nantes.inserm.fr

Article publié dans Blood.

*CD25<sup>+</sup> regulatory cells differentiate in recipients of long term allograft following donor specific transfusion (DST) and are able to transfer long term survival of MHC incompatible graft in naïve host.*

Nicolas Degauque, David Lair, Cécile Braudeau, Fabienne Haspot, Fabien Sebille, Alexandre Dupont, Emmanuel Mérieau, Sophie Brouard and Jean-Paul Soulillou

Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) - Unité 643: “Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France.

Article en preparation.

CD25<sup>-</sup> regulatory cells differentiate in recipients of long term allograft following donor specific transfusion (DST) and are able to transfer long term survival of MHC incompatible graft in naïve host.

**Running title: CD25<sup>-</sup> regulatory T cells in allograft tolerance**

Nicolas Degauque<sup>\*</sup>, David Lair<sup>\*</sup>, Cécile Braudeau<sup>\*</sup>, Fabienne Haspot<sup>\*</sup>, Fabien Sebille<sup>\*</sup>, Alexandre Dupont<sup>\*</sup>, Emmanuel Mérieau<sup>\*</sup>, Sophie Brouard<sup>\*+</sup> and Jean-Paul Soulillou<sup>\*+</sup>

<sup>\*</sup>Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) - Unité 643: “Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France.

Keywords : rodent, T cells, Tolerance/Suppression/Anergy, Transplantation, Spleen and Lymph Nodes

Correspondance address:

Pr. Jean-Paul Soulillou

I.N.S.E.R.M. UMR643, CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet

44093 Nantes Cedex 01, FRANCE.

Tel: + 33.240.08.74.10

Fax: + 33.240.08.74.11

Email: [jps@nantes.inserm.fr](mailto:jps@nantes.inserm.fr)

+ Both senior authors similarly contributed and are listed by alphabetical order

## Abstract

Indefinite donor-specific heart allograft acceptance can be induced in the MHC-mismatched LEW.1W to LEW.1A congenic rat strain combination by two pre-graft donor-specific transfusions. Whereas the induction phase of tolerance has been studied in detail, its maintenance and how cells from tolerant animals can transfer tolerance to naïve recipients remained poorly understood. In this paper, we analyzed the role of CD25<sup>-</sup> T cells of 100 days tolerant rats for their proliferative properties, their transcriptional pattern, their capacity to suppress alloreactive T cells *in vitro* and for their ability to transfer tolerance. CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant rats displayed a decreased donor-specific response in mixed lymphocyte reaction and specifically suppress the proliferative response of naïve LEW.1A CD25<sup>-</sup> T cells against donor APC. These CD25<sup>-</sup> T cells accumulate IFN-gamma, IL-10 and FoxP3 transcripts. However, *in vitro*, the suppressive activity of CD25<sup>-</sup> T cells required direct-cell contact and was modified neither by blocking antibodies against IL-4, IL-10, or TGF-beta nor by inhibition of IDO or iNOS. Finally, administration of CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant rats to sub-irradiated recipients can transfer long term graft survival. Taken together, our data show that the spleen of tolerant rats harbour newly differentiated regulatory CD25<sup>-</sup> T cells which likely contribute to the maintenance of tolerance at distance from the transplantation. Our data show that regulatory T cells are not restricted to the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cell subset and give new insights on the mechanisms of tolerance following donor cell priming.

## Introduction

Induction of specific tolerance for donor antigens (see (1) for review) is one of the most actively explored fields in transplantation immunology. In adult rats, long term survival of MHC incompatible vascularized allografts (heart or kidney) can be obtained by priming the recipients with donor blood cells (Donor Specific Transfusion, DST) 14 and 7 days before transplantation (2, 3). We and others have shown that inhibition of early allograft rejection by DST mostly affects helper T cells functions (4-6) and requires intact resident dendritic cells at the time of transplantation (7). Early production of TGF beta (7) and differentiation of CD8<sup>+</sup> clonal regulatory cells (8-10) are also involved in this induction phase of tolerance and maintenance phase of tolerance. Long term graft acceptance resulting from DST is a complex state where symptoms of chronic graft rejection coexist (11) with mechanisms controlling host acute anti-donor immune response. Long term recipients accept a donor derived skin graft whereas a third party graft is rejected (11). Moreover, the spleen (12) of long term tolerant recipients, and possibly the graft itself (13), harbor regulatory T cells able to inhibit the capacity of a naive recipient to acutely reject an allogeneic heart from the same donor. Therefore, the immunological status of long term allograft acceptance following DST pre-conditioning provides another example of the differentiation of regulatory cells described in the mice (14-17) or in rats (12, 18) following different “tolerance” induction maneuvers. Various types of cell subsets, including CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> splenocytes (12, 19) harvested from long term graft recipients, have been described to transfer tolerance to naïve syngeneic hosts when injected at the time of transplantation. However, the exact nature of the cells, the possible cells interaction involved in the maintenance of long term tolerance and in its transfer, and their mechanisms of action remain a matter of debate. Particularly, whereas T cells from DST-primed tolerant recipient have been shown to transfer tolerance to a secondary



host, the capacity of CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>-</sup> T cells has not been explored in this model.

In this paper, we focused on the role of CD25<sup>-</sup> T cells and their potential role in tolerance maintenance and transfer. We first analyzed *in vitro* regulatory patterns of T cells harvested from spleen of LEW. 1A recipients tolerant for a LEW.1W MHC incompatible heart graft. We show that CD25<sup>+</sup> T cells from naïve LEW. 1A rat inhibit proliferation of CD25<sup>-</sup> alloreactive T cells. However, the magnitude of CD25<sup>+</sup> T cells inhibition was not modified in time in the spleen of long term LEW.1A tolerant recipients. In contrast, we show that in long term tolerant recipients, normally strongly alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells have now acquired hypo-responsiveness and the capacity to inhibit proliferation of naïve alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells against donor APCs in culture. This inhibition was cell contact dependant. Finally, we show that CD25<sup>-</sup> T cells from long term rats recipients can transfer graft acceptance to a naïve LEW. 1A host. Taken together our data suggest that CD25<sup>-</sup> T cells are involved in the maintenance of tolerance when a large pool of regulatory T cells may be required to control alloreactive T cells and to transfer tolerance and challenge some of the concepts on regulatory cells involved in the long term maintenance of tolerance to an allograft.

## **Material & Method**

### **Animal Model, Induction of Tolerance and *in vivo* transfer experiments.**

Naive adult MHC mismatched congenic LEW.1A (RT1<sup>a</sup>), LEW.1W (RT1<sup>u</sup>) and BN (RT1<sup>n</sup>) rats were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). LEW.1W heart grafts were implanted heterotypically onto LEW.1A recipient abdominal aorta and vena cava by using standard microsurgical techniques (Ono, Thorac.Cardiovasc.Surg, 1968). Graft was monitored by daily abdominal palpation and rejection was defined as complete cessation of heartbeat.

Long term survival of heart graft was obtained by two donor specific transfusion (DST) of 1 mL of heparinized LEW.1W blood to LEW.1A recipients on preTx days -14 and -7 (2).

Adoptive cell transfers were performed the day of the transplantation on a LEW.1A secondary naive recipient sub irradiated (4.5 Gy) 3 days before transplantation.

### **Reagents**

All cells were grown in RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) supplemented with 10% heat-inactivated autologous serum (LEW.1A rat), 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin, 2mM L-glutamine (Sigma), 0.1 mM nonessential amino acids (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Sigma ) and 50 M -ME (Sigma). Antibodies, anti CD25 (Ox39) or anti CD4 (W3.25) or anti CD8 (Ox8), were obtained from the European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, U.K). MARG 2a-7 (IgG2a), 2b-3(IgG2b), 2c-5(IgG2c) and 1-2 (IgG1) antibodies were purchased from TECHNOPHARM (Villejuif, France) and fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) immunoglobulin (Ig) M was purchased from Jackson Immunology Research (Villepinte, France).

### **Purification of T cells and subsets, and mixed lymphocyte reaction (MLR)**

Purified T cells were obtained from spleen of naive LEW.1A rats or from tolerant DST-treated LEW.1A rats either with rat CD3<sup>+</sup> T cell small enrichment columns (R&D Systems, UK) or after warm nylon wool adherence and depletion of OX6 (MHC II) 3.2.3 (CD161) positive cells using mAb and magnetic beads (Dynal, Compiegne, France). T cell purity, systematically assessed using flow-cytometry, was > 95% of TCR<sup>+</sup>, with no detectable MHC class II<sup>+</sup> cells. Cells were labelled with biotinylated Ox39, Ox35 PE and R7.3 FITC at 20.10<sup>6</sup>/mL and CD25<sup>+</sup> T cells were sorted with FACSARIA. Positive selection of CD25<sup>+</sup> T cells was performed on MiniMacs type positive selection columns (Miltenyi Biotec, Paris, France) using biotinylated Ox39 mAb. T cell subsets purity assessed using flow cytometry was >90% of positively selected fraction and <3% in negatively selected ones. Negative selection of CD25<sup>-</sup> T cells was performed using Ox39 mAb followed by incubation with Dynabeads<sup>®</sup> Pan Mouse IgG according to the manufacture's recommendations (Dynal Biotech, Oslo, Norway); T cell purity was assessed using flow cytometry (>97% of CD25<sup>-</sup> in CD25<sup>-</sup> T cells fraction). Purified T cells were seeded at the final concentration of 1.10<sup>5</sup> cells/well in culture medium containing 10% heat-inactivated autologous serum (LEW.1A rat) and cultured for different time points (24 and 120 hours) with allogeneic (LEW.1W rats) enriched dendritic cell suspensions, obtained as described elsewhere (21).

### **Proliferation assays and transwell experiments.**

According to experiments, 1.10<sup>5</sup> CD25<sup>-</sup> or CD25<sup>+</sup> or whole T cells purified from LEW.1A rats were cultured in triplicate in U-bottom 96-well plates (0.2mL) with 2.10<sup>4</sup> of enriched dendritic cell suspensions from either LEW.1W or BN rats for 5 days at 37°C/7%CO<sub>2</sub>. For inhibition assessment, increase numbers of CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>-</sup> T lymphocytes purified from

naïve or tolerant LEW.1A rats were added to a MLR using naïve CD25<sup>-</sup> T cells as responder's cells. Cultures were pulsed with [<sup>3</sup>H] T for the last 12 hours of culture. The results were expressed as specific c.p.m (c.p.m MLR-(c.p.m DC alone + c.p.m added cells alone + c.p.m CD25<sup>-</sup> alone)) for inhibition assay. Transwell experiments were done in 24-well plates. 6.10<sup>5</sup> CD25<sup>-</sup> T cells of naïve LEW.1A rats were stimulated with 3.10<sup>5</sup> of enriched dendritic cell suspensions from LEW.1W rats. Additionally, 6.10<sup>5</sup> CD25<sup>-</sup> T cells of either naïve or tolerant LEW.1A plus 10<sup>5</sup> of enriched dendritic cell suspensions from LEW.1W rats were placed in Transwell chambers (Millicell, 0.4mm; Millipore) in the same well. Cultures were pulsed with [<sup>3</sup>H] T for the last 12 hours of culture.

When indicated, MLRs or cocultures were cultured in the presence of the following mouse blocking mAbs: anti-rat IL-4 (Ox81; ECACC, Wiltshire, United Kingdom), anti-TGF-beta 1 (clones 2G7) (22), anti-rat IL-10 and an irrelevant control (3G8, anti-human CD16; American Type Culture Collection, Bethesda, MD). Rabbit neutralizing anti-rat IL-10 and rabbit IgG were both kindly provided by J. Khalife (Institut Pasteur, Lille France). Anti IL-10 and anti-rat IL-4 were used at 10 µg/mL, and anti-rat TGF-beta 1 at 100 µg/mL. 5 µL of L-N Methyl Arginine (Sigma) or 1mg/mL of 1-methyltryptophane (Sigma) or 50 µmol of SNPP were added to the culture. Human recombinant IL-2 was used as indicated at 100 U/mL.

### **Quantitative PCR of cytokine transcript.**

Transcript analysis was performed using real-time quantitative PCR for HPRT, IL-2, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, IL-13, TGF-beta 1 and FoxP3. Briefly, total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen®, Courtaboeuf, France). 2 µg RNA was reverse-transcribed as previously described (23). A constant amount of cDNA was amplified in 25 µl SYBR® Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster city, CA) with 1mg/mL of BSA, 3

mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM of each dNTP, 0.6 U AmpliTaq Gold® polymerase, and 300 nM of each primer in 1X SYBR® Green PCR buffer. Amplifications were performed using an ABI Prism 7700 - Sequence Detection System Perkin Elmer machine (Applied Biosystems). HPRT was used as an endogenous control to normalize RNA amounts. Transcript levels were calculated according to the 2<sup>-ddCt</sup> method as described by the manufacturer (ABI PRISM 7700 user bulletin PE Applied Biosystems Foster City 2:11-24, 1997) and expressed in Arbitrary Unit (AU). Profiles for transcript levels were confirmed by using beta-actine gene as an endogenous control to normalize RNA amounts. Primer sequences were chosen as follows:

Gene	Primer sequences
HPRT sense	5'-TGCTGGATTACATTAAGCGC-3'
HPRT antisense	5'-CTTGGCTTTTCCACTTCGC-3'
Beta-actine sense	5'-ATCTGCTGGAAGGTGGACAGT-3'
beta-actine antisense	5'-TCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'
IL-2 sense	5'-CCTTGTCAACAGCGCACCC-3'
IL-2 antisense	5'-GCTTTGACAGATGGCTATCC-3'
IFN-gamma sense	5'-CAGCTCTGCCTCATGGCC-3'
IFN-gamma antisense	5'-GATTCTGGTGACAGCTGGTG-3'
TNF-alpha sense	5'-CCTTACGGAACCCCTATATT-3'
TNF-alpha antisense	5'-GACCCGTAGGGCGATTACAG-3'
IL-10 sense	5'-TGCTATGTTGCCTGCTCTTACTG-3'
IL-10 antisense	5'-TCAAATGCTCCTTGATTTCTGG-3'
IL-13 sense	5'-GCGGAAAAGTTGCTTGGAGTA-3'
IL-13 antisense	5'-TATGGAGCGTGGACCTGACA-3'
TGF-beta 1 sense	5'-ACGATCATGTTGGACAACCTGCT-3'
TGF-beta 1 antisense	5'-CTCAACACCTGCACAGCTCC-3'

FoxP3 sense	5'-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT-3'
FoxP3 antisense	5'-CTGCTTGGAGTGCTTGAGAA-3'

### **Analysis of TCR repertoire alterations (CDR3 Length Distribution)**

*Amplification and dye-labeling.* Aliquots of the cDNA synthesis reaction were amplified with 1 of the 21 rats V beta family-specific primers and the corresponding C beta primer. The PCR amplification conditions were as previously described (24). Amplification product was used for an elongation reaction using a dye-labeled C beta primer. Then, heat-denatured material was loaded onto a 6% acrylamide-8 M urea gel, and electrophoresed for nine hours using an Applied Biosystems 373A DNA Sequencer (Perkin-Elmer).

*CDR3 fragment size determination.* Immunoscope® software (25) provides distribution profiles of CDR3 lengths of the amplified and elongated products. Each profile is composed of 7 to 11 peaks, spaced by 3 nucleotides. To characterize globally the CDR3 length repartition, Immunoscope® profiles were translated in a probability distribution (26). A percentage of perturbation is defined by the difference between frequency of each CDR3 length in the distribution profile and the control distribution, drew up from several healthy LEW.1A rats. Normal rats T cells exhibit variations of their CDR3 length distribution that range from 1.1% to 19% (mean: 6.59% +/- 0.5 %).

### **Statistical analysis**

Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-hoc test were performed. Survival curves were analyzed with Kaplan-Meier test. *P* values less than .05 were considered as significant.

## Results

### **Proliferative response of naïve T cells, CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> T cells to allogeneic APCs.**

MLR involving direct-type allorecognition were performed in LEW.1A/LEW.1W MHC-incompatible congenic combination, using either pure T cells or subsets (CD25<sup>+</sup> or CD25<sup>-</sup>) of naïve LEW.1A rats as responders and LEW.1W-enriched APCs as stimulators. Strong proliferative responses were obtained on day 5 as shown by <sup>3</sup>H incorporation with total or CD25<sup>-</sup> responder T cells (Fig.1.a). No proliferation was observed using CD25<sup>+</sup> T cells. In addition, removal of the total CD25<sup>+</sup> T cells subset results in an early proliferation onset of CD25<sup>-</sup> responders T cells, starting on day 1.

### **Naïve CD25<sup>+</sup> T cells inhibit *in vitro* CD25<sup>-</sup> alloreactive cells proliferation.**

We investigated the capacity of unprimed CD25<sup>+</sup> T cells to inhibit the proliferation of alloreactive cells (CD25<sup>-</sup> T cells) following direct-type allostimulation of LEW.1A pure T cells by LEW.1W APCs. Naïve LEW.1A rats CD25<sup>+</sup> T cells were added in increasing numbers to a direct-type MLR. Figure 1.b shows that adding naïve CD25<sup>+</sup> T cells to the culture inhibited CD25<sup>-</sup> T cells proliferation to allogeneic APCs in a dose dependant manner. In contrast, addition of similar amount of naïve CD25<sup>-</sup> T cells to the culture system resulted in increased thymidine incorporation. Therefore, unprimed naïve rat CD25<sup>+</sup> T cells were able to inhibit *in vitro* direct-type allorecognition.

### **Allogeneic response of splenocytes and CD25<sup>-</sup> T lymphocytes from long term tolerant animals.**

We then tested the proliferative capacity of CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant recipients (day 100 following surgery). Unseparated splenocytes from either long term tolerant or naïve

LEW.1A animals almost similarly proliferated against LEW.1W APCs (Fig.2, left panel). Similar proliferative response was also observed following stimulation with third party BN APC (Fig.2, right panel). In contrast, CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals proliferated much less (60% of proliferation reduction) than CD25<sup>-</sup> T cells from naïve animals when stimulated with LEW.1W APCs (Fig.2, left panel;  $p < 0.0001$ ). Proliferation against BN APCs was not affected by CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant or naïve rat (Fig.2, right panel). Thus, CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant rat were specifically hyporesponsive to the donor antigens.

The effects of different cytokine antagonists (IL-4, IL-10, TGF-beta) or of agents blocking IDO or iNOS were then tested in this coculture system. Neither inhibition of IDO (1-methyltryptophane), iNOS (L-NMMA) (Fig.3.a) nor blocking specific antibody against IL-4, IL-10, or TGF-beta (Fig.3.b) could restore the alloreactivity of CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant rats. However, addition of IL-2 significantly restored CD25<sup>-</sup> T cells response of long term tolerant rats to donor APCs ( $p < 0.0001$ ; Fig.3.a) in a dose dependant manner (data not shown), suggesting an anergy-like state. This observation also show that highly purified CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats acquired IL2-receptor during the MLR but that allostimulated cells cannot proliferate until exogenous IL-2 is provided.

#### **Allograft-induced CD25<sup>-</sup> T cells inhibited naïve alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells proliferation.**

We then analyzed if hyporesponsive CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals were also able to inhibit naïve CD25<sup>-</sup> T cells alloreactivity. Proliferation of naïve CD25<sup>-</sup> T cells to LEW.1W APCs was tested in the presence of CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats. CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats significantly and dose dependently inhibited alloreactive response of CD25<sup>-</sup> T cells of naïve animals in the coculture system (Fig.4.a). At a



ratio 1:1 (one naïve CD25<sup>-</sup> T responder cells for one CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant recipient), the mean percentage of proliferation was 46 +/- 7% (Fig.4a; p<0.0001) when CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals were added to the coculture system. In contrast, the mean percentage of proliferation was 147 +/- 12% when CD25<sup>-</sup> T cells of naïve animals were added. No inhibition was observed when CD25<sup>-</sup> T cells from naïve or long term tolerant animals were added to a MLR using a third party (BN) APCs (Fig.4b). CD25<sup>+</sup> T cells of long term tolerant animals were also able to inhibit proliferation when added to the direct-type MLR (Fig.4c). However, the level of inhibition was not different from that observed with naïve CD25<sup>+</sup> T cells, showing that CD25<sup>-</sup> T subset only has acquired a new inhibitory phenotype in the long term tolerant recipients.

