

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Etudes d'un protocole clinique de minimisation des
corticostéroïdes et de la tolérance opérationnelle
chez des patients transplantés rénaux

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : CHIMIE BIOLOGIQUE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie LOUIS

Le 6 juin 2005, devant le jury ci-dessous :

<i>Président du jury</i>	Francine JOTEREAU, Professeur, Nantes
<i>Rapporteurs</i>	Jocelyne DEMENGEOT, Professeur, Oeiras, Portugal Christophe LEGENDRE, Professeur, Paris
<i>Examineurs</i>	Francine JOTEREAU, Professeur, Nantes Diégo CANTAROVICH, Docteur, Nantes
<i>Directeurs de thèse</i>	Jean-Paul SOULILLOU, Professeur, Nantes Sophie BROUARD, Chargé de Recherche, Nantes

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	4
Abréviations	8
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Avant-propos	12
Introduction	14
I. Le rejet de greffe	14
A. Le rejet hyperaigu	14
B. Le rejet aigu.....	15
1. Les cellules de l'immunité innée	17
2. L'immunité adaptative	18
a) <i>Différentes voies de présentation antigénique</i>	18
b) <i>L'activation du lymphocyte T</i>	19
c) <i>Réaction d'hypersensibilité retardée et cytotoxicité</i>	20
C. Le rejet chronique	22
II. L'induction d'une tolérance d'allogreffe : modèles précliniques et essais cliniques	24
A. Blocage des voies de costimulation.....	25
1. L'interaction CD28/B7.....	27
2. L'interaction CD40/CD154	28
3. L'interaction LFA1/ICAM-1	29
4. L'interaction VLA4/VCAM-1	30
B. Déplétion lymphocytaire T	30
1. Anticorps ciblant les molécules associées au TCR.....	30

a) <i>La molécule CD3</i>	31
b) <i>La molécule CD2</i>	33
c) <i>La molécule CD4</i>	33
2. Campath-1H.....	34
3. Sérum anti-lymphocytaire.....	35
C. Mise en place d'un chimérisme.....	36
1. Définitions et mécanismes.....	36
2. Protocoles d'induction de tolérance par induction d'un chimérisme.....	38
III. La tolérance « opérationnelle ».....	42
IV. Les cellules T régulatrices humaines.....	44
A. Les cellules T CD4+.....	46
1. Les cellules T CD4+CD25+ naturelles.....	46
a) <i>Origine et localisation</i>	46
b) <i>Caractéristiques phénotypiques</i>	47
c) <i>Caractéristiques fonctionnelles</i>	49
d) <i>Cellules T CD4+CD25+ régulatrices et pathologies</i>	50
2. Les cellules T CD4+ régulatrices induites.....	52
a) <i>Les lymphocytes Tr1</i>	52
b) <i>Les lymphocytes Th3</i>	54
B. Les cellules T CD8+ suppressives.....	54
1. Les cellules T CD8+ suppressives (Ts) de type 1.....	55
2. Les cellules T CD8+ suppressives de type 2.....	57
3. Les cellules T CD8+ suppressives de type 3.....	57
C. Les cellules NKT.....	58
D. Les cellules T anti-idiotypiques et anti-ergotypiques.....	59
V. Les glucocorticoïdes (GC).....	62
A. Historique des corticostéroïdes.....	62
B. Les hormones stéroïdiennes.....	63
C. Les glucocorticoïdes et leurs récepteurs.....	63
D. Propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives des glucocorticoïdes.....	64
1. Glucocorticoïdes et voies de signalisations intracellulaires.....	65
2. GC et apoptose.....	68

3.	Cibles cellulaires des glucocorticoïdes.....	70
	a) <i>Macrophages</i>	70
	b) <i>Granulocytes et mastocytes</i>	71
	c) <i>Cellules endothéliales</i>	72
	d) <i>Fibroblastes</i>	73
	e) <i>Cellules dendritiques</i>	73
	f) <i>Cellules NK</i>	74
	g) <i>Lymphocytes T</i>	74
	h) <i>Lymphocytes B</i>	76
E.	L'utilisation des glucocorticoïdes en transplantation: pour ou contre ?.....	76
1.	Les avantages des glucocorticoïdes.....	77
2.	Les inconvénients des glucocorticoïdes.....	78
3.	Les protocoles visant à minimiser les glucocorticoïdes.....	79
VI.	Les sérums anti-lymphocytaires (SAL)	80
A.	Historique.....	80
B.	Composition.....	81
C.	Mécanismes d'action.....	83
1.	Apoptose.....	84
2.	Anergie.....	87
3.	Modulation des molécules de surface.....	87
4.	Lyse des cellules dendritiques.....	88
D.	Effets <i>in vivo</i> des SAL.....	89
1.	Déplétion des lymphocytes circulants.....	89
2.	Inhibition de la prolifération.....	89
3.	Réponse humorale contre les protéines xénogéniques.....	90

**Résultats 1 : Contribution à l'analyse de patients greffés rénaux
« opérationnellement » tolérants 91**

I.	Objectifs de l'étude	92
II.	Description des patients.....	92
III.	Résultats.....	93
A.	Les patients « opérationnellement tolérants » présentent un répertoire lymphocytaire T fortement altéré	94

B.	Les patients greffés rénaux en rejet chronique présentent un déficit en cellules T CD4+CD25hi et en FOXP3 couplé à la présence de molécules associées à une cytotoxicité sur les lymphocytes T CD4+ par rapport aux patients « opérationnellement tolérants ».....	106
C.	Les patients greffés rénaux en rejet chronique présentent une augmentation de lymphocytes T CD8+ « cytotoxiques » par rapport aux patients « opérationnellement tolérants ».....	132
IV.	Discussion et perspectives.....	155
Résultats 2 : Protocole de minimisation des corticostéroïdes en transplantation rénale: le protocole FRANCIA		161
I.	Objectifs de l'étude	162
II.	Description des patients.....	162
III.	Résultats.....	164
A.	Monitoring phénotypique et transcriptionnel des leucocytes circulants chez des patients greffés rénaux recevant une induction par sérum anti-lymphocytaire avec ou sans corticostéroïdes.....	165
IV.	Discussion et perspectives.....	190
Bibliographie		194
Annexes		227

Abréviations

ACTH : AdrenoCorticoTropic Hormone

ADCC : Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity

AICD : Activation-Induced Cellular Death

ATG: Anti-ThymoGlobulin

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : CytoMegaloVirus

CPA : Cellules Présentatrice d'Antigènes

CsA : Ciclosporine A

DC : Dendritic Cell

DTH : Delay Type Hypersensitivity

DSG: 15-DéoxySperGualine

EBV: Epstein-Barr Virus

FOXP3: Forkhead bOX P3

GC : GlucoCorticoïdes

GRE : Glucocorticoïd Response Element

GVHD: Graft Versus Host Disease

HCV: Hepatitis C Virus

HO1: Heme Oxygenase 1

HSP: Heat Shock Protein

Ig: Immunoglobuline

iNOS: inductible NO synthase

IPEX: Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked syndrome

LPS: lipopolysaccharide

MMF: Mycofenolate MoFetil

NK: Natural Killer