***In vitro* suppressive activity of CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals is cell-contact dependent.**

To analyze if suppressive CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals were acting through direct cell contact, CD25<sup>-</sup> T cells were first studied in transwell stimulations. The semi permeable transwell membrane prevents direct cell contact between the potentially responsive and the suppressive populations. Figure 5.a shows that the suppressive activity of CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals was abrogated by the semi permeable membrane suggesting a cell-contact dependant mechanism of the proliferation inhibition. The absence of soluble mediator was further suggested by the effect of adding to the coculture different inhibitors. Neither inhibition of IDO, iNOS (Fig.5b) nor the presence of IL-4, IL-10 or TGF-beta antagonists (Fig.5c) significantly affected the inhibition of proliferation of tolerant animals CD25<sup>-</sup> T cells. However, as for their alloreactive response against donor APCs, addition of IL-2 (p<0.05; Fig.5b) restored proliferation, suggesting a link between the anergy and their inhibition of proliferation.

**CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats accumulate IFN- $\gamma$ , IL-10 and FoxP3 transcripts.**

Cytokines transcripts of CD25<sup>-</sup> T cells from spleen of long term tolerant animals were analysed by real-time PCR and compared with those from naïve animals. IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokine transcripts were significantly increased in tolerant animals, (9-fold and 64-fold respectively,  $p < 0.05$ ; Fig.6.a). Tolerant animals exhibit similar level of IL-2, TNF-alpha, IL-13, and TGF-beta 1 transcripts as naïve animals. In addition, because FoxP3 has been shown to program CD25<sup>+</sup> T cells development and function (27-29) and may be also a marker of CD25<sup>-</sup> regulatory populations, this factor was analysed. FoxP3's transcripts significantly, but moderately (3-fold), accumulated in CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant animals vs. naïve animals ( $p < 0.001$ ; Fig.6b).

**CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats do not exhibit TCR V beta repertoire biases and transferred tolerance to naïve rats.**

Because we observed alteration of V beta usage during the induction phase of tolerance in the same strain combination (8), the CDR3 length distribution of total T cells or of purified CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> T cells was studied before transplantation and during the phase of established tolerance (days 100). Naïve LEW.1A rat spleen T cells exhibited no CDR3 length distribution alteration of V beta TCR transcripts (Fig.7). Global level of alteration of both alloreactive CD25<sup>-</sup> and regulatory CD25<sup>+</sup> T cells of naïve animals remain close to a gaussian CDR3-LD normality (Fig.7). Similarly, whole T cells, CD25<sup>-</sup> T cells or CD25<sup>+</sup> T cells obtained from tolerant rat spleens exhibited unaltered V beta transcriptome (Fig.7).

CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant animals were then administrated into sub irradiated LEW.1A secondary recipients of a LEW.1W heart grafts, the day of transplantation. Without cell

transfer, sub irradiated LEW.1A recipients rejected their heart graft in 17 +/- 1 days (excepted for two animals; n =17). Adoptive transfer of  $100 \cdot 10^6$  splenocytes from tolerant rat indefinitely prolonged the survival of the LEW.1W graft of sub irradiated secondary LEW.1A hosts (>100 days, n=3). Interestingly, adoptive transfer of  $50 \cdot 10^6$  of purified CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant animals also significantly prolong graft survival in 75% of LEW.1A hosts (>100 days, n=4, p<0.01 vs. subirradiated controls; Fig.8). Lower amounts of CD25<sup>-</sup> T cells ( $30 \cdot 10^6$ ) from tolerant animals had no effect (Fig.8). Finally, adoptive transfer of 1 to  $4 \cdot 10^6$  of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from tolerant animals were not able to prolong heart survival to LEW.1A hosts (17 days; n=4; Fig.8).

## Discussion

In this study, we investigated the potential regulatory role of CD25<sup>-</sup> T cells in tolerant recipients of MHC incompatible heart transplant following pregraft donor cell priming induction. In mice, regulatory CD25<sup>+</sup> T cells have been shown to control host anti-graft response in recipients tolerant to skin allograft following multiple pretransplant donor-specific transfusions (14). CD25<sup>-</sup> T cells have been also suggested to harbor a regulatory population able to control response against minor MHC incompatible antigen ((30) and (20) for review). In this paper, we show that regulatory CD25<sup>-</sup> T cells can also differentiate in long term tolerant recipient of a MHC incompatible graft and exhibit *in vitro* and *in vivo* regulatory effects including the transfer of tolerance in a MHC incompatible model.

Anergy has been associated with regulatory function (31, 32). Purified CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals exhibit an impaired proliferative response in MLR against donor-antigen APCs. In addition, using coculture experiments, we show that CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant recipients not only became anergic but also exhibit regulatory effects on naïve T cells response in a donor antigen specific manner that required direct-cell contact and that were not modified by the addition of anti IL-4 or IL-10 blocking antibodies. However exogenous IL-2 reverses the growth inhibition. In this context, it is interesting to note that TCR stimulation during MLR was able to induce IL-2 receptor expression by highly purified CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals showing that de novo expression of IL-2 receptor by CD25<sup>-</sup> T cells is a common phenomenon. The fact that CD25<sup>-</sup> regulatory T cells were only observed in long term tolerant recipients first suggests that a fraction of natural regulatory T cells cross reactive with donor alloreactive determinant could have differentiated in the long term recipients. The donor specificity of these cells supports such a possibility. In this respect, the

characteristics of regulatory CD25<sup>-</sup> T cells may be reminiscent of some of the well established properties of natural CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, such as the need of cellular contact (33), the absence of IL-4, IL-10 mediated effect (33-36), the reversal of the inhibition by exogenous IL-2 (37) and the absence of CDR3 Length distribution biases (38-40). However our finding would need to integrate phenotype change of selected regulatory CD25<sup>+</sup> T cells. Such phenotypic change has been previously suggested ((30, 41, 42) and below). Alternatively, the acquisition of antigen specific regulatory functions by CD25<sup>-</sup> T cells in long term tolerant animals could reveal an education (43, 44) of conventional alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells by “natural” regulatory CD25<sup>+</sup> T cells (34, 35). Indeed, no counterpart of natural regulatory CD25<sup>+</sup> T cells could be found in the CD25<sup>-</sup> T cells compartment, and no CD25<sup>-</sup> T cells with regulatory functions could have been isolated from the thymus. However this hypothesis is not supported by our finding showing no apparent expansion of the regulatory CD25<sup>+</sup> T cells pool in long term tolerant recipient. Indeed, no increase in the percentage of CD25<sup>+</sup> T cells was noted and no increase of inhibitory properties of CD25<sup>+</sup> T cells from long term tolerant animals could be detected *in vitro*. Finally CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells (1-4.10<sup>6</sup>) from long term tolerant animals were not able to transfer tolerance. To our knowledge, there is no published report in the rat on the ability to transfer tolerance from DST-induced recipient using purified CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, likely because of the technical difficulties to obtain enough of these cells. However in a modified DST protocol in mice (multiple pregraft transfusion and skin graft) (14), Bushell et al. were able to demonstrate a transfer of tolerance using purified CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. In our experiment, the amounts of CD25<sup>-</sup> or CD25<sup>+</sup> T cells transfer roughly correspond to a spleen “equivalent” in term of amount of cell transferred. In addition a roughly similar quantity of purified CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from desoxyspergaline derivate (LF15-0195) -treated animals was efficient in transferring tolerance in the same strain combination indicating that different mechanisms operates in different tolerance induction

models, even with the same genetic background (45). Therefore, collectively, our data rather suggest that the acquisition of antigen specific regulatory functions by CD25<sup>-</sup> T cells may be due to a loss of the CD25 marker of donor selected T regulatory. Our hypothesis is in agreement with others studies that have suggested first that CD25<sup>-</sup> T cells with regulatory function derived from CD25<sup>+</sup> precursors (41) and that CD25 expression may not be always a stable marker for regulatory T cells in periphery. Second, CD25<sup>-</sup> population prevent the rejection of a skin graft between minor MHC mismatch mice only if derived from tolerant mice, but not from naïve ones (46). Similarly, in our model, CD25<sup>-</sup> T cells exhibited *in vitro* regulatory functions only when derived from tolerant animals and not from naive animals. Furthermore, CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats are able to transfer tolerance to naive irradiated recipients whereas large amount ( $50 \cdot 10^6$ ) of T cells from either naïve or day 100, not DST preconditioned, LEW.1A rats having acutely rejected their graft on day 5 do not (Lair et al. in preparation). As suggested by Graca et al., some “tolerant” CD25<sup>+</sup> regulatory cells may lose the expression of CD25 and endow the CD25<sup>-</sup> population with new regulatory powers. Finally, Gavin et al. have shown that during the homeostasis process, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells that had divided more than five times no longer expressed CD25 marker but remained highly potent for suppression (42).

We were unable to demonstrate significant repertoire biases in CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant animals using a method which theoretically can detect alteration in the V beta repertoire in 1 out of  $10^5$  cells (25, 26). Apparently, these cells did not differentiate into dominant clones following specific selection, and remained at low frequency. Alternatively, mismatched allodeterminants could be numerous enough to recruit too diverse regulatory T cells to allow V beta CDR3-LD biases. The fact that natural CD25<sup>+</sup> regulatory T cells do not exhibit TCR biases (38-40) is also likely related to their polyclonal nature.

We previously showed that, after donor cell priming in the same strain combination, high levels of TGF-beta 1 mRNA (and active protein) are found in the graft in the first days following transplantation. Moreover, injection of a neutralizing anti TGF-beta 1 antibody abrogated allograft tolerance (7). The role of TGF-beta1 has also been shown in another strain combination using another protocol to induce tolerance (47). Recently, Fantini et al. have demonstrated that TGF-beta 1 *in vitro* can induce a conversion of naïve CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells into regulatory T cells able to inhibit alloreactive T cells, with induction of FoxP3 (48). To which extend the up regulation of TGF-beta 1 observed in our model (7) may influence the differentiation of regulatory CD25<sup>-</sup> T cells is however unknown. Here, we also show that regulatory CD25<sup>-</sup> T cells which have differentiated into long term heart graft recipients also accumulate FoxP3 transcripts as compared to naïve CD25<sup>-</sup> T cells. However, the physiological relevance of such a moderate FoxP3 increase (3-fold compared to the 100-fold increase observed in naïve CD25<sup>+</sup> T cells rats; LeLuduec, Cuturi et al., in preparation) is not clear. Kinetic studies are also needed to test when these cells appear and particularly if they are present at the induction phase of tolerance or only later during maintenance phase.

CD25<sup>-</sup> T regulatory cells exhibited an increase level of IL-10 transcripts. Late (day 90) IL-10 expression has also been reported by Koshiba et al. in tolerated grafts (and not in rejected ones) in DST-treated long term recipient of heart allograft (49). Despite the IL-10 transcripts upregulation, our data do not suggest that this cytokine is instrumental in their *in vitro* regulatory functions since they are unaffected by the addition of blocking antibodies against IL-10 in the coculture system. A similar pattern has been recently reported for a new regulatory subset in the rat (CD8<sup>+</sup>CD45R<sup>low</sup>) (50). However our data do not exclude that IL-10 production by these cells would have no *in vivo* role in the maintenance of tolerance. Similarly, IFN-gamma production may have potential role *in vivo*. IFN-gamma KO mice has

been shown to be refractory to tolerance induction (51) and in rats we previously shown that a blocking anti rat IFN-gamma antibody inhibited rather than potentialised the effect of DST on a subsequent heart transplant (52)

In summary, it has been shown previously that some regulatory function could be found in CD25<sup>-</sup> T cells (48) and that regulatory CD25<sup>-</sup> T cells are able to protect graft rejection in minor MHC incompatible models (30). This paper provides the first demonstration and some characteristics of regulatory CD25<sup>-</sup> T cells in long term allograft tolerant rats able to transfer graft survival to a fully MHC incompatible naïve recipients.



## **Acknowledgement**

The authors thank Helga Smit for technical assistance in microsurgery and J. Ashton for help in the editing of the manuscript.

1. Wood, K. J., S. Luo, and A. Akl. 2004. Regulatory T cells: potential in organ transplantation. *Transplantation* 77:S6.
2. Soulillou, J. P., F. Blandin, E. Gunther, and V. Lemoine. 1984. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 38:63.
3. Soulillou, J. P. 1998. Donor-specific transfusion-induced tolerance: mechanisms revisited. *Transplant Proc* 30:2438.
4. Dallman, M. J., O. Shiho, T. H. Page, K. J. Wood, and P. J. Morris. 1991. Peripheral tolerance to alloantigen results from altered regulation of the interleukin 2 pathway. *J Exp Med* 173:79.
5. Bugeon, L., M. C. Cuturi, M. M. Hallet, J. Paineau, D. Chabannes, and J. P. Soulillou. 1992. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats--characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 54:219.
6. Josien, R., C. Pannetier, P. Douillard, D. Cantarovich, S. Menoret, L. Bugeon, P. Kourilsky, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1995. Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation* 60:1131.
7. Josien, R., P. Douillard, C. Guillot, M. Muschen, I. Anegon, J. Chetritt, S. Menoret, C. Vignes, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1998. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest* 102:1920.
8. Douillard, P., C. Pannetier, R. Josien, S. Menoret, P. Kourilsky, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1996. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 157:1250.
9. Douillard, P., C. Vignes, R. Josien, E. Chiffoleau, J. M. Heslan, V. Proust, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1999. Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur J Immunol* 29:1919.
10. Vignes, C., E. Chiffoleau, P. Douillard, R. Josien, H. Peche, J. M. Heslan, C. Usal, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 2000. Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 165:96.
11. Koshiba, T., H. Kitade, B. Van Damme, A. Giulietti, L. Overbergh, C. Mathieu, M. Waer, and J. Pirenne. 2003. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 76:588.
12. Kataoka, M., J. A. Margenthaler, G. Ku, and M. W. Flye. 2003. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 171:204.
13. Zhai, Y., J. Li, M. Hammer, R. W. Busuttil, H. D. Volk, and J. W. Kupiec-Weglinski. 2001. Evidence of T cell clonality in the infectious tolerance pathway: implications toward identification of regulatory T cells. *Transplantation* 71:1701.
14. Bushell, A., M. Karim, C. I. Kingsley, and K. J. Wood. 2003. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 76:449.

15. Karim, M., C. I. Kingsley, A. R. Bushell, B. S. Sawitzki, and K. J. Wood. 2004. Alloantigen-Induced CD25(+)CD4(+) Regulatory T Cells Can Develop In Vivo from CD25(-)CD4(+) Precursors in a Thymus-Independent Process. *J Immunol* 172:923.
16. Zheng, X. X., T. G. Markees, W. W. Hancock, Y. Li, D. L. Greiner, X. C. Li, J. P. Mordes, M. H. Sayegh, A. A. Rossini, and T. B. Strom. 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.
17. Sanchez-Fueyo, A., M. Weber, C. Domenig, T. B. Strom, and X. X. Zheng. 2002. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J Immunol* 168:2274.
18. Kataoka, M., J. A. Margenthaler, G. Ku, M. Eilers, and M. W. Flye. 2003. "Infectious tolerance" develops after the spontaneous acceptance of Lewis-to-Dark Agouti rat liver transplants. *Surgery* 134:227.
19. Padberg, W. M., R. H. Lord, J. W. Kupiec-Weglinski, J. M. Williams, R. Di Stefano, L. E. Thornburg, D. Araneda, T. B. Strom, and N. L. Tilney. 1987. Two phenotypically distinct populations of T cells have suppressor capabilities simultaneously in the maintenance phase of immunologic enhancement. *J Immunol* 139:1751.
20. Zheng, X. X., A. Sanchez-Fueyo, C. Domenig, and T. B. Strom. 2003. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev* 196:75.
21. Josien, R., M. Heslan, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 1997. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>- dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 186:467.
22. Lucas, C., L. N. Bald, B. M. Fendly, M. Mora-Worms, I. S. Figari, E. J. Patzer, and M. A. Palladino. 1990. The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunol* 145:1415.
23. Seville, F., K. Gagne, M. Guillet, N. Degauque, A. Pallier, S. Brouard, B. Vanhove, M. A. Delsuc, and J. P. Soulillou. 2001. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution. *J Immunol* 167:3082.
24. Gagne, K., S. Brouard, M. Giral, F. Seville, A. Moreau, M. Guillet, J. D. Bignon, B. M. Imbert, M. C. Cuturi, and J. P. Soulillou. 2000. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 164:1553.
25. Pannetier, C., J. Even, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16:176.
26. Gorochov, G., A. U. Neumann, A. Kereveur, C. Parizot, T. Li, C. Katlama, M. Karmochkine, G. Raguin, B. Autran, and P. Debre. 1998. Perturbation of CD4 and CD8 T cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4 repertoire during antiviral therapy. *Nat Med* 4:215.
27. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057.
28. Fontenot, J. D., M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330.

29. Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko, and F. Ramsdell. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337.
30. Graca, L., S. P. Cobbold, and H. Waldmann. 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 195:1641.
31. Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 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.
32. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303.
33. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287.
34. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285.
35. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303.
36. Thornton, A. M., and E. M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164:183.
37. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 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.
38. Romagnoli, P., D. Hudrisier, and J. P. van Meerwijk. 2002. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Immunol* 168:1644.
39. Pacholczyk, R., P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2002. Peptide specificity of thymic selection of CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 168:613.
40. Kasow, K. A., X. Chen, J. Knowles, D. Wichlan, R. Handgretinger, and J. M. Riberdy. 2004. Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Share Equally Complex and Comparable Repertoires with CD4+CD25- Counterparts *J Immunol* 172:6123.
41. Stephens, L. A., and D. Mason. 2000. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol* 165:3105.
42. Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, and A. Rudensky. 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33.
43. Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*

196:247.

44. Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A. H. Enk. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196:255.
45. Chiffolleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J.-P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 2002. Role for Thymic and Splenic Regulatory CD4+ T Cells Induced by Donor Dendritic Cells in Allograft Tolerance by LF15-0195 Treatment. *J Immunol* 168:5058.
46. Graca, L., S. Thompson, C. Y. Lin, E. Adams, S. P. Cobbold, and H. Waldmann. 2002. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 168:5558.
47. Gagne, K., S. Brouard, M. Guillet, M. C. Cuturi, and J. P. Souilillou. 2001. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* 31:3111.
48. Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149.
49. Koshiba, T., A. Giulietti, B. Van Damme, L. Overbergh, O. Rutgeerts, H. Kitade, M. Waer, C. Mathieu, and J. Pirenne. 2003. Paradoxical early upregulation of intragraft Th1 cytokines is associated with graft acceptance following donor-specific blood transfusion. *Transpl Int* 16:179.
50. Xystrakis, E., A. S. Dejean, I. Bernard, P. Druet, R. Liblau, D. Gonzalez-Dunia, and A. Saoudi. 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*:2004.
51. Zand, M. S., Y. Li, W. Hancock, X. C. Li, P. Roy-Chaudhury, X. X. Zheng, and T. B. Strom. 2000. Interleukin-2 and interferon-gamma double knockout mice reject heterotopic cardiac allografts. *Transplantation* 70:1378.
52. Paineau, J., C. Priestley, J. Fabre, S. Chevalier, P. van der Meide, H. Schellekens, Y. Jacques, and J. P. Soulillou. 1991. Effect of recombinant interferon gamma and interleukin-2 and of a monoclonal antibody against interferon gamma on the rat immune response against heart allografts. *J Heart Lung Transplant* 10:424.

## Legends

**Figure 1. Proliferative response of whole, CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>+</sup> T cells to direct-type allostimulation and analysis of regulatory properties of the different subsets in naïve animals.** Whole T cells (n=12) as CD25<sup>-</sup> T cells (n=21) proliferate following 5 days of allostimulation. Removal of CD25<sup>+</sup> T cells induces an early proliferation of CD25<sup>-</sup> T cells detected as soon as 24 hours post-allostimulation (n=11; a.). In contrast, addition of CD25<sup>+</sup> T cells of naïve animals inhibited proliferation of alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells (n=4; b.).

**Figure 2. Proliferative response to direct-type allostimulation of splenocytes and CD25<sup>-</sup> T lymphocytes of long term tolerant animals.** Splenocytes (at least n=4; top) or purified CD25<sup>-</sup> T cells (at least n=10; bottom) of either naïve or long term tolerant animals were cultured with LEW.1W (left) or BN rats (right) enriched APCs. CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant animals only exhibited donor strain specific hyporesponsiveness (\*\*\*) p<0.0001).

**Figure 3. IL2 reversed hyporesponsiveness of CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals.** Different inhibitors (iNOS, IDO) (n=3; a) or antagonists (anti-IL-10, anti-IL-4 and anti-TGF-beta; n=5; b.) were added to the MLR. Only IL-2 restored the proliferation of CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals (n=11; \*\*\*, p<0.001), suggesting an anergy state of CD25<sup>-</sup> T cells in tolerant animals.

**Figure 4. CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals inhibited alloreactive naïve T cells.** When CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals are added in increasing number to a MLR, responders cells (CD25<sup>-</sup> T cells of naïve animals) proliferate less (a.). To compare the efficiency of inhibition between the different long term tolerant animals, the proliferation obtained with and without addition of CD25<sup>-</sup> T cells was also expressed in percentage (b.). The mean of inhibition induced by CD25<sup>-</sup> T cells of long term tolerant animals is 47 +/- 7% (n=22; \*\*\*, p<0.0001). Specificity of inhibition was assessed by using BN APCs (n=6; c.). CD25<sup>+</sup> T cells of naïve or long term tolerant animals exhibited unchanged inhibitory properties (n=4; d.).

**Figure 5. Suppression mediated by alloantigen induced CD25<sup>-</sup> T cells is cell-cell contact dependent.** Transwell chambers (a.) were used to prevent the direct cell-contact between suppressive CD25<sup>-</sup> T cells (tolerant animals; n=3) and alloreactive CD25<sup>-</sup> T cells (naïve animals; n=3). The suppressive activity of CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant animals is abrogated by the semi permeable membrane. To confirm the need of cell-contact inhibition, different inhibitors (iNOS, IDO; n=7; b.) or antagonists (anti-IL-10, anti-IL-4, anti-TGF-beta; n=6; c.) were added to the coculture system. Only IL-2 restored the proliferation (n=5; \*, p<0.05).

**Figure 6. CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats accumulate IFN- gamma, IL-10 and FoxP3 transcripts.** CD25<sup>-</sup> T cells from long term tolerant rats accumulate significantly IFN-gamma, IL-10 cytokines transcripts whereas transcripts of IL-2, TNF-alpha, IL-13 and TGF-beta 1 remain unchanged as compared to CD25<sup>-</sup> T cells from naïve rats (n=6; \*\*, p<0.01; a). FoxP3 transcripts were also significantly upregulated in long term tolerant rats as compared to naïve animals (n=6; \*\*, p<0.01; b).

**Figure 7. Natural and induced regulatory cells exhibited no TCR repertoire biases (CDR3-LD alteration).** The global V beta transcriptome was analyzed at the CDR3-LD level. The percentage mentioned at the bottom of each transcriptome landscape indicate global variation of CDR3-LD from normality (ns) (see Material & Methods). Alloreactive (CD25<sup>-</sup> T cells; n=3) and regulatory subsets (CD25<sup>+</sup> T cells; n=3) of naïve animals exhibited unaltered V beta transcriptome. Regulatory CD25<sup>-</sup> (n=3) and CD25<sup>+</sup> T cells (n=3) of tolerant animals

exhibited also no V beta transcriptome alteration.

**Figure 8. CD25<sup>-</sup> T cells of tolerant animals transfer tolerance to naïve LEW.1A recipients.** Sub irradiated LEW.1A recipients transplanted with LEW.1W heart (filled square) reject their graft in 17 days (n=17). Recipients injected with  $50 \cdot 10^6$  T cells (filled circle; n=3) or  $50 \cdot 10^6$  CD25<sup>-</sup> T cells (open square; n=4) from tolerant animals accepted their graft indefinitely whereas recipients injected with  $30 \cdot 10^6$  CD25<sup>-</sup> T cells from tolerant animals (open circle; n=3) did not. Injection of 1 to  $4 \cdot 10^6$  CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells from tolerant animals to a naïve recipient had no effect (open triangle; n=4).

Fig.1

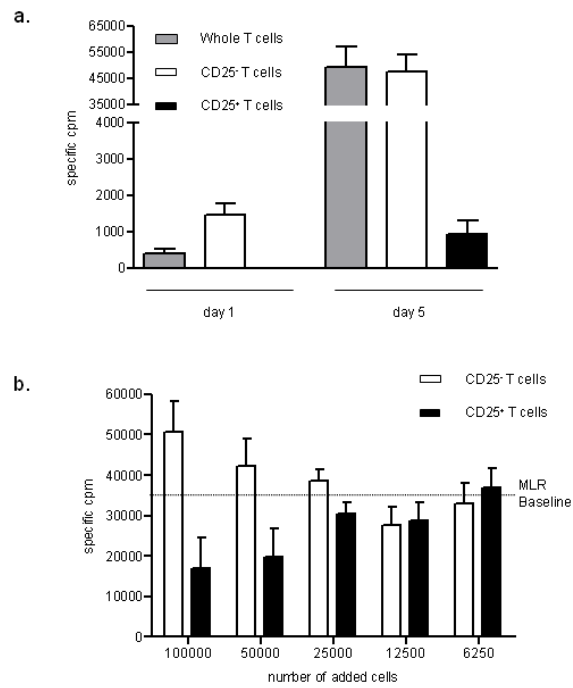


Fig.2

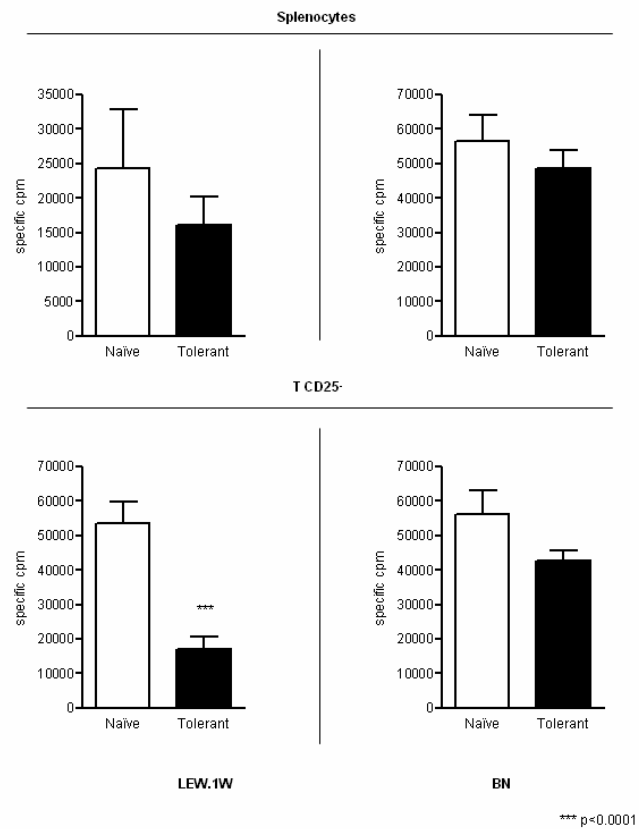






Fig.3

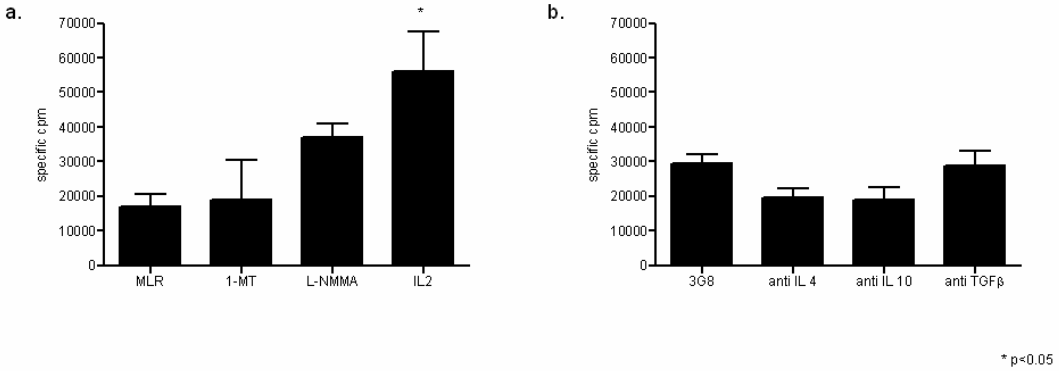
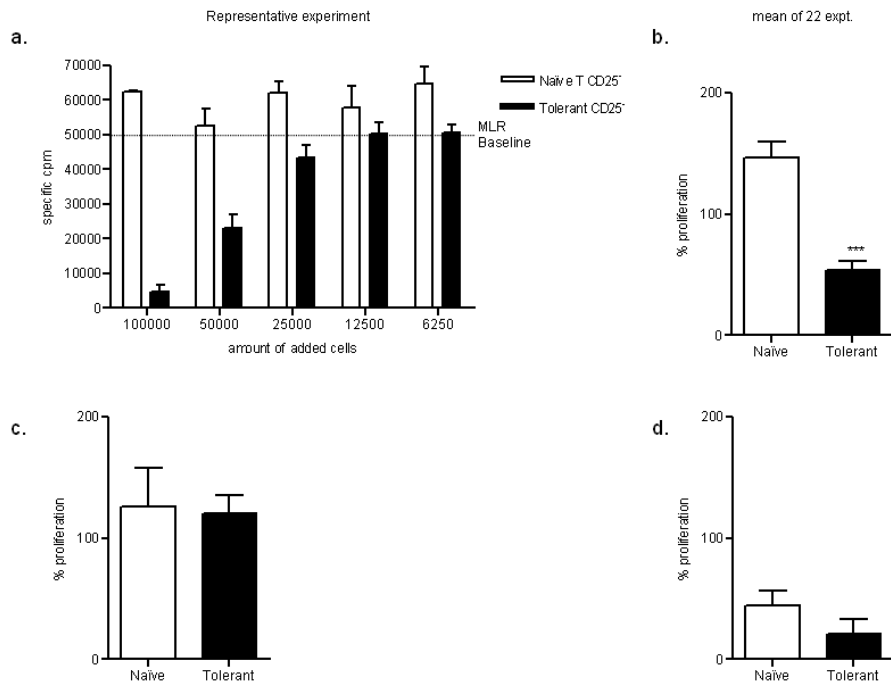
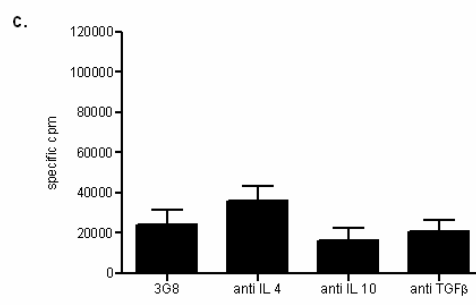
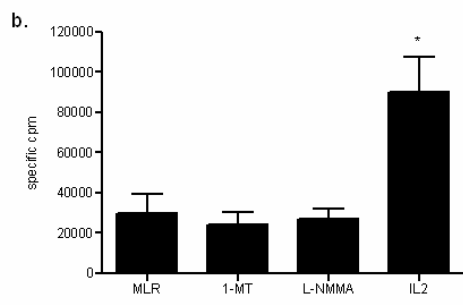
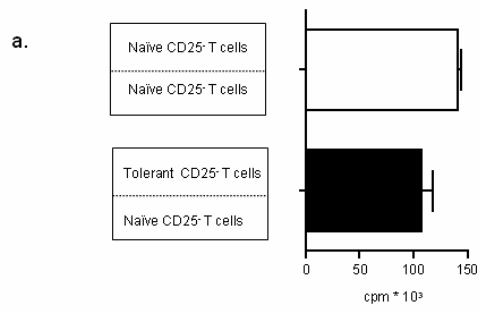


Fig.4



\*\*\* p<0.0001

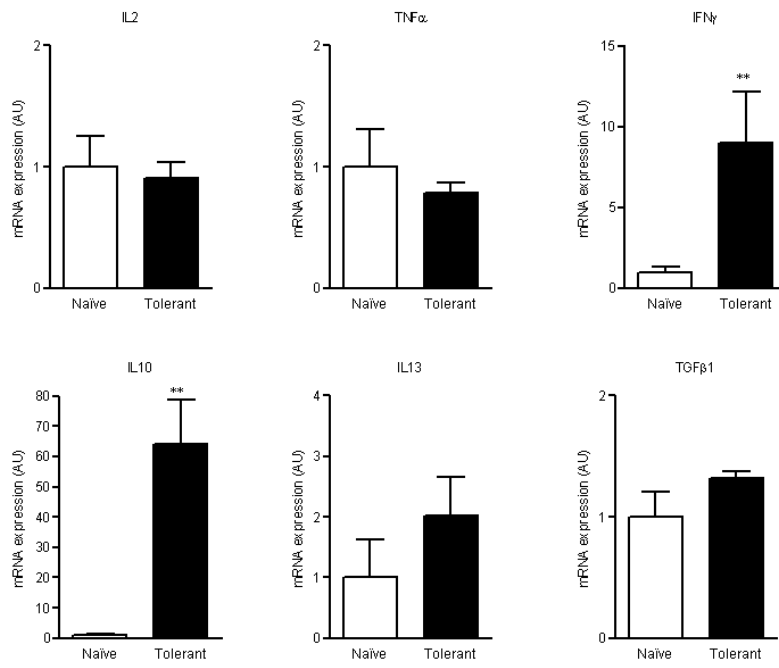
Fig.5



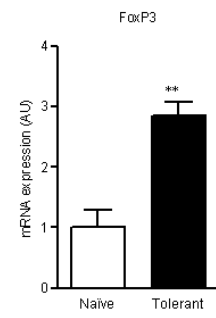
\*p<0.05

Fig.6

a.



b.



\*\* p < 0.01

Fig.7

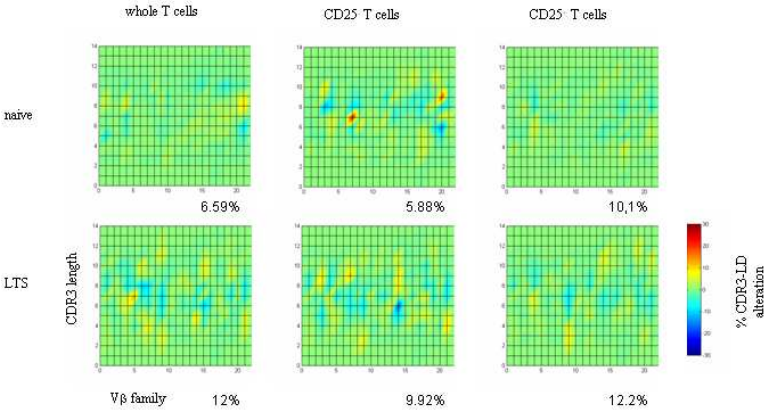
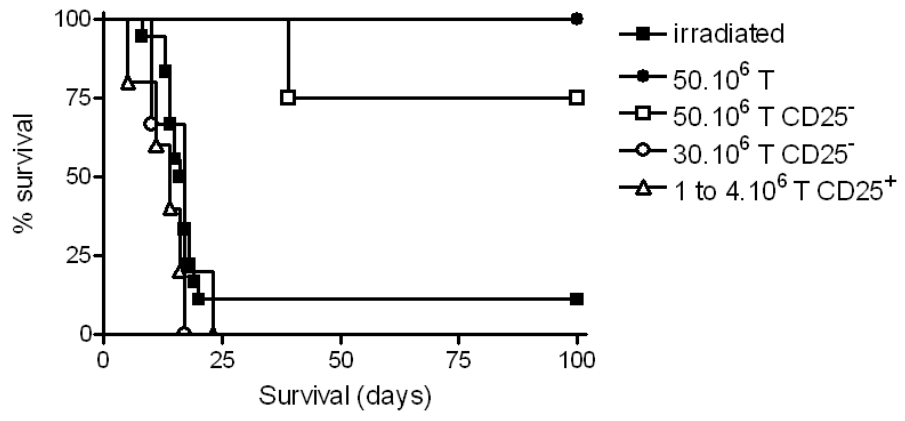


Fig.8



*Transfer Of Dominant Tolerance To Recipients Of Fully MHC Mismatched Kidney  
Grafts Induced By Anti-Donor Class II Antibodies: T/non-T cell collaboration*

Nicolas Degauque<sup>1</sup>, Alexandre Dupont<sup>1</sup>, David Lair<sup>1</sup>, Gwénaelle Roussey<sup>1</sup>, Frédérique Moizant<sup>1</sup>, Fabienne Haspot<sup>1</sup>, Katia Gagnez<sup>3</sup>, Marcello Hill<sup>1</sup>, Claire Usal<sup>1</sup>, Helga Smit<sup>1</sup>, Bernard Vanhove<sup>1</sup>, Céline Séveno<sup>1</sup>, Anne Moreau<sup>2</sup>, Jean-Paul Soulillou<sup>1\*</sup> and Sophie Brouard<sup>1\*</sup>.

Both senior authors contributed similarly to this project.

<sup>1</sup> Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) - Unité 643: “Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France.

<sup>2</sup> Pathology Laboratory, CHU Hotel-Dieu, 30 Bd. Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.



**Transfer Of Dominant Tolerance To Recipients Of Fully MHC Mismatched Kidney  
Grafts Induced By Anti-Donor Class II Antibodies: T/non-T cell collaboration**

Nicolas Degauque<sup>1</sup>, Alexandre Dupont<sup>1</sup>, David Lair<sup>1</sup>, Gwénaelle Roussey<sup>1</sup>, Frédérique Moizant<sup>1</sup>, Fabienne Haspot<sup>1</sup>, Katia Gagne<sup>3</sup>, Marcello Hill<sup>1</sup>, Claire Usal<sup>1</sup>, Helga Smit<sup>1</sup>, Bernard Vanhove<sup>1</sup>, Céline Séveno<sup>1</sup>, Anne Moreau<sup>2</sup>, Jean-Paul Soulillou<sup>1\*</sup> and Sophie Brouard<sup>1\*</sup>.

Both senior authors contributed similarly to this project.

<sup>1</sup>Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) – Université de Nantes, UMR 643: “Immunointervention dans les Allo et Xenotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France.

<sup>2</sup>Pathology Laboratory, CHU Hotel-Dieu, 30 Bd. Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

<sup>3</sup>Laboratoire d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique, EFS Pays de Loire, 34 bd Jean Monnet, 44011 Nantes, France.

**Correspondence address:**

Pr. Jean-Paul Soulillou

I.N.S.E.R.M. UMR643, CHU-HOTEL DIEU, 30 bd. Jean Monnet  
44093 Nantes Cedex 01, FRANCE.

Tel: + 33.240.08.74.10

Fax: + 33.240.08.74.11

Email: [jps@nantes.inserm.fr](mailto:jps@nantes.inserm.fr)

## **Abstract**

Acceptance of an allograft can be induced in the rat by pre-transplant infusion of donor blood or spleen cells. Although promoting tolerance, this treatment induces anti-donor immune response, including anti-class I and class II antibodies. Here, we show that donor-specific tolerance to a kidney allograft can be induced in adult rat recipients of an MHC mismatched transplant by a single administration of anti-donor class II alloimmune serum on the day of transplantation. Anti-donor class II-treated long-term survivors (LTS) accept a LEW.1W skin graft but reject that of a third party Brown Norway rat. Kidney grafts from LTS displayed barely detectable levels of IgM and IgG deposits and no evidence of chronic rejection. *In vitro*, splenocytes from LTS exhibited a decreased donor-specific response, which was restored by depletion of non-T cells and partially restored by the blockade of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO). Moreover, IDO was found increased (8 times more mRNA transcripts) in the tolerated grafts as compared with syngeneic grafts. Splenocytes from LTS transferred robust and dominant donor-specific tolerance after infusion to naïve recipients of an allograft without chronic rejection and over two generations. However, T cells purified from these splenocytes or isolated non-T cells alone failed to reproduce this effect. These data show that the full and dominant tolerant state following injection of a single dose of anti-donor class II alloantibodies at the time of transplantation is supported by the interaction between T and non-T cells and involves the indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway.

## Introduction

Inducing donor-specific tolerance, defined as the indefinite survival of a well-functioning graft in an immunocompetent adult host in the absence of immunosuppression, remains the challenge of transplant immunology. Experimentally, a variety of maneuvers, including pre-transplantation priming with donor MHC antigens (blood or splenocytes)<sup>1,2,3</sup>, transfected cells expressing donor MHC antigens<sup>4</sup>, soluble MHC molecules or allopeptides<sup>5</sup>, MHC gene transfer<sup>6,7</sup> or DNA vaccination<sup>8</sup> can induce donor-specific allograft tolerance. Moreover, we have shown that injection of recipients with antibodies directed against donor class II MHC can also induce specific tolerance to renal vascularized allografts in adult rats<sup>9,10</sup>. This approach has two potential advantages over donor specific transfusion (DST)<sup>1,11</sup>; not only does it work when the injection is administered at the time of surgery<sup>9</sup> but it only targets donor determinants. In a model of heart allotransplantation in the MHC mismatched LEW.1W to LEW.1A combination, the administration of anti-donor class II antibodies induced substantial graft survival prolongation but not indefinite acceptance. In these experiments, injection of a blocking anti-TGF $\beta$  antibody inhibited the capacity of anti-donor class II antibodies to prolong graft survival and graft survival was considerably shortened if the graft was depleted of dendritic cells before being transplanted<sup>10</sup>. This observation indicated that the tolerance “inducing” effect of anti-donor antibodies was dependant on their interaction with class II-expressing graft resident dendritic cells and not due to the destruction of these cells within the graft. In this paper, using the same LEW.1W to LEW.1A combination but a kidney graft model in which anti-class II antibodies can induce indefinite graft survival, we characterize the mechanisms involved in the maintenance phase of tolerance 100 days after transplantation. We show that, in contrast to DST preconditioning, anti-donor class II antibodies can induce true tolerance to a kidney allograft i.e. without any functional or histological signs of chronic rejection. Moreover, anti-donor class II-treated LTS accept a donor skin graft but reject a third party skin graft, a phenomenon that defines a state of “specific tolerance”. In several other models of allograft tolerance induction, it has been shown that the maintenance phase of tolerance can be self sustaining and adoptively transferred to naïve recipients by tolerant recipient T cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells have been proposed to be key players of this phenomenon<sup>12,13</sup>. Once activated through their TCR, these cells exhibit suppressive activity in a cytokine independent and cell contact dependant manner<sup>14,15,16,17</sup>. In this study, we show that anti-donor class II antibodies induce a different type of

regulatory cell. Not only did LTS exhibit a normal number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells following anti-donor class II conditioning, but tolerance could not be transferred by large quantities of tolerant recipient T cells alone. Rather, transfer of tolerance in this model required a T/non-T cell cooperation. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a cytoplasmic enzyme involved in tryptophan catabolism and has been shown to be responsible for down-modulating T cell activation and proliferation<sup>18</sup> as well as regulating NK cell proliferation<sup>19</sup>. Because IDO is expressed by non T cells, such as NK/NKT cells, macrophages and dendritic cells<sup>20 21 18</sup>, we looked upon this molecule as being a possible mediator of cross-talk between T and non-T cells in this model. Interestingly, tolerated grafts from LTS displayed higher levels of IDO transcripts. In addition, inhibition of the IDO pathway *in vitro* partially restored the anti-donor proliferative response of splenocytes from LTS. Finally, in comparison with other tolerance induction treatments performed in the same strain combination in our laboratory, ie DST (*D. Lair et al, Submitted*) and LF15-0115<sup>22</sup>, these data also show that different levels and mechanisms of tolerance maintenance are involved following different tolerance induction regimens.

## Materials and Methods

**Animals and surgical procedures:** Inbred adult rats (males) (200-250g) of the LEW.1A (RT1<sup>a</sup>) and LEW.1W (RT1<sup>u</sup>) congenic strains were purchased from Janvier (Savigny/Orge, France). All animals were maintained under standard conditions according to European and Institutional Guidelines. Orthotopic kidney transplantations were performed aseptically, as previously described <sup>9</sup>. Recipients underwent an initial nephrectomy on the day of transplantation and a second nephrectomy was performed seven days later. Rejection, indicated by the death of the binephrectomized rat, was confirmed by histology. In parallel, functional renal modifications were monitored in the urine (total protein and creatinine) and serum (urea, creatinine). The protein/creatinine ratio was considered normal when below 0.2 and pathological (proteinuria) when above this level. LTS (>100 days) were challenged with donor (LEW.1W), third-party (BN) or recipient-(LEW.1A) MHC-type expressing skin grafts. Skins were transplanted onto the lateral thoracic wall and were inspected daily for rejection. When required, splenectomy was performed on day 100. Graft function was monitored by measuring the blood urea (mmol/l) and creatinemia ( $\mu\text{mol/l}$ ) levels and the urine protein (g/l)/creatinine (mmol/l) ratios (proteinuria, g/mmol) in LTS (n=5) compared to naïve rats (n=4).

**Experimental groups and adoptive transfer experiments:** Group I consisted of unmodified LEW.1A recipients of LEW.1W kidneys (n=6). In group II LEW.1A recipients were injected with 0.5ml (IV) of anti-LEW.1W class II antibodies (n=15) at the end of the surgical procedure <sup>9</sup> (table 1). Additional groups of recipients were used to test the effect of cell transfer from LTS to naïve non-irradiated recipients of a LEW.1W kidney. Adoptive transfers were performed intravenously on the day of transplantation. Group III received  $8.10^7$  splenocytes from LTS (n=12). Group IV received  $8.10^7$  purified T cells from the spleens of LTS (n=4). Group V received 5 to  $8.10^7$  T cell-depleted splenocytes from LTS (n=6). Group VI received  $8.10^7$  splenocytes from naïve LEW.1A rats (n=3). Group VII received  $8.10^7$  peripheral blood lymphocytes (PBL) from LTS (n=3). Group VIII received  $8.10^7$  PBL from naïve LEW.1A rats (n=3). Group IX received  $8.10^7$  T cell-depleted splenocytes from naïve LEW.1A rats (n=2). In addition, 3 rats (Group X) received 0.5ml of serum from LTS (table 1).

**Preparation of AIS and depletion of anti-class I antibodies:** LEW.1A rats (n=10) were immunized with LEW.1W skin grafts and injected (IV) three days later and biweekly for two

months with  $10^8$  mononuclear cells purified from LEW.1W spleen cells. Depletion of anti-class I antibodies was performed as described elsewhere <sup>10</sup>.

**Cell purification: APC:** APC from LTS, naïve LEW.1A, LEW.1W or BN rats were enriched from spleens digested with collagenase D (2mg/ml; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 20 minutes at 37°C. Ten  $\mu$ M EDTA was added for 5 minutes and cells were washed and resuspended in 5 $\mu$ M EDTA/PBS/2% FCS. The resulting suspension was deposited on a Nicodenz gradient (14.5%) (Nycomed Pharma, Roskilde, Denmark), centrifuged and adjusted to the appropriate concentration. **Spleen and blood cell purification:** One hundred days after transplantation, spleen cells from LTS and naïve LEW.1A rats were isolated by passing spleen tissue through a stainless steel mesh and depleting erythrocytes by osmotic shock. The splenocytes isolated were then washed twice in PBS. One portion was enriched for T cells using rat T cell enrichment columns (R&D systems) and another portion was depleted of T cells using an anti-CD3 antibody together with Dynal beads. Cell purifications and depletions were systematically checked by flow-cytometric analysis (>95%). Peripheral blood lymphocytes (PBL) from LTS and naïve LEW.1A rats were enriched by a ficoll gradient procedure and washed twice in PBS.

**Mixed lymphocyte reactions:** Standard one-way mixed lymphocyte reactions (MLR) were performed. Splenocytes were isolated from naïve rats and LTS 100 days after transplantation. Donor-type LEW.1W and third-party Brown Norway (BN) enriched antigen presenting cells (APC) were irradiated. Triplicate samples of responder ( $10^5$  cells/well) and stimulator cells ( $2.10^4$  cells/wells) were plated in 96-well round-bottom plates in a final volume of 200 $\mu$ l of RPMI 1640 medium supplemented with 2mM L-glutamine,  $5.10^{-5}$ M 2-ME, 1mM sodium pyruvate (Life technologies), 1% non essential amino acids, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin and 10% heat-inactivated FCS (Life Technologies). The cells were then cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Proliferation of the responder population was assessed on day 3 and/or 5 by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H] TdR (0.5  $\mu$ Ci per well; Amersham, Les Ulis, France) during the final 8 hours of culture. Cells were then harvested onto glass fiber filters and [3H] TdR incorporation was measured by standard scintillation procedures (Packard Instruments, Meriden, CT). In certain experiments, MLR were performed in the presence of the Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) antagonist 1-Méthyltryptophane (500 $\mu$ g/well; Sigma). The results were expressed as specific c.p.m.

**Antibodies:** The following hybridomas were obtained at the ATCC and produced at Bioatlantic (Nantes, France), or in our own laboratory and used to phenotype rat leukocytes from the spleen and blood of anti-donor class II-treated LTS 100 days after transplantation and of naïve LEW.1A rats: W3/25 (anti-CD4), OX8 (anti-CD8), OX34 (anti-CD2), OX19 (anti-CD5), WT1 (anti-CD11A), WT5 (anti-CD11B), 8A2 (anti-CD11C), OX85 (anti-CD62L), JJ319 (anti-CD28), OX1 and OX30 (anti-CD45), OX33 (anti-CD45 present on B cells), OX22 (anti-CD45RC), anti-CD80 (anti-B7.1, 3H5), anti-CD86 (anti-B7.2, 24F) 3.2.3 (anti-NKRP1), OX41 (anti- $\alpha$ GRP), OX26 (anti-CD71), OX62 (anti- $\alpha$ 1-chain integrin), OX39 (anti-CD25), OX3 (anti-RT1.u), OX6 (anti- RT1.u/ RT1.a), (anti-CD40), OX7 (anti-Thy 1-1) and R7.3 (anti-TCR).

**Flow-cytometric analysis:** Splenocytes were isolated and prepared as previously described. Analysis was performed using CellQuest software (BD Biosciences, Mountain view, CA).

**Histology and immunohistology:** Kidney tissue samples were placed in 10% formol. Hematoxylin phloxin Safran (H&S) staining was performed on paraffin embedded sections. Vascular lesions (percentage of obstruction, leukocyte infiltration and medium lesions) were analyzed in at least 10 medium size vessels. Snap frozen graft sections from LTS (>100 days) embedded in Tissue Tek (OCT compound; Bayer Diagnostics, Puteaux, France) were cut into 5- $\mu$ m sections and fixed in acetone for 10 min at room temperature for immunochemistry. The total leukocyte infiltrate was measured by immunochemistry using a three-step indirect immunoperoxidase technique with Ox1/Ox30 (anti-CD45) primary antibody and the corresponding biotin-conjugated anti-mouse Ig-Ab, HRP-conjugated streptavidin and VIP substrate. The area of each immunoperoxidase-labeled tissue section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis, as previously described<sup>23</sup>. The results were expressed as the percentage of the area of the tissue section occupied by positive cells ( $\pm$  SD). Anti-donor-specific IgM and IgG isotypes were examined in the kidney grafts of LTS (>100 days post-transplantation) and syngeneic rats. Rejected grafts from untreated recipients harvested on day 7 were used as a positive control. Deposits of the different isotypes of rat Ig in the kidneys were studied by immunochemistry. Non-transplanted kidneys from LEW.1W rats were used as controls. Sections were incubated for 45 minutes with FITC-conjugated mouse monoclonal antibodies directed against rat IgM (MARM-4) (1/100) and IgG (MARG1) (1/100) (University of Louvain, Brussels, Belgium) and rinsed 3 times with PBS.

**Serum anti-donor IgM and Ig antibodies:** Serum anti-donor-specific IgM and IgG isotypes were examined in blood from LTS (>100 days post-transplantation), syngeneic LEW.1A recipients (day 100) and untreated recipients that had rejected their graft and had been maintained without undergoing contralateral nephrectomy (day 100). The anti-donor-specific IgM and IgG isotypes were determined by flow cytometry using, as targets, LEW.1W splenocytes cultured for three days with 7µg/ml concanavalin A (Sigma). Aliquots of 10<sup>5</sup> splenocytes were incubated for 30 minutes at 4°C with 30 µL of serially diluted serum taken from rats or rats that had rejected their allografts. Cells were secondarily stained with anti-rat IgM or anti-rat IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c antibodies revealed by FITC anti-mouse antibodies. Alloreactivity was analyzed following separate gating on OX33<sup>+</sup> cells (class I and II positive B cells) and on OX33<sup>-</sup> cells (class I positive cells). The cells were examined by flow cytometry and the results expressed as the mean channel fluorescence.

**mRNA transcript analysis:** Cβ, IDO, HO-1 and cytokine (IL2, IFNγ, IL13, TGFβ1, IL10, IL4 and TNFα) transcript analysis was performed by real-time PCR as described elsewhere<sup>24</sup> on kidney grafts and spleens from LTS and syngeneic LEW.1A grafts on day 100 after transplantation, and on kidneys from naïve non-transplanted LEW.1W rats. HPRT was used as an endogenous control to normalize RNA amounts. The results were expressed as the intra-sample target / HPRT mRNA copy number ratio. Primer sequences were as follows:

**Statistical analysis:** Data were analyzed using the Mann-Whitney test (analysis of two groups) or Kruskal-Wallis tests followed by a Dunn's post-hoc test (analysis of more than two groups) . A two-way ANOVA followed by a Bonferonni post-hoc test was used to analyze the effect of the addition of 1-MT and the effect of anti-donor class II treatment. Survival curves were analyzed using the Kaplan-Meier test. Differences were defined as statistically significant when  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.01$  (\*\*).



## Results

***Anti-donor class II antibodies induce long-term survival of kidney grafts in recipients that reject third party skin grafts:*** MHC mismatched LEW.1W kidney graft survival in untreated LEW.1A recipients was 11+/-1 days (n=6) (table 1). Administration of a single dose of 0.5 ml of anti-donor class II antibodies induced long-term graft survival in all LEW.1A recipients (n=15). The same serum, however, did not prolong the survival of BN (RT1<sup>n</sup>) kidneys. Furthermore, long-term surviving kidney allograft recipients accepted a LEW.1W skin graft but rejected a third party BN skin graft (Figure 2A). Splenectomy of anti-donor class II-treated LTS 100 days after transplantation did not abrogate graft survival (n=11).

***Tolerated Kidney allografts display no histological or clinical signs of chronic rejection and low levels of IgM/IgG deposition:*** Because the presence of regulatory cells, as exemplified here by the effect of cell transfer experiments, have been shown to coexist with chronic rejection in “tolerated” grafts following DST in a model of heart or kidney graft in the same LEW.1W to LEW.1A combination (Brouard *et al.*, unpublished data)<sup>25</sup>, graft histology and blood creatinine/urea were studied in these recipients. The kidneys of four LTS did not show pathological changes associated with chronic rejection (Figure 2B). These results were supported by normal 100 day protein/creatinine ratios in urine samples (0.16+/-0.02 g/mmol) (n=5) and by normal and stable blood urea (6.42+/-2.6 mmol/l) and creatinemia (35.4+/-7 µmol/l) levels compared to naïve rats (urea: 5.5+/-0.3mmol/l, creatinemia: 27.5+/-4.4 µmol/l, protein/creatinine ratio<0.2 g/mmol) (Figure 2C). Kidneys from LTS displayed only barely detectable levels of IgM and IgG deposition (Figure 2D, 2E), similar to that observed in syngeneic grafts harvested 100 days after transplantation.

***LTS display a skewed alloantibody response:*** We then examined the effect of the initial administration of anti-donor class II antibodies on the alloantibody response (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c) in LTS 100 days after transplantation. This response was compared with that of day 100 untreated recipients that had acutely rejected their graft and had been maintained without contralateral nephrectomy. LTS displayed no significant different level for of IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c directed against donor MHC class I and II molecules (Figure 3).

***Anti-donor class II-treated LTS have an increased percentage of spleen T cells expressing a CD45RC<sup>low</sup> and CD62L<sup>+</sup> memory/activated phenotype and grafts from anti-donor class***

***II-treated LTS display a higher number of infiltrating leukocytes than those from syngeneic recipients:*** An extensive phenotypic analysis (see *Materials and Methods* section) was performed on the LTS 100 days after transplantation. Most markers were found expressed at similar level in LTS and normal rats. There was no difference in the number of T cells, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell sub-populations or in the percentage of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells between the two groups. However, CD45RC<sup>low</sup> and CD62<sup>-</sup> T cells, classically corresponding to memory/activated T cells, were present in higher percentages in the total splenocytes and in the CD4<sup>+</sup> T cell population from LTS(Figure 4). The graft leukocyte infiltrate was measured in LTS 100 days after transplantation. Grafts from LTS exhibited a larger infiltrate (27.9+/-1.7 cells per graft surface area) than those from from syngeneic recipients (12.5+/-2.9 cells per graft surface area) and normal LEW.1W rats (9.7 cells per graft surface area) (Figure 5B).

***The splenocytes of anti-donor class II-treated LTS induce long-term survival of LEW.1W but not of third-party BN kidney grafts in secondary LEW.1A naïve rats:*** To test the hypothesis of regulatory cell involvement in the maintenance phase of tolerance, we performed different series of cell transfers from LTS (>100 days) into secondary non-irradiated naïve LEW.1A recipients of LEW.1W kidney grafts. Splenocytes harvested from tolerant recipients administered intravenously into secondary LEW.1A recipients consistently induced long-term survival of LEW.1W kidneys (n=12) (Table 1, Figure 6A) but not of third-party BN kidneys. As control, splenocytes from naïve LEW.1A rats did not prolong survival of LEW.1W kidneys (n=3) (Table 1, Figure 6A). PBL from day 100 LTS administered to secondary LEW.1A recipients had no effect on subsequent LEW.1W kidney survival. Finally, serum from tolerant LEW.1A recipients had no effect on graft survival prolongation of LEW.1W kidneys transplanted into secondary recipients (Table 1).

***Second hosts of a kidney graft injected with splenocytes from anti-donor class II-treated LTS display a robust and dominant tolerance without histological and clinical signs of chronic rejection:*** Grafts from second hosts injected with splenocytes from anti-donor class II-treated LTS showed no histological signs of chronic rejection (Figure 6B). The absence of chronic rejection in secondary hosts was also supported by normal protein/creatinine ratios in the urine and normal levels of blood urea and creatinine on day 100 following adoptive transfer. To determine whether the tolerant state was transferable over a second generation of naïve recipients, splenocytes from secondary LTS (>100 days) were transferred into tertiary naïve LEW.1A recipients of LEW.1W kidney grafts (n=3). Splenocytes from secondary

tolerant recipients induced long-term survival of LEW.1W kidneys transplanted into tertiary naïve LEW.1A recipients.

***Non-T cells, but not T cells, from tolerant rats prolong survival of a second LEW.1W kidney graft:*** Because splenocytes from tolerant recipients consistently induced tolerance in secondary non-irradiated LEW.1A hosts following adoptive transfer, we next tested the capacity of purified T cells to transfer tolerance. Even at very high doses ( $8 \cdot 10^7$ ), purified spleen T cells from LTS had no effect on the survival of subsequent LEW.1W kidney allografts placed in secondary LEW.1A hosts (n=6) (Table 1 and Figure 6A). Because unseparated splenocytes but not T cells induced tolerance, we then tested the effect of non-T cell splenocyte transfer. T cell-depleted splenocytes ( $5 \cdot 10^7$  to  $8 \cdot 10^7$ ) prolonged survival of subsequent LEW.1W kidney allografts in 3 out of 6 naïve secondary recipients (Table 1, Figure 6A) but did not result in long-term graft survival. The effect of this transfer was not dose-dependent (3 recipients injected with  $5 \cdot 10^7$  cells rejected their graft on days 14, 21 and 21 and the 3 recipients injected with  $8 \cdot 10^7$  cells still rejected on days 12, 12 and 50). Finally, T cell-depleted splenocytes ( $8 \cdot 10^7$  cells) from naïve LEW.1A rats used as controls had no effect.

***Splenocytes from anti-donor class II-treated LTS (>100 days) display a decreased donor-specific response whereas purified T cells respond normally:*** Splenocytes and purified spleen T cells (i.e. the “direct” allorecognition pathway setting) from naïve and LTS (>100 days) LEW.1A rats were stimulated for 5 days with donor LEW.1W or with BN third-party APC-enriched populations. Splenocytes from the LTS displayed a 5 fold decrease in their donor-specific proliferative response to LEW.1W APC ( $p < 0.05$ ; Figure 7A.a) whereas their response to third party BN enriched APC was unmodified (Figure 7A.b). In contrast, purified T cells from the spleens of naïve LEW.1A rats or LTS (>100d) proliferated similarly when stimulated with donor LEW.1W APC (Figure 7B).

***Kidneys from anti-donor class II-treated LTS display high levels of IDO transcripts:*** Transcript levels of C $\beta$ , HO-1 and IDO and the cytokines IFN $\gamma$ , IL2, IL4, IL13, IL10, TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  were measured in the grafts and spleens of LTS and compared to those in syngeneic rats 100 days after transplantation and in normal rats. No difference was found for TGF $\beta$ 1 or for Th1 and Th2 cytokines in kidneys and spleens from the three groups (*data not shown*). However, whereas no difference was observed in the spleens from the three groups, kidney grafts from LTS displayed significantly higher levels of IDO transcripts (>8 fold)

( $p < 0.05$ ) than normal LEW.1W kidneys and syngeneic grafts (Figure 5). The increased levels of IDO transcripts in grafts from the LTS was associated with significantly increased levels of C $\beta$  transcripts (in accordance with an increased cellular infiltrate - *see above*) compared to syngeneic grafts and normal kidneys (Figure 5).

***Donor-specific inhibition of the proliferative responses of splenocytes from LTS is in part dependant on IDO:*** Because IDO was found to be over-expressed in tolerated grafts, we further investigated its potential role *in vitro* in controlling the T cell response to donor APCs. Splenocytes from LTS were tested in MLR in the presence or absence of a specific IDO antagonist (1-Methyltryptophane). As mentioned, splenocytes from LTS (> 100 days) proliferated significantly less (5 fold) than naïve splenocytes ( $p < 0.05$ ; Figure 6.C) but addition of 1-Methyltryptophane significantly restored the proliferation of splenocytes from LTS stimulated with LEW.1W donor APC ( $p < 0.01$ ; Figure 7.C).

## Discussion

Tolerance in the rat is obtained in adult allograft recipients following various protocols<sup>2,12,26</sup>. The capacity of anti-donor MHC alloantibodies to prolong survival or induce tolerance to allografts is well documented<sup>9,27-31</sup>. In the LEW.1W to LEW.1A combination, we previously showed that, following a MHC mismatched heart transplantation, a single administration of anti-donor class II alloimmune serum at the time of transplantation induces significant prolongation of graft survival via mechanisms involving graft resident dendritic cells and TGF $\beta$ <sup>10</sup>. In this paper, we investigated the maintenance phase of tolerance and its transfer. Because anti-donor class II antibodies only induced prolongation of cardiac allograft survival, we tested their effect on kidney allograft survival in the same combination. Whereas untreated animals rejected their grafts within 11 +/- 1 days, administration of anti-donor class II antibodies induced indefinite long-term survival of LEW.1W kidney transplants. Kidneys from long-term survivors displayed no functional or histological signs of chronic rejection and only barely detectable levels of IgM and IgG deposition. Interestingly, the anti-donor MHC alloimmune response still detected in LTS 100 days post transplantation suggests that the hosts had nevertheless developed some degree of an immune response to the graft. However, these anti-donor class I and II responses were not deleterious for the graft. This “active” state of tolerance was reinforced by the observed increase in memory T cells and a preserved anti-donor proliferative T cell response. These data exclude deletion and/or ignorance as mechanisms for tolerance in this model<sup>25 32</sup>.

We show for the first time that tolerance in this model was dominant and transferable over two generations of naïve rat recipients. This tolerance was also donor-specific, since LTS tolerated donor-matched skin allografts (RT1<sup>u</sup>) and rejected third party allografts (RT1<sup>l</sup>). This observation contrasts with results from kidney graft in the same LEW.1W/LEW.1A strain combination following tolerance induction by donor specific transfusion (DST), which is associated with severe chronic rejection lesions on day 10- (*our unpublished data*), and with findings in another strain combination<sup>25</sup>. These data also showed that regulatory T cells alone, despite efficiently inhibiting acute rejection and transferring graft survival prolongation, are not sufficient to protect the graft against chronic rejection<sup>25</sup>. This suggests that a full state of tolerance (i.e. without histological lesions within the graft) likely involves more complex mechanisms. Even in the same strain combination, the mechanisms of

tolerance maintenance and adoptive transfer can drastically differ according to the initial tolerance-inducing regimen.

One of the possible mechanisms (other than deletion or ignorance) that may explain tolerance in this model is immune regulation through potential regulatory T cells<sup>33,34</sup>. Because splenocytes from anti-donor class II-treated LTS consistently transferred tolerance, the role of regulatory T cells was further explored. However, whereas the *ex-vivo* donor-specific response of splenocytes from LTS was inhibited, an MLR performed using pure T cells from LTS as responder cells was unaffected and LTS displayed a normal CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell number. Moreover, in contrast with the majority of protocols used to transfer experimental tolerance to secondary hosts, irradiation of the secondary recipient was not required in this model. This is in agreement with the fact that the classical homeostatic expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells in a secondary recipient where empty space has been made is not required here. Although the main classical marker for regulatory/suppressive CD4<sup>+</sup> T cells is CD25<sup>14-16,35-39</sup>, other markers that do not exclusively overlap with CD25<sup>+</sup> have also been associated with regulation. Indeed, in the rat, CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup> and CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> cells prevent auto-immune diseases such as thyroiditis<sup>40</sup> or diabetes<sup>41,42</sup>. Thus, the increase in CD45RC<sup>low</sup> and CD62L<sup>-</sup> cells found in day 100 LTS could also correspond to an increase in a T cell population with potential regulatory properties different from the conventional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell population. However, the fact that purified T cells were unable to transfer tolerance also goes against this hypothesis. Since in the rat, T cells efficiently transfer long-term graft survival following tolerance induction by DST<sup>25</sup> (and Lair *et al.*, *Submitted*) or, in the same strain combination, by the administration of a desoxyspergualine derivative<sup>22</sup>, the lack of effect of a large number of T cells transferred from anti-donor class II-treated LTS suggests that non-T cells were instrumental in transferring tolerance. However, our data show that adoptive transfer of non-T cells only results in a moderate graft survival prolongation, suggesting that transfer of tolerance requires T / non-T cell cooperation. These data concur with the fact that proliferation of donor-reactive T cells from LTS in MLR was also inhibited by the presence of non-T cells. Because indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO), a tryptophan catabolizing enzyme, is expressed in non-T cells<sup>20 21 18</sup> and displays natural immunomodulatory properties in pregnancy<sup>43,44</sup> and following transplantation<sup>45,46</sup>, we investigated whether the IDO pathway could be involved in tolerance in this model. Tolerated kidney grafts from LTS displayed 8 fold more IDO transcripts than syngeneic grafts and normal kidneys. In parallel, *in vitro*, a specific IDO antagonist partially restored the

proliferative anti-donor response of splenocytes from LTS. The downstream mechanisms of this enzyme, which are still not well known; not only include direct effects on T cells, mediated by tryptophan and its metabolites, but also indirect effects on non-T cells (antigen presenting cells)<sup>21,47</sup>. Interestingly, IDO blockade also increased the proliferation of naïve responding cells in MLR, suggesting that it may exert a “natural” immunosuppressive effect. This is in accordance with previous studies showing that T cells have a specific regulatory checkpoint within their cell cycle that is sensitive to the level of free tryptophan<sup>48</sup>. Based on this observation and our findings, we hypothesize that IDO produced by non-T cells may contribute to suppressing the T cell alloresponse by reducing tryptophan concentration via a natural mechanism that is intensified in tolerant recipients. Our data also suggest that a similar IDO pathway may be involved both in the maintenance and the transfer of tolerance, since IDO was over-expressed in kidney grafts from LTS and also influenced the proliferation of tolerant splenocytes (the cells which transfer tolerance) *in vitro*. However, the spleens from LTS did not display higher levels of IDO transcripts and splenectomy did not brake tolerance in day 100 LTS indicating that splenocytes are not solely responsible for tolerance. Nevertheless, splenocytes are sufficient to “educate” naïve host T cells through adoptive transfer and to induce a dominant regulation.

The nature of the non-T cells involved in maintaining and transferring tolerance in this model is beyond the scope of this paper and remains to be established. The role of NK/NKT and dendritic cells is particularly difficult to establish in rats due to the lack of reliable markers. The 3.2.3 antibody (NKR1P1) only targets a subset of NK and NKT cells<sup>49</sup> as well as a small subset of dendritic cells<sup>50</sup>. Similarly, the OX62 (anti- $\alpha$ 1 chain-integrin) antibody only targets a subset of dendritic cells, preventing a clear depletion and/or selective administration of these selected populations in this species. Finally, despite IDO being inducible in different non-T cell subsets<sup>47,51</sup>, the fact that the IDO antagonist 1-MT only partially restored the proliferation of splenocytes from LTS strongly suggests that IDO activity is not the only immunoregulatory mechanism involved in this model and that several non-T cell subsets and/or mediators are involved. Moreover, the fact that dominant tolerance in this model is donor-specific also excludes IDO as a unique mechanism. Interestingly, the transfer of non-T cells alone only induced a prolongation of graft survival, suggesting that the transfer of non-T cells is not sufficient to suppress a potent specific T cell response in our model. Several explanations may account for this. The non-T cells transferred (possibly IDO<sup>+</sup>) may not be able to directly interact with a sufficient fraction of antigen-specific T cells. Non-T cells may also only

cooperate with specific T cells from tolerant recipients presenting discrete functional alterations that are lacking in naïve animals. The role for a population of T cells in inducing IDO expression has already been suggested<sup>47,51</sup> and the fact that high intragraft levels of IDO transcripts correlated with a higher T cell infiltrate (C $\beta$ ) may favor this hypothesis as a possible mechanism in our model.

Altogether, these findings show that, even in a given strain combination, the mechanisms responsible for maintaining tolerance drastically differ according to the initial induction regimen. These data show for the first time that, following tolerance induction by anti-donor class II antibody administration, splenocytes transfer tolerance. However, T cells alone do not appear to be instrumental, at least in transferring this state of dominant tolerance. Tolerance and adoptive transfer in this model require a complex cooperation of T and non-T cells, at least partially involving the indoleamine 2, 3-dioxygenase pathway.



**Acknowledgments :** The authors thank J. Ashton-Chess for help in the editing of the manuscript. We also thank Ignacio Anegon for technical advice and Dominique Baeten for reviewing the manuscript.

## Legends

**Table 1:** *Experimental groups.*

**Figure 1:** *Serum from anti-class II-treated LTS inhibits the proliferative response of purified LEW.1A T cells to enriched LEW.1W APC in a dose-dependant manner.*

**Figure 2:** *Anti-donor class II antibodies induce donor specific tolerance.* A) Long-term surviving recipients of a kidney allograft accepted a LEW.1W skin graft but rejected a third party BN skin graft. B) Kidney grafts from anti-donor class II treated LTS displayed no signs of chronic rejection. Long-term survivors conditioned by anti-donor class II antibodies accepted a donor-matched skin graft. Moreover, the kidney of the four LTS tested did not show pathological changes indicative of chronic rejection. Grafts displayed slight local fibrosis and lymphoid infiltration, only moderate acute tubular necrosis and no vascular or glomerular lesions. C) Urine protein/creatinine ratios and blood urea and creatinine were measured in LTS one year post transplantation and compared to normal rats. D) Kidney grafts from LTS (a) display barely detectable levels of IgM and IgG deposition, similar to that observed in syngeneic grafts (b) unlike rejected grafts from untreated recipients harvested on day 7 after transplantation and used as a positive control (c).

**Figure 3:** *Alloantibody responses in LTS:* Diluted (1/10) sera from LTS (n=4) and untreated recipients that had acutely rejected their grafts and had been maintained without undergoing a contralateral nephrectomy (n=3) were analyzed on day 100 post transplantation. Class I (A) and class II (B) reactivity was studied on LEW.1W splenocytes by flow-cytometry. Results are expressed as mean channel fluorescence +/- SEM. NS: non significant.

**Figure 4:** *Anti-donor class II-treated LTS have an increased percentage of CD45RC<sup>low</sup> and CD62L memory/activated T cells but no increase in potentially CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells.* A higher percentage of CD45RC<sup>low</sup> ( $p<0.05$ ) and CD62<sup>-</sup> T cells ( $p<0.05$ ), classically corresponding to memory/activated T cells, was observed both in total (A) and in CD4<sup>+</sup> T cell populations (B) from LTS splenocytes compared to those from normal rats. No significant difference was observed for the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> marker in LTS compared to normal rats.

**Figure 5:** *Kidneys from LTS display a higher level of C $\beta$  and IDO transcript.* A) C $\beta$  transcript levels were measured in kidneys from LTS and compared to those in normal

kidneys and syngeneic grafts 100 days post transplantation. B) Leukocyte infiltration was studied in grafts from LTS and from syngeneic grafts 100 days post transplantation by immunochemistry. C) IDO transcript levels were measured in kidneys from LTS and compared to those in normal kidneys and syngeneic grafts 100 days post transplantation.

**Figure 6:** *Tolerance induced by anti-donor class II administration is dominant.* A) Kidney graft survival in untreated LEW.1A recipients was 11+/-1 days (n=6). Splenocytes ( $8 \cdot 10^7$ ) from LTS (n=12) induced long-term survival of secondary untreated LEW.1W kidney grafts.  $8 \cdot 10^7$  purified T cells from the spleens of LTS had no effect on graft survival prolongation. T cell-depleted splenocytes ( $5$  to  $8 \cdot 10^7$ ) from anti-donor class II-treated LTS (n=6) only moderately prolonged graft survival. B) The kidneys of secondary LTS recipients that had received spleen cells from LTS did not show any pathological changes classically associated with chronic rejection.

**Figure 7:** *Donor-specific proliferative response.* Total spleen cells and purified spleen T cells from naïve LEW.1A rats and LTS were stimulated for 5 days with donor LEW.1W or third party BN APC-enriched populations. A) Spleen cells from LTS displayed a decreased proliferative response to LEW.1W enriched APC in MLR (a) but not to BN-enriched APC (b). B) Purified T cells from LTS proliferated similarly to T cells isolated from naïve recipients when stimulated with donor LEW.1W as well as BN APC. C) Effect of the inhibition of IDO production on the proliferative response of splenocytes from LTS and naïve rats in MLR.

## References

1. Soulillou JP, Blandin F, Günther E, Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984;38:63-67.
2. Bugeon L, Cuturi MC, Hallet MM, Paineau J, Chabannes D, Soulillou JP. Peripheral tolerance of an allograft in adult rats. Characterization by low interleukin-2 and interferon-gamma mRNA levels and by strong accumulation of major histocompatibility complex transcripts in the graft. *Transplantation* 1992;54:219-25.
3. Josien R, Heslan M, Brouard S, Soulillou JP, Cuturi MC. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998;92:4539-44.
4. Madsen JC, Superina RA, Wood KJ, Morris PJ. Immunological unresponsiveness induced by recipients cells transfected with donor MHC genes. *Nature* 1988;332:161-164.
5. Sayegh MH, Krensky AM. Novel immunotherapeutic strategies using MHC derived peptides. *Kidney Int Suppl* 1996;53:13-20.
6. Sonntag KC, Emery DW, Yasumoto A, et al. Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes. *J Clin Invest* 2001;107:65-71.
7. LeGuern C. Potential role of major histocompatibility complex class II peptides in regulatory tolerance to vascularized grafts. *Transplantation* 2004;77:35-37.
8. Peche H, van Denderen B, Roussel JC, Trinite B, Soulillou JP, MC. C. Presentation of donor major histocompatibility complex class II antigens by dna vaccination prolongs heart allograft survival. *Transplantation* 2004;15;77:733-40.
9. Soulillou JP, Carpenter CB, d'Apice AJ, Strom TB. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J Exp Med* 1976;143:405-21.
10. Gagne K, S. Brouard S, Guillet M, Cuturi M, Soulillou J. TGFb1 And Donor Dendritic Cells Are Common Key Components In DST And Anti-Class II Heart Graft Enhancement, Whereas Tolerance Induction Also Required Inflammatory Cytokines Down-Regulation. *Eur. J. Immunol.* 2001;31:3111-20.
11. Bushell A, Karim M, Kingsley CI, KJ. W. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation.* 2003; 15;76:449-55.
12. Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001;14:399-406.

13. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-8.
14. Stephens LA, Mason D. 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* 2000;165:3105-10.
15. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001;31:1247-54.
16. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.
17. Shevach EM. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 2001;193:41-6.
18. Munn D, Sharma M, Mellor A. Ligation of B7.1/B7.2 by human CD4+T cells triggers indoleamine 2, 3-Dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 2004;172:4100-10.
19. Frumento G, Rtondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara G. Tryptophan derived catabolites are responsible for inhibition of T and NK cell proliferation induced by indoleamine 2, 3 dioxygenase. *J. Exp. Med.* 2002;196:459-68.
20. Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Tone S, Kitano S. IDO is necessary for cytolytic activity of natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* 2004;59:177-82.
21. Fallarino F, Grohmann U, Woo Hwang K, et al. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4:1206-12.
22. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Souillou J, Cuturi M. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol.* 2002;15;168:5058-69.
23. Brouard S, Blancho G, Moreau A, Heslan JM, Cuturi CC, Souillou JP. Long Term Survival of hamster to rat cardiac xenografts in the absence of Th2 shift. *Transplantation* 1998;65:1555-63.
24. Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Drug-free tolerant kidney recipients and patients under minimal immunosuppression present a strong and altered blood T cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2003;In press, 2004.
25. Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003;76:588-96.

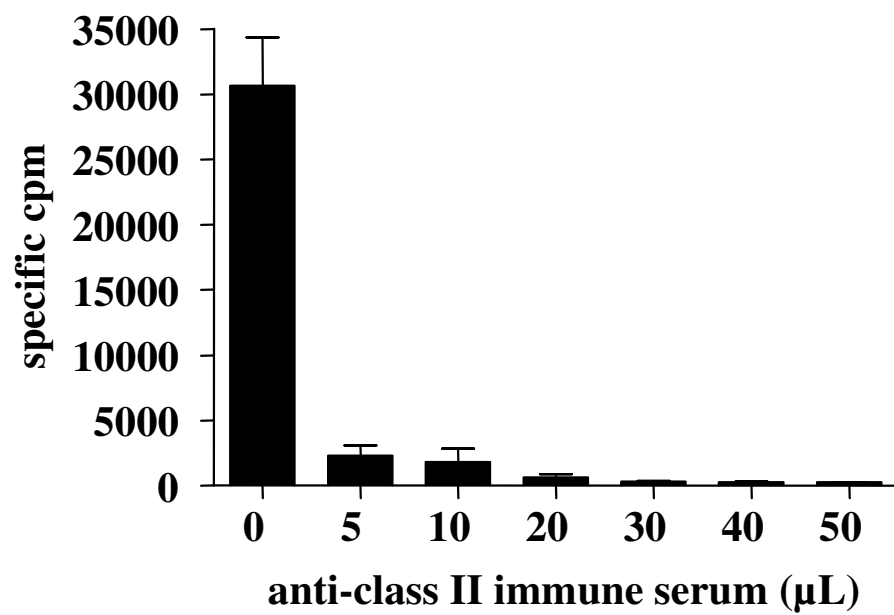
26. Johnson CP, Munda R, Balakrishnan K, Alexander JW. Donor-specific blood transfusions with stored and fresh blood in a rat heart allograft model. *J. Surg. Res.* 1984;36:532-34.
27. Hamelmann E, Wottge HU, Gassmann W, Uharek L, Muller-Ruchholtz W. Induction of tolerance after facilitation of engraftment with a monoclonal antibody anti-MHC class II in MHC fully allogeneic transplantation. *Transplant Proc* 1990;22:23-2341.
28. Abbas AK, Corson JM, Carpenter CB, Galvanek EG, Merrill JP, Dammin GJ. Immunologic enhancement of rat renal allografts. I. Comparative morphology of acutely rejecting and passively enhanced grafts. *Am J Pathol* 1974;75:255-70.
29. Abbas AK, Corson JM, Carpenter CB, Galvanek EG, Merrill JP, Dammin GJ. Immunologic enhancement of rat renal allografts. II. Immunohistology of acutely rejecting and passively enhanced grafts. *Am J Pathol* 1974;75:271-84.
30. Davies DA, Alkins BJ. What abrogates heart transplant rejection in immunological enhancement? *Nature* 1974;247:294-96.
31. Fabre JW, Morris PJ. Passive enhancement of rat renal allografts with only partial cover of the incompatible Ag-B specificities. *Transplantation* 1974;18:436-42.
32. Lehmann M, Graser E, Risch K, et al. Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation* 1997;64:1181-7.
33. Qin S, Cobbold SP, Pope H, et al. Transplantation tolerance. *Science* 1993;259:974-7.
34. Zhai Y, Kupiec-Weglinski JW. What is the role of regulatory T cells in transplantation tolerance? *Curr Opin Immunol* 1999;11:497-503.
35. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-43.
36. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2:301-6.
37. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160:1212-8.
38. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-96.
39. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-90.

40. Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 1999;189:279-88.
41. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* 1993;177:627-36.
42. Seddon B, Saoudi A, Nicholson M, Mason D. CD4+CD8- thymocytes that express L-selectin protect rats from diabetes upon adoptive transfer. *Eur J Immunol* 1996;26:2702-8.
43. Munn D, Zhou M, Attwood JB, I, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281:1191-3.
44. Steckel NK, Kuhn U, Beelen DW, Elmaagacli AH. Indoleamine 2,3-Dioxygenase expression in patients with acute graft versus host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance. *Scand. J. Immunol.* 2003;57:185-191.
45. Pan T, Lin C, Chen C, et al. Identification of the IDO nucleotide sequence in a rat liver transplant model. *Transpl. Immunol.* 2000;8:189-94.
46. Alexander A, Crawford M, Bertera S, et al. IDO expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 2002;51:356-65.
47. Finger E, Bluestone J. When ligand becomes receptor tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat. Immunol.* 2002;3:1056-57.
48. Munn D, shafizadeh E, Attwood J. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 1999;189:1363-72.
49. Brink M, Laverne E, Hiserodt J. In vivo treatment with monoclonal antibody 3.2.3 selectively eliminates natural killer cells in rats. *J. Exp. Med.* 1990;171:197-210.
50. Josien R, Heslan M, Soulillou JP, Cuturi MC. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca<sup>2+</sup>- dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 1997;186:467-72.
51. Mellor A, Munn D. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Immunol.* 2004;4:762-74.

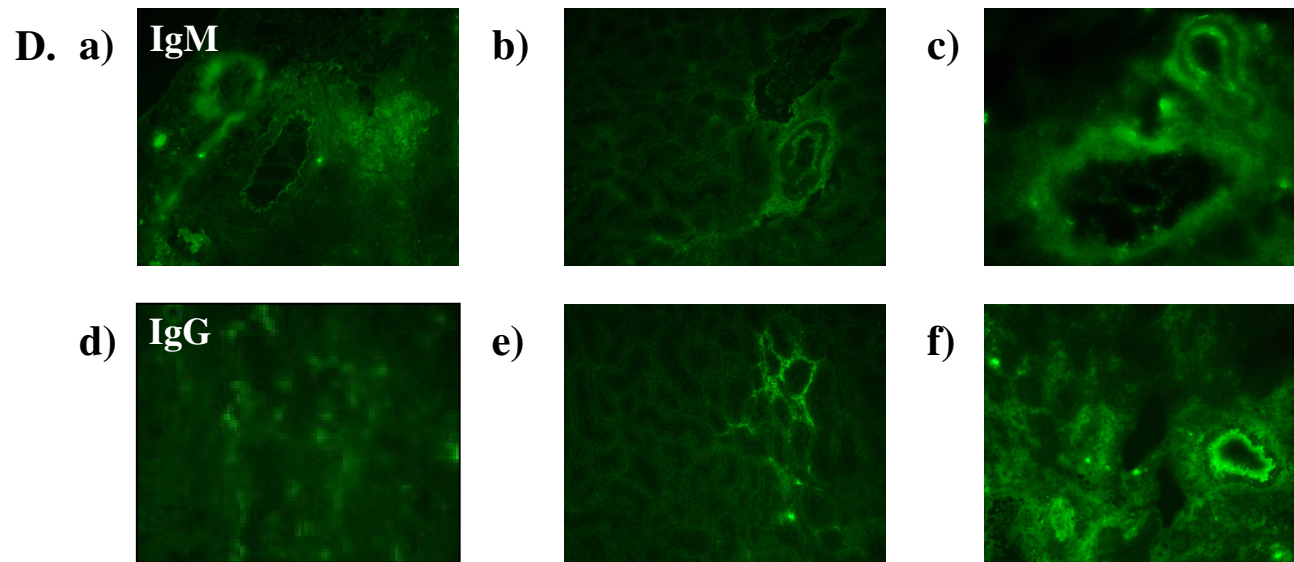
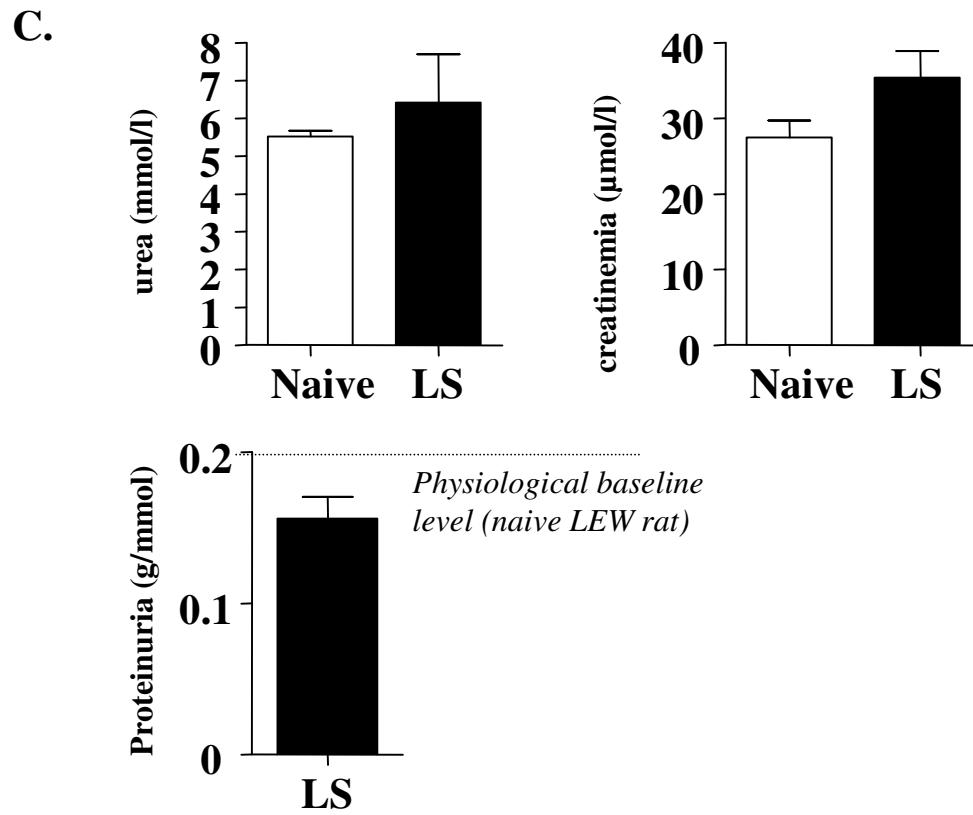
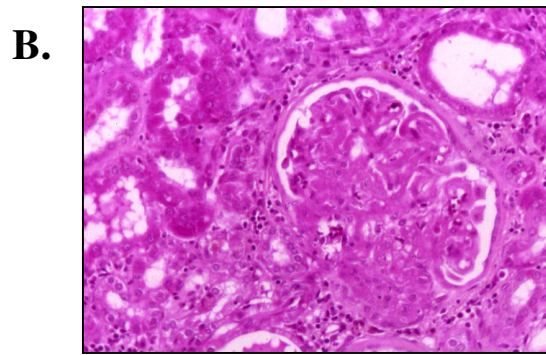
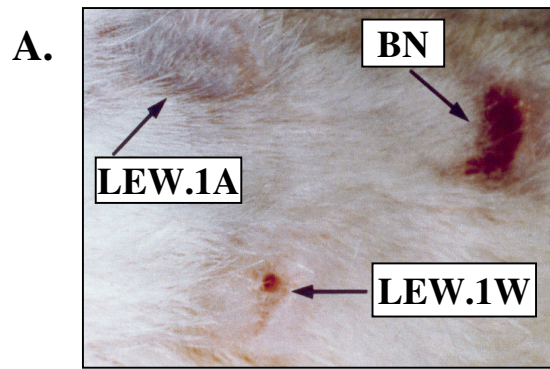
<b>Groups</b>	<b>Treatments</b>	<b>N</b>	<b>Graft survival (day)</b>	<b>p</b>
<b>I</b>	<b>untreated</b>	<b>6</b>	<b>11+/-1</b>	
<b>II</b>	<b>anti-donor class II serum</b>	<b>15</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>III</b>	<b>8.10<sup>7</sup> LTS spleen cells</b>	<b>12</b>	<b>&gt;100</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>IV</b>	<b>8.10<sup>7</sup> LTS spleen T cells</b>	<b>4</b>	<b>10, 11, 11, 11</b>	<b>NS</b>
<b>V</b>	<b>5 to 8.10<sup>7</sup> LTS T depl. splenocytes</b>	<b>6</b>	<b>21, 21, 50, 12,12, 14</b>	<b>NS</b>
<b>VI</b>	<b>8.10<sup>7</sup> normal LEW.1A spleen cells</b>	<b>3</b>	<b>10, 11, 11</b>	<b>NS</b>
<b>VII</b>	<b>8.10<sup>7</sup> LTS PBL</b>	<b>3</b>	<b>10, 11, 11</b>	<b>NS</b>
<b>VIII</b>	<b>8.10<sup>7</sup> normal PBL</b>	<b>3</b>	<b>10, 11, 11</b>	<b>NS</b>
<b>IX</b>	<b>8.10<sup>7</sup> normal LEW.1A depl. T cells</b>	<b>2</b>	<b>11, 11</b>	<b>NS</b>
<b>X</b>	<b>serum from tolerant recipients</b>	<b>3</b>	<b>11, 11, 11</b>	<b>NS</b>

*Table 1*

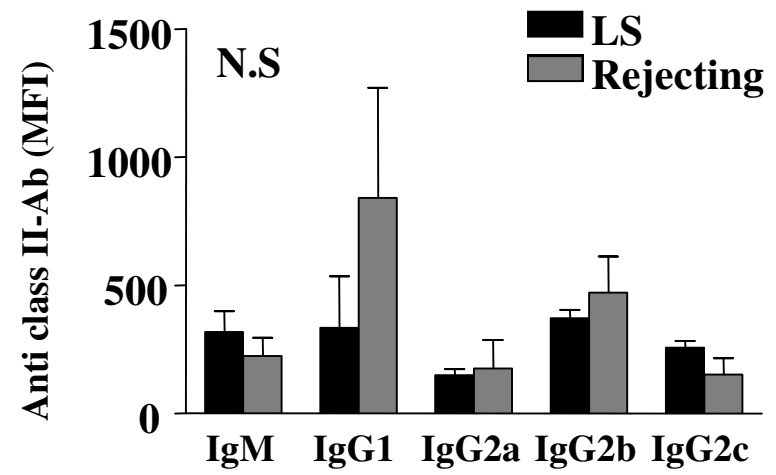
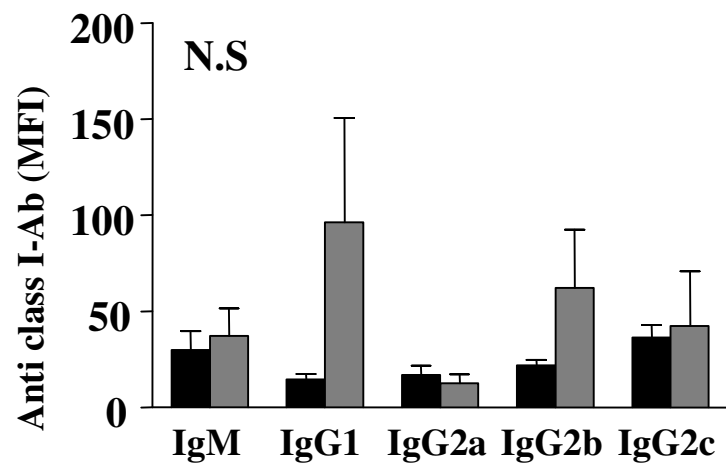




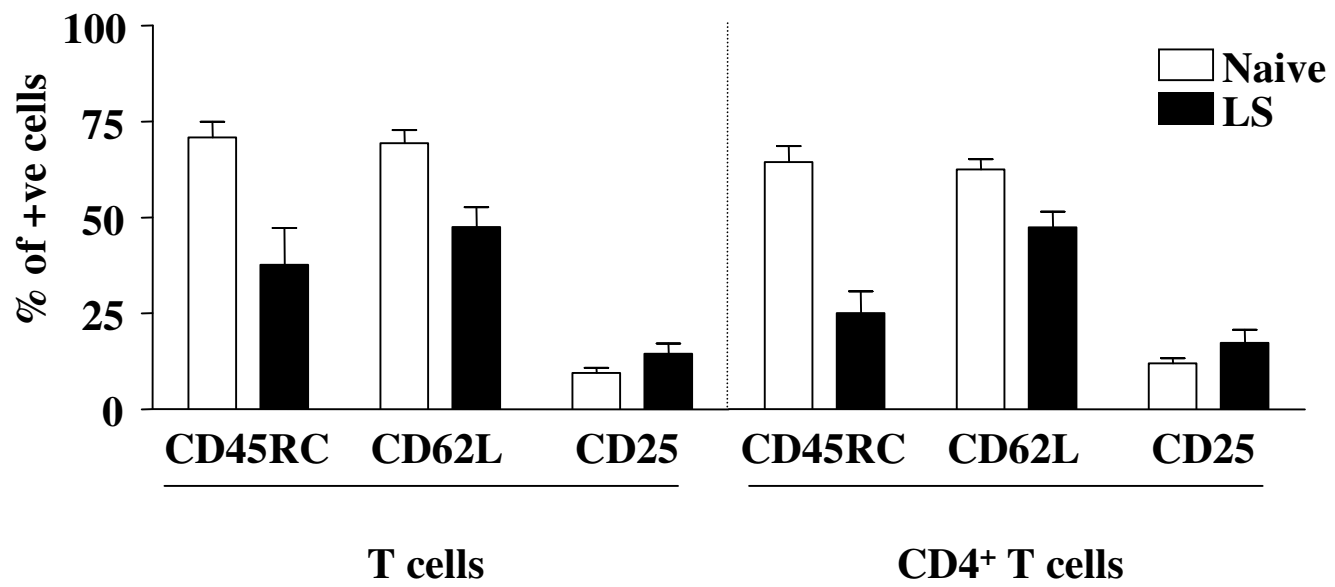
*Figure 1*



*Figure 2*

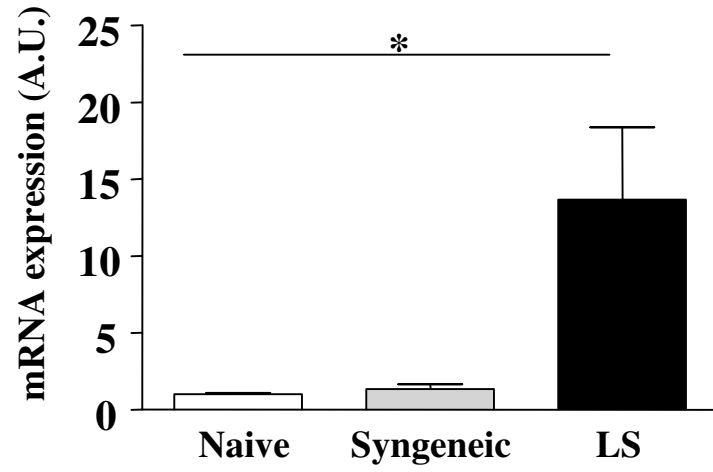


*Figure 3*

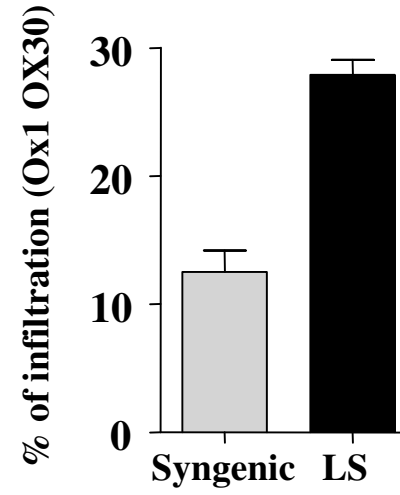


*Figure 4*

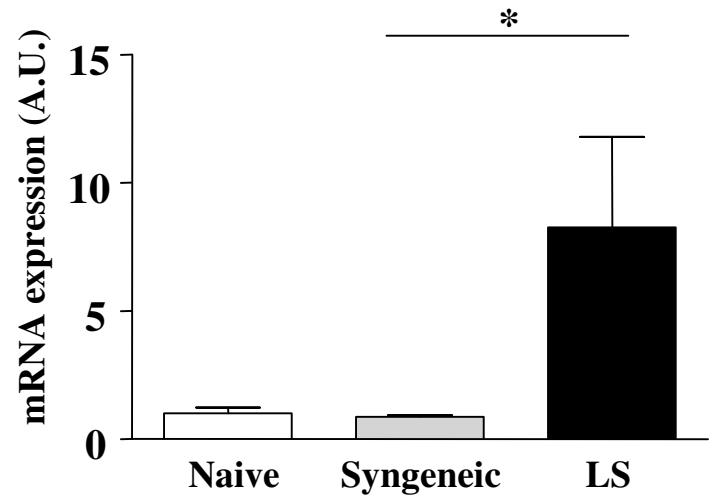
**A.**



**B.**

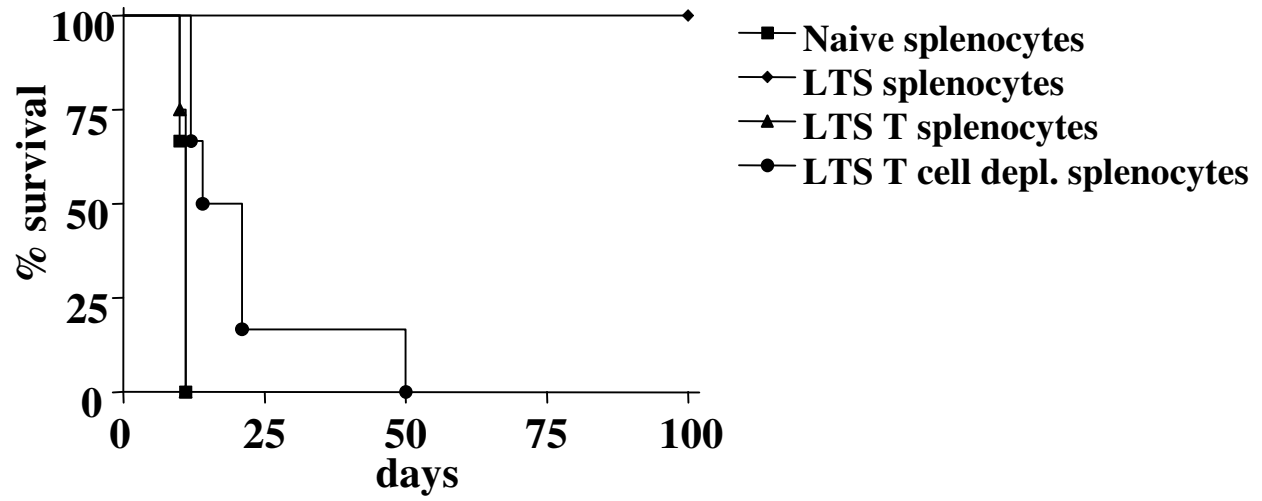


**C.**

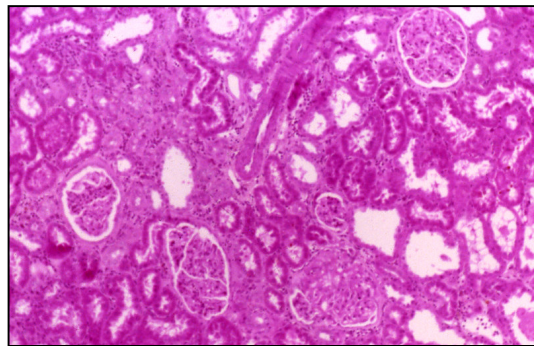


*Figure 5*

**A.**



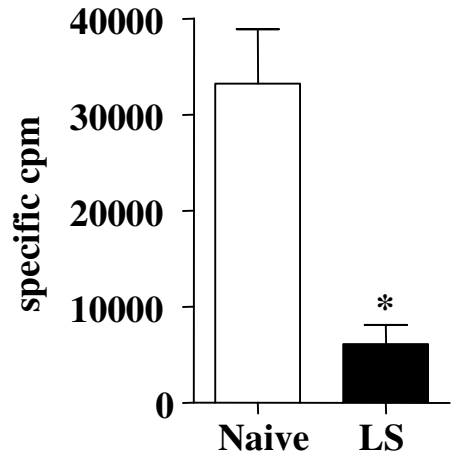
**B.**



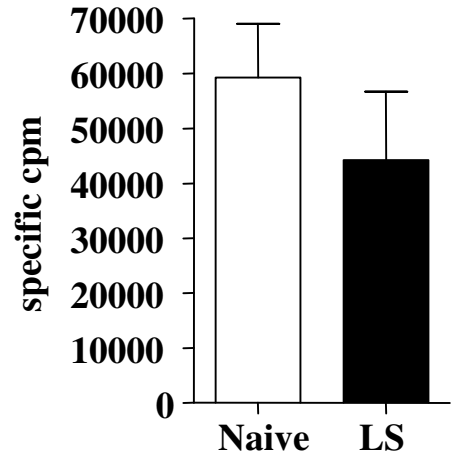
*Figure 6*

**A.**

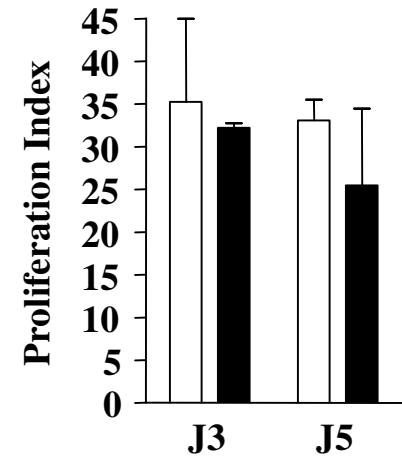
**a)**



**b)**

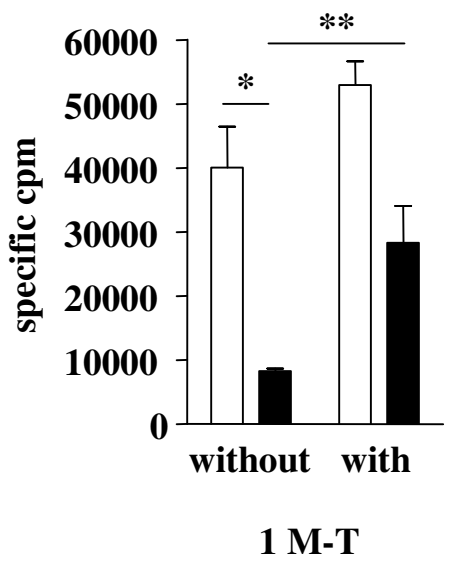


**B.**



- T cells from naive LEW.1A
- T cells from LEW.1A LTS (> day 100)

**C.**



- Splenocytes from naive LEW.1A
- Splenocytes from LEW.1A LTS (> day 100)

*Figure 7*

# Bilbiographie

- Abrams, J. R., M. G. Lebwohl, et al. (1999). "CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris." J Clin Invest **103**(9): 1243-52.
- Acuto, O., S. Mise-Omata, et al. (2003). "Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor." Immunol Rev **192**: 21-31.
- Akbari, O., R. H. DeKruyff, et al. (2001). "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen." Nat Immunol **2**(8): 725-31.
- Alegre, M. L., P. J. Noel, et al. (1996). "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells." J Immunol **157**(11): 4762-70.
- Auchincloss, H., Jr., R. Lee, et al. (1993). "The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3373-7.
- Aukrust, P., J. K. Damas, et al. (2004). "Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation?" J Am Coll Cardiol **43**(12): 2326-8.
- Azuma, M., M. Cayabyab, et al. (1992). "Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line." J Immunol **149**(4): 1115-23.
- Baker, B. M., R. V. Turner, et al. (2001). "Identification of a crucial energetic footprint on the alpha1 helix of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 that provides functional interactions for recognition by tax peptide/HLA-A2-specific T cell receptors." J Exp Med **193**(5): 551-62.
- Bashuda, H., K. Takazawa, et al. (1996). "Induction of persistent allograft tolerance in the rat by combined treatment with anti-leukocyte function-associated antigen-1 and anti-intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibodies, donor-specific transfusion, and FK506." Transplantation **62**(1): 117-22.
- Benichou, G. (1999). "Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection." Front Biosci **4**: D476-80.
- Bentley, G. A., G. Boulot, et al. (1995). "Crystal structure of the beta chain of a T cell antigen receptor." Science **267**(5206): 1984-7.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." J Exp Med **143**(5): 1283-8.
- Billingham, R. E., L. Brent, et al. (1953). "Activity acquired tolerance of foreign cells." Nature **172**(4379): 603-6.
- Bischof, A., J. H. Park, et al. (2000). "Expression of T-cell receptor beta-chain mRNA and protein in gamma/delta T-cells from euthymic and athymic rats: implications for T-cell lineage divergence." Dev Immunol **8**(1): 19-30.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, et al. (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." Nature **329**(6139): 506-12.



- Bjorndahl, J. M., S. S. Sung, et al. (1989). "Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies." Eur J Immunol **19**(5): 881-7.
- Blair, P. J., J. L. Riley, et al. (2000). "CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis." J Exp Med **191**(4): 651-60.
- Blair, P. J., J. L. Riley, et al. (1998). "CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction." J Immunol **160**(1): 12-5.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. (1995). "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." Immunity **3**(1): 87-98.
- Bolton, E. M., J. A. Gracie, et al. (1989). "Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat." J Exp Med **169**(6): 1931-46.
- Boon, L., J. D. Laman, et al. (2002). "Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys." Toxicology **174**(1): 53-65.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brunner, M. C., C. A. Chambers, et al. (1999). "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation." J Immunol **162**(10): 5813-20.
- Buhlmann, J. E., S. K. Elkin, et al. (2003). "A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection." J Immunol **170**(11): 5421-8.
- Burrows, S. R., S. L. Silins, et al. (1997). "Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity." Eur J Immunol **27**(7): 1726-36.
- Carreno, B. M. and M. Collins (2003). "BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand." Trends Immunol **24**(10): 524-7.
- Cepellini, R., P. L. Mattiuz, et al. (1969). "Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combinations." Transplant Proc **1**(1): 385-9.
- Cerny, A., H. Ramseier, et al. (1988). "Unimpaired first-set and second-set skin graft rejection in agammaglobulinemic mice." Transplantation **45**(6): 1111-3.
- Chai, J. G., J. Y. Tsang, et al. (2002). "CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells in vitro." Eur J Immunol **32**(8): 2365-75.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, et al. (2002). "Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4." Nat Immunol **3**(3): 237-43.
- Chatila, T. A. and R. S. Geha (1988). "Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C." J Immunol **140**(12): 4308-14.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Chothia, C., D. R. Boswell, et al. (1988). "The outline structure of the T-cell alpha beta receptor." Embo J **7**(12): 3745-55.

- Cole, M. S., C. Anasetti, et al. (1997). "Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells." J Immunol **159**(7): 3613-21.
- Collette, Y., D. Razanajaona, et al. (1997). "CD28 can promote T cell survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism." Eur J Immunol **27**(12): 3283-9.
- Collins, T., A. J. Korman, 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**(15): 4917-21.
- Colovai, A. I., M. Mirza, et al. (2003). "Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients." Hum Immunol **64**(1): 31-7.
- Corbascio, M., H. Ekstrand, et al. (2002). "CTLA4Ig combined with anti-LFA-1 prolongs cardiac allograft survival indefinitely." Transpl Immunol **10**(1): 55-61.
- Cottrez, F. and H. Groux (2004). "Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells." Transplantation **77**(1 Suppl): S12-5.
- Coupel, S., M. Giral-Classe, et al. (2003). "Ten-year survival of second kidney transplants: impact of immunologic factors and renal function at 12 months." Kidney Int **64**(2): 674-80.
- Cuturi, M. C., R. Josien, et al. (1994). "Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats." Eur J Immunol **24**(7): 1627-31.
- Damle, N. K., L. V. Doyle, et al. (1988). "Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes." J Immunol **140**(6): 1753-61.
- Davis, M. M., J. J. Boniface, et al. (1998). "Ligand recognition by alpha beta T cell receptors." Annu Rev Immunol **16**: 523-44.
- Dengler, T. J., G. Szabo, et al. (1999). "Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation." Transplantation **67**(3): 392-8.
- Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
- Dieckmann, D., H. Plottner, et al. (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." J Exp Med **193**(11): 1303-10.
- Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2002). "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11796-801.
- Dong, V. M., X. Yuan, et al. (2002). "Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection." Transplantation **73**(8): 1310-7.
- Egen, J. G. and J. P. Allison (2002). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength." Immunity **16**(1): 23-35.

- Fairchild, P. J. and H. Waldmann (2000). "Dendritic cells and prospects for transplantation tolerance." Curr Opin Immunol **12**(5): 528-35.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2003). "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells." Nat Immunol **4**(12): 1206-12.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." Cell Death Differ **9**(10): 1069-77.
- Faunce, D. E. and J. Stein-Streilein (2002). "NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8+ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance." J Immunol **169**(1): 31-8.
- Fields, B. A., B. Ober, et al. (1995). "Crystal structure of the V alpha domain of a T cell antigen receptor." Science **270**(5243): 1821-4.
- Finger, E. B. and J. A. Bluestone (2002). "When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs." Nat Immunol **3**(11): 1056-7.
- Fraser, J. D., B. A. Irving, et al. (1991). "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." Science **251**(4991): 313-6.
- Freedman, A. S., G. Freeman, et al. (1987). "B7, a B-cell-restricted antigen that identifies preactivated B cells." J Immunol **139**(10): 3260-7.
- Freedman, B. D., Q. H. Liu, et al. (1999). "Receptor avidity and costimulation specify the intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling pattern in CD4(+)CD8(+) thymocytes." J Exp Med **190**(7): 943-52.
- Freeman, G. J., F. Borriello, et al. (1993). "Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production." J Exp Med **178**(6): 2185-92.
- Frumento, G., R. Rotondo, et al. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." J Exp Med **196**(4): 459-68.
- Fu, F., Y. Li, et al. (1996). "Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients." Transplantation **62**(5): 659-65.
- Fukaura, H., S. C. Kent, et al. (1996). "Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients." J Clin Invest **98**(1): 70-7.
- Garboczi, D. N. and W. E. Biddison (1999). "Shapes of MHC restriction." Immunity **10**(1): 1-7.
- Garcia, K. C., M. Degano, et al. (1998). "Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen." Science **279**(5354): 1166-72.
- Garcia, K. C., L. Teyton, et al. (1999). "Structural basis of T cell recognition." Annu Rev Immunol **17**: 369-97.
- Genden, E. M., S. E. Mackinnon, et al. (1998). "Induction of donor-specific tolerance to rat nerve allografts with portal venous donor alloantigen and anti-ICAM-1/LFA-1 monoclonal antibodies." Surgery **124**(2): 448-56.
- Gershon, R. K. (1975). "A disquisition on suppressor T cells." Transplant Rev **26**: 170-85.

- Gonzales, D. M., L. Fu, et al. (2004). "Coronavirus-induced demyelination occurs in the absence of CD28 costimulatory signals." *J Neuroimmunol* **146**(1-2): 140-3.
- Graca, L., S. Thompson, et al. (2002). "Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance." *J Immunol* **168**(11): 5558-65.
- Grakoui, A., S. K. Bromley, et al. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* **285**(5425): 221-7.
- Gramaglia, I., D. Cooper, et al. (2000). "Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand." *Eur J Immunol* **30**(2): 392-402.
- Gramaglia, I., A. Jember, et al. (2000). "The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion." *J Immunol* **165**(6): 3043-50.
- Gravestain, L. A., D. Amsen, et al. (1998). "The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2." *Eur J Immunol* **28**(7): 2208-16.
- Grohmann, U., C. Orabona, et al. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." *Nat Immunol* **3**(11): 1097-101.
- Gross, J. A., E. Callas, et al. (1992). "Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse." *J Immunol* **149**(2): 380-8.
- Groux, H., N. Fournier, et al. (2004). "Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells." *Semin Immunol* **16**(2): 99-106.
- Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). "A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis." *Nature* **389**(6652): 737-42.
- Guillonnet, C., C. Louvet, et al. (2004). "The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection." *J Immunol* **172**(3): 1619-29.
- Guillot, C., C. Guillonnet, et al. (2002). "Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection." *J Immunol* **168**(4): 1600-9.
- Guillot, C., S. Menoret, et al. (2003). "Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig." *Blood* **101**(8): 3325-33.
- Guntermann, C. and D. R. Alexander (2002). "CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases." *J Immunol* **168**(9): 4420-9.
- Guo, L., M. Fujino, et al. (2003). "Simultaneous blockade of co-stimulatory signals, CD28 and ICOS, induced a stable tolerance in rat heart transplantation." *Transpl Immunol* **12**(1): 41-8.
- Ha, J., A. W. Bingaman, et al. (2001). "Aggressive skin allograft rejection in CD28-/- mice independent of the CD40/CD40L costimulatory pathway." *Transpl Immunol* **9**(1): 13-7.
- Habiro, K., M. Kotani, et al. (2003). "Mechanism of allorecognition and skin graft rejection in CD28 and CD40 ligand double-deficient mice." *Transplantation* **76**(5): 854-8.

- Haspot, F., F. Villemain, et al. (2002). "Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses." *Blood* **99**(6): 2228-34.
- Hennecke, J. and D. C. Wiley (2002). "Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA\*0101 and DRB1\*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity." *J Exp Med* **195**(5): 571-81.
- Hirao, M., N. Onai, et al. (2000). "CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes." *Cancer Res* **60**(8): 2209-17.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Housset, D. and B. Malissen (2003). "What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity?" *Trends Immunol* **24**(8): 429-37.
- Huang, A. Y., P. Golumbek, et al. (1994). "Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens." *Science* **264**(5161): 961-5.
- Huang, J., P. F. Lo, et al. (2002). "CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(14): 9369-73.
- Hurwitz, A. A., T. J. Sullivan, et al. (1997). "Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **73**(1-2): 57-62.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." *Nature* **397**(6716): 263-6.
- Iida, T., H. Ohno, et al. (2000). "Regulation of cell surface expression of CTLA-4 by secretion of CTLA-4-containing lysosomes upon activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **165**(9): 5062-8.
- Isobe, M., J. Suzuki, et al. (1997). "Assessment of tolerance induction to cardiac allograft by anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies." *J Heart Lung Transplant* **16**(11): 1149-56.
- Ito, H., J. Kurtz, et al. (2001). "CD4 T cell-mediated alloresistance to fully MHC-mismatched allogeneic bone marrow engraftment is dependent on CD40-CD40 ligand interactions, and lasting T cell tolerance is induced by bone marrow transplantation with initial blockade of this pathway." *J Immunol* **166**(5): 2970-81.
- Jankovic, V., K. Remus, et al. (2002). "T Cell Recognition of an Engineered MHC Class I Molecule: Implications for Peptide-Independent Alloreactivity." *J Immunol* **169**(4): 1887-1892.
- Jenkins, M. K., D. M. Pardoll, et al. (1987). "T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state." *Immunol Rev* **95**: 113-35.
- Jenkins, M. K. and R. H. Schwartz (1987). "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo." *J Exp Med* **165**(2): 302-19.
- Jin, Y., Q. Zhang, et al. (2003). "Simultaneous administration of a low-dose mixture of donor bone marrow cells and splenocytes plus adenovirus containing the CTLA4Ig gene

- result in stable mixed chimerism and long-term survival of cardiac allograft in rats." Immunology **110**(2): 275-86.
- Jones, R. G., M. Parsons, et al. (2000). "Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo." J Exp Med **191**(10): 1721-34.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.
- Jordan, M. S., A. Boesteanu, et al. (2001). "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol **2**(4): 301-6.
- Judge, T. A., Z. Wu, et al. (1999). "The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival." J Immunol **162**(4): 1947-51.
- Kane, L. P., J. Lin, et al. (2002). "It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation." Trends Immunol **23**(8): 413-20.
- Kawai, K., A. Shahinian, et al. (1996). "Skin allograft rejection in CD28-deficient mice." Transplantation **61**(3): 352-5.
- Kirchhoff, S., W. W. Muller, et al. (2000). "Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells." Eur J Immunol **30**(10): 2765-74.
- Kirk, A. D., L. C. Burkly, et al. (1999). "Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates." Nat Med **5**(6): 686-93.
- Kishimoto, H. and J. Sprent (1999). "Strong TCR ligation without costimulation causes rapid onset of Fas-dependent apoptosis of naive murine CD4+ T cells." J Immunol **163**(4): 1817-26.
- Kosuge, H., J. Suzuki, et al. (2003). "Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible co-stimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway." Transplantation **75**(8): 1374-9.
- Kranz, D. M., D. H. Sherman, et al. (1984). "Immunoprecipitation of cell surface structures of cloned cytotoxic T lymphocytes by clone-specific antisera." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(2): 573-7.
- Kreisel, D., A. S. Krupnick, et al. (2002). "Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition." Nat Med **8**(3): 233-9.
- Krieger, N. R., D. P. Yin, et al. (1996). "CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorecognition." J Exp Med **184**(5): 2013-8.
- Kuniyasu, Y., T. Takahashi, et al. (2000). "Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation." Int Immunol **12**(8): 1145-55.

- Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1996). "Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo." J Exp Med **184**(3): 923-30.
- Lakkis, F. G., A. Arakelov, et al. (2000). "Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue." Nat Med **6**(6): 686-8.
- Larsen, C. P., P. J. Morris, et al. (1990). "Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection." J Exp Med **171**(1): 307-14.
- LaSalle, J. M. and D. A. Hafler (1994). "T cell anergy." Faseb J **8**(9): 601-8.
- Laskowski, I. A., J. Pratschke, et al. (2002). "Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats." J Am Soc Nephrol **13**(2): 519-27.
- Lee, P. U., H. R. Churchill, et al. (2000). "Role of 2CT cell receptor residues in the binding of self- and allo-major histocompatibility complexes." J Exp Med **191**(8): 1355-64.
- Leung, H. T., J. Bradshaw, et al. (1995). "Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail." J Biol Chem **270**(42): 25107-14.
- Levings, M. K., R. Bacchetta, et al. (2002). "The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells." Int Arch Allergy Immunol **129**(4): 263-76.
- Li, J., Z. Liu, et al. (1999). "T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC." J Immunol **163**(12): 6386-92.
- Li, S., M. Thanikachalam, et al. (2001). "A clinically relevant CTLA4-Ig-based regimen induces chimerism and tolerance to heart grafts." Ann Thorac Surg **72**(4): 1306-10.
- Lin, R. H., Y. W. Hwang, et al. (1997). "TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation." J Immunol **158**(2): 598-603.
- Linsley, P. S., W. Brady, et al. (1991). "CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7." J Exp Med **174**(3): 561-9.
- Linsley, P. S., E. A. Clark, 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**(13): 5031-5.
- Linsley, P. S., P. M. Wallace, et al. (1992). "Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule." Science **257**(5071): 792-5.
- Liu, Z., Y. K. Sun, et al. (1993). "Contribution of direct and indirect recognition pathways to T cell alloreactivity." J Exp Med **177**(6): 1643-50.
- Liu, Z., S. Tugulea, et al. (1998). "Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells." Int Immunol **10**(6): 775-83.
- Luhder, F., Y. Huang, et al. (2003). "Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists." J Exp Med **197**(8): 955-66.
- Lutz, M. B., R. M. Suri, et al. (2000). "Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo." Eur J Immunol **30**(7): 1813-22.

- Luz, J. G., M. Huang, et al. (2002). "Structural comparison of allogeneic and syngeneic T cell receptor-peptide-major histocompatibility complex complexes: a buried alloreactive mutation subtly alters peptide presentation substantially increasing V(beta) Interactions." J Exp Med **195**(9): 1175-86.
- Mackler, A. M., E. M. Barber, et al. (2003). "Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **170**(2): 823-30.
- Madden, D. R. (1995). "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes." Annu Rev Immunol **13**: 587-622.
- Mandelbrot, D. A., A. J. McAdam, et al. (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." J Exp Med **189**(2): 435-40.
- Mandelbrot, D. A., M. A. Oosterwegel, et al. (2001). "B7-dependent T-cell costimulation in mice lacking CD28 and CTLA4." J Clin Invest **107**(7): 881-7.
- Manning, T. C., C. J. Schlueter, et al. (1998). "Alanine scanning mutagenesis of an alphabeta T cell receptor: mapping the energy of antigen recognition." Immunity **8**(4): 413-25.
- Marder, B. A., B. Schroppe, et al. (2003). "The impact of costimulatory molecule gene polymorphisms on clinical outcomes in liver transplantation." Am J Transplant **3**(4): 424-31.
- Martin, M., H. Schneider, et al. (2001). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function." J Exp Med **194**(11): 1675-81.
- Matthews, J. B., E. Ramos, et al. (2003). "Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress." Am J Transplant **3**(7): 794-803.
- Matzinger, P. and M. J. Bevan (1977). "Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens?" Cell Immunol **29**(1): 1-5.
- Mellor, A. L., B. Baban, et al. (2003). "Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion." J Immunol **171**(4): 1652-5.
- Mellor, A. L., P. Chandler, et al. (2002). "Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy." J Reprod Immunol **57**(1-2): 143-50.
- Mellor, A. L., D. B. Keskin, et al. (2002). "Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses." J Immunol **168**(8): 3771-6.
- Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "Ido expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.
- Miyawaki, S., Y. Nakamura, et al. (1994). "A new mutation, aly, that induces a generalized lack of lymph nodes accompanied by immunodeficiency in mice." Eur J Immunol **24**(2): 429-34.
- Moreland, L. W., R. Alten, et al. (2002). "Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion." Arthritis Rheum **46**(6): 1470-9.



- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2004). "Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells." J Immunol **172**(7): 4100-10.
- Nakamura, T., K. H. Sonoda, et al. (2003). "CD4+ NKT cells, but not conventional CD4+ T cells, are required to generate efferent CD8+ T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site." J Immunol **171**(3): 1266-71.
- Nicolls, M. R., M. Coulombe, et al. (2002). "CD4-dependent generation of dominant transplantation tolerance induced by simultaneous perturbation of CD154 and LFA-1 pathways." J Immunol **169**(9): 4831-9.
- Noel, P. J., M. L. Alegre, et al. (1998). "Impaired negative selection in CD28-deficient mice." Cell Immunol **187**(2): 131-8.
- Noel, P. J., L. H. Boise, et al. (1996). "CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation." J Immunol **157**(2): 636-42.
- Nomura, M., K. Yamashita, et al. (2002). "Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation." Transplantation **73**(9): 1403-10.
- Nouri-Shirazi, M. and E. Guinet (2002). "Direct and indirect cross-tolerance of alloreactive T cells by dendritic cells retained in the immature stage." Transplantation **74**(7): 1035-44.
- Nunes, J., S. Klasen, 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**(3): 311-5.
- Olsson, C., K. Riesbeck, et al. (1999). "CTLA-4 ligation suppresses CD28-induced NF-kappaB and AP-1 activity in mouse T cell blasts." J Biol Chem **274**(20): 14400-5.
- Otto, C., S. Feuerlein, et al. (2002). "Investigation of the immunosuppressive potential of anti-CD28 antibodies for selective inhibition of the T-cell mediated alloresponse." Transplant Proc **34**(6): 2376.
- Pantenburg, B., F. Heinzl, et al. (2002). "T cells primed by Leishmania major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection." J Immunol **169**(7): 3686-93.
- Pentcheva-Hoang, T., J. G. Egen, et al. (2004). "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." Immunity **21**(3): 401-13.
- Perrin, P. J., C. H. June, 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**(3): 1704-10.
- Perrin, P. J., D. Scott, et al. (1996). "Opposing effects of CTLA4-Ig and anti-CD80 (B7-1) plus anti-CD86 (B7-2) on experimental allergic encephalomyelitis." J Neuroimmunol **65**(1): 31-9.
- Pietra, B. A., A. Wiseman, et al. (2000). "CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II." J Clin Invest **106**(8): 1003-10.
- Pioli, C., L. Gatta, et al. (1999). "Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) inhibits CD28-induced IkappaBalpha degradation and RelA activation." Eur J Immunol **29**(3): 856-63.

- Pistillo, M. P., P. L. Tazzari, et al. (2003). "CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells." Blood **101**(1): 202-9.
- Plas, D. R., R. Johnson, et al. (1996). "Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling." Science **272**(5265): 1173-6.
- Platt, J. L. (2000). "Acute vascular rejection." Transplant Proc **32**(5): 839-40.
- Pober, J. S. and R. S. Cotran (1990). "Cytokines and endothelial cell biology." Physiol Rev **70**(2): 427-51.
- Pober, J. S., C. G. Orosz, et al. (1996). "Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response?" Transplantation **61**(3): 343-9.
- Pollok, K. E., Y. J. Kim, et al. (1993). "Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function." J Immunol **150**(3): 771-81.
- Popov, I. A., E. V. Fedoseyeva, et al. (1995). "Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation." Transplantation **60**(12): 1621-4.
- Qin, S., S. P. Cobbold, et al. (1993). "'Infectious' transplantation tolerance." Science **259**(5097): 974-7.
- Racke, M. K., D. E. Scott, et al. (1995). "Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis." J Clin Invest **96**(5): 2195-203.
- Reinherz, E. L., K. Tan, et al. (1999). "The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II." Science **286**(5446): 1913-21.
- Reiser, J. B., C. Darnault, et al. (2003). "CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition." Nat Immunol **4**(3): 241-7.
- Rincon, M. and R. A. Flavell (1994). "AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes." Embo J **13**(18): 4370-81.
- Roberts, C. W., J. R. Shutter, et al. (1994). "Hox11 controls the genesis of the spleen." Nature **368**(6473): 747-9.
- Rothstein, D. M., M. F. Livak, et al. (2001). "Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models." J Immunol **166**(1): 322-9.
- Rothstein, D. M. and M. H. Sayegh (2003). "T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance." Immunol Rev **196**: 85-108.
- Rudd, C. E. and H. Schneider (2003). "Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling." Nat Rev Immunol **3**(7): 544-56.
- Rudolph, M. G. and I. A. Wilson (2002). "The specificity of TCR/pMHC interaction." Curr Opin Immunol **14**(1): 52-65.
- Saadi, S., R. A. Holzknecht, et al. (1995). "Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium." J Exp Med **182**(6): 1807-14.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single

- mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Sayegh, M. H., E. Akalin, et al. (1995). "CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2." J Exp Med **181**(5): 1869-74.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Scheipers, P. and H. Reiser (1998). "Fas-independent death of activated CD4(+) T lymphocytes induced by CTLA-4 crosslinking." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10083-8.
- Schmidt, J., K. Elflein, et al. (2003). "Treatment and prevention of experimental autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibodies." J Neuroimmunol **140**(1-2): 143-52.
- Sebille, F., S. Brouard, et al. (2003). "Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation." Transplantation **75**(2): 169-72.
- Sebille, F., K. Gagne, et al. (2001). "Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilizes specific Vbeta families without skewing of the complementarity-determining region 3 length distribution." J Immunol **167**(6): 3082-8.
- Seung, E., N. Iwakoshi, et al. (2000). "Allogeneic hematopoietic chimerism in mice treated with sublethal myeloablation and anti-CD154 antibody: absence of graft-versus-host disease, induction of skin allograft tolerance, and prevention of recurrent autoimmunity in islet-allografted NOD/Lt mice." Blood **95**(6): 2175-82.
- Sha, W. C., C. A. Nelson, et al. (1988). "Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice." Nature **336**(6194): 73-6.
- Shahinian, A., K. Pfeffer, et al. (1993). "Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice." Science **261**(5121): 609-12.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-26.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." Nat Immunol **3**(2): 135-42.
- Shiraishi, T., Y. Yasunami, et al. (2002). "Prevention of acute lung allograft rejection in rat by CTLA4Ig." Am J Transplant **2**(3): 223-8.
- Shirwan, H. (1999). "Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role?" Transplantation **68**(6): 715-26.
- Shuford, W. W., K. Klussman, et al. (1997). "4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses." J Exp Med **186**(1): 47-55.
- Sigal, L. J., S. Crotty, et al. (1999). "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen." Nature **398**(6722): 77-80.

- Silver, P. B., K. S. Hathcock, et al. (2000). "Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance." *J Immunol* **165**(9): 5041-7.
- Simpson, E., D. Scott, et al. (2002). "Minor H antigens: genes and peptides." *Transpl Immunol* **10**(2-3): 115-23.
- Smith, P. A., A. Brunmark, et al. (1997). "Peptide-independent recognition by alloreactive cytotoxic T lymphocytes (CTL)." *J Exp Med* **185**(6): 1023-33.
- Sonoda, K. H., M. Taniguchi, et al. (2002). "Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells." *J Immunol* **168**(4): 2028-34.
- Stamper, C. C., Y. Zhang, et al. (2001). "Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses." *Nature* **410**(6828): 608-11.
- Stassen, M., S. Fondel, et al. (2004). "Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells." *Eur J Immunol* **34**(5): 1303-11.
- Stassen, M., H. Jonuleit, et al. (2004). "Differential regulatory capacity of CD25+ T regulatory cells and preactivated CD25+ T regulatory cells on development, functional activation, and proliferation of Th2 cells." *J Immunol* **173**(1): 267-74.
- Stassen, M., E. Schmitt, et al. (2004). "Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance." *Transplantation* **77**(1 Suppl): S23-5.
- Steele, D. J., T. M. Laufer, et al. (1996). "Two levels of help for B cell alloantibody production." *J Exp Med* **183**(2): 699-703.
- Stephens, L. A. and D. Mason (2000). "CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations." *J Immunol* **165**(6): 3105-10.
- Stuber, E., M. Neurath, et al. (1995). "Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells." *Immunity* **2**(5): 507-21.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, et al. (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." *J Immunol* **166**(2): 973-81.
- Suresh, M., J. K. Whitmire, et al. (2001). "Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory." *J Immunol* **167**(10): 5565-73.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* **160**(3): 1212-8.
- Szot, G. L., P. Zhou, et al. (2001). "Different mechanisms of cardiac allograft rejection in wildtype and CD28-deficient mice." *Am J Transplant* **1**(1): 38-46.
- Tacke, M., G. J. Clark, et al. (1995). "Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester." *J Immunol* **154**(10): 5121-7.
- Tacke, M., G. Hanke, 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**(1): 239-47.

- Tada, Y., K. Nagasawa, et al. (1999). "CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis." J Immunol **162**(1): 203-8.
- Takahashi, C., R. S. Mittler, et al. (1999). "Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal." J Immunol **162**(9): 5037-40.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-10.
- Takeda, K., H. Oshima, et al. (2000). "CD27-mediated activation of murine NK cells." J Immunol **164**(4): 1741-5.
- Tallquist, M. D., T. J. Yun, et al. (1996). "A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity." J Exp Med **184**(3): 1017-26.
- Tarazona, R., F. Borrego, et al. (2002). "Inhibition of CD28-mediated natural cytotoxicity by KIR2DL2 does not require p56(lck) in the NK cell line YT-Indy." Mol Immunol **38**(7): 495-503.
- Teh, H. S. and S. J. Teh (2001). "The affinity/avidity and length of exposure to the deleting ligand determine dependence on CD28 for the efficient deletion of self-specific CD4+CD8+ thymocytes." Cell Immunol **207**(2): 100-9.
- Tellander, A. C., U. Pettersson, et al. (2001). "Interference with CD28, CD80, CD86 or CD152 in collagen-induced arthritis. Limited role of IFN-gamma in anti-B7-mediated suppression of disease." J Autoimmun **17**(1): 39-50.
- Teng, M. K., A. Smolyar, et al. (1998). "Identification of a common docking topology with substantial variation among different TCR-peptide-MHC complexes." Curr Biol **8**(7): 409-12.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-90.
- Tivol, E. A., F. Borriello, et al. (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-7.
- Tomita, Y., A. Khan, et al. (1994). "Role of intrathymic clonal deletion and peripheral anergy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen." J Immunol **153**(3): 1087-98.
- Turka, L. A., P. S. Linsley, 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**(22): 11102-5.
- van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, et al. (1997). "CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics." J Exp Med **185**(3): 393-403.
- van der Merwe, P. A. and S. J. Davis (2003). "Molecular interactions mediating T cell antigen recognition." Annu Rev Immunol **21**: 659-84.
- van Essen, D., H. Kikutani, et al. (1995). "CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function." Nature **378**(6557): 620-3.
- van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). "CD40-CD40 ligand." J Leukoc Biol **67**(1): 2-17.
- Vandenberghe, P., J. Delabie, et al. (1993). "In situ expression of B7/BB1 on antigen-presenting cells and activated B cells: an immunohistochemical study." Int Immunol **5**(3): 317-21.

- Vanhove, B., G. Laflamme, et al. (2003). "Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody." Blood **102**(2): 564-70.
- Venuprasad, K., P. Parab, et al. (2001). "Immunobiology of CD28 expression on human neutrophils. I. CD28 regulates neutrophil migration by modulating CXCR-1 expression." Eur J Immunol **31**(5): 1536-43.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." Science **273**(5271): 104-6.
- Wallace, P. M., J. S. Johnson, et al. (1994). "CTLA4Ig treatment ameliorates the lethality of murine graft-versus-host disease across major histocompatibility complex barriers." Transplantation **58**(5): 602-10.
- Wallace, P. M., J. N. Rodgers, et al. (1995). "Induction and reversal of long-lived specific unresponsiveness to a T-dependent antigen following CTLA4Ig treatment." J Immunol **154**(11): 5885-95.
- Walunas, T. L., A. I. Sperling, et al. (1996). "CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance." J Immunol **156**(3): 1006-13.
- Wang, Q., M. Zhang, et al. (2003). "Anti-ICAM-1 antibody and CTLA-4Ig synergistically enhance immature dendritic cells to induce donor-specific immune tolerance in vivo." Immunol Lett **90**(1): 33-42.
- Waterhouse, P., J. M. Penninger, et al. (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4." Science **270**(5238): 985-8.
- Weinberg, A. D., A. T. Vella, et al. (1998). "OX-40: life beyond the effector T cell stage." Semin Immunol **10**(6): 471-80.
- Weiner, H. L. (2001). "Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells." Microbes Infect **3**(11): 947-54.
- Weiser, M. R., J. P. Williams, et al. (1996). "Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement." J Exp Med **183**(5): 2343-8.
- Weiss, A. and D. R. Littman (1994). "Signal transduction by lymphocyte antigen receptors." Cell **76**(2): 263-74.
- Wetzel, S. A., T. W. McKeithan, et al. (2002). "Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation." J Immunol **169**(11): 6092-101.
- Whitelegg, A. and L. D. Barber (2004). "The structural basis of T-cell allorecognition." Tissue Antigens **63**(2): 101-8.
- Woerly, G., N. Roger, et al. (1999). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." J Exp Med **190**(4): 487-95.
- Wu, Y., Q. Zhou, et al. (1998). "CD28-independent induction of T helper cells and immunoglobulin class switches requires costimulation by the heat-stable antigen." J Exp Med **187**(7): 1151-6.
- Wulfig, C. and M. M. Davis (1998). "A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation." Science **282**(5397): 2266-9.
- Wulfig, C., C. Sumen, et al. (2002). "Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition." Nat Immunol **3**(1): 42-7.

- Yu, X. Z., M. H. Albert, et al. (2004). "CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens." J Clin Invest **113**(11): 1624-30.
- Yu, X. Z., S. J. Bidwell, et al. (2000). "CD28-specific antibody prevents graft-versus-host disease in mice." J Immunol **164**(9): 4564-8.
- Yu, X. Z., P. J. Martin, et al. (2003). "CD28 signal enhances apoptosis of CD8 T cells after strong TCR ligation." J Immunol **170**(6): 3002-6.
- Yuan, X., V. M. Dong, et al. (2002). "A novel CD154 monoclonal antibody in acute and chronic rat vascularized cardiac allograft rejection." Transplantation **73**(11): 1736-42.
- Zhang, Y. and J. P. Allison (1997). "Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9273-8.
- Zhu, J., L. Zou, et al. (2001). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade enhances incidence and severity of experimental autoimmune neuritis in resistant mice." J Neuroimmunol **115**(1-2): 111-7.
- Zhu, Y., H. Ljunggren, et al. (2001). "CD28-B7 costimulation: a critical role for initiation and development of experimental autoimmune neuritis in C57BL/6 mice." J Neuroimmunol **114**(1-2): 114-21.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

## Immunosuppression and tolerance induction in transplantation by anti-CD28 antibodies.

B7 interaction with CD28 is essential for optimal activation of naive T cells. On the other hand, B7 can interact with CTLA-4 which inhibits T cell activation and proliferation and facilitates the induction of regulatory mechanisms. Therefore, selectively inhibiting the B7/CD28 pathway, without blocking that of B7/CTLA-4, may be strongly immunosuppressive and may facilitate tolerance induction. We first demonstrated that the selective blockade of B7/CD28 interaction inhibits the T cell responses of the direct but not of the indirect pathway. Then, we showed, as initially suggested, that the selective inhibition of CD28 indeed induced kidney allograft tolerance in the rat. Regulatory mechanisms are found in the blood and the spleen of tolerant animals. They presented a non-T, CMH class II<sup>-</sup> B7<sup>+</sup> phenotype.



# Contribution à l'étude de l'immunosuppression et de l'induction de tolérance à l'allogreffe induite par des anticorps anti-CD28.

Mots clefs :

*Transplantation, Costimulation, CD28, Cellules régulatrices, Tolérance, Rat*

Résumé de thèse :

*L'activation du lymphocyte T nécessite deux signaux : un signal de reconnaissance antigénique et un signal de costimulation. Le CD28 peut transmettre ce signal de costimulation en liant les molécules B7-1 et -2 exprimées par les cellules présentatrices d'antigène. Ces récepteurs B7 possèdent un autre ligand, le CTLA-4, qui inhibe l'activation des cellules T et est responsable de la mise en place de mécanismes régulateurs. Ainsi, nous avons étudié l'hypothèse selon laquelle un blocage spécifique de la liaison CD28/B7, sans empêcher l'interaction CTLA-4/B7, serait immunosuppresseur et inducteur de tolérance. Dans un premier temps, nous avons montré que le blocage sélectif de CD28 inhibe les réponses T allogéniques « directes » mais pas les réponses à un antigène soluble. Ensuite, nous avons démontré qu'effectivement, ce blocage induit une tolérance à l'allogreffe rénale chez le rat qui s'accompagne du développement de cellules régulatrices non-T de phénotype CMH II B7<sup>+</sup>.*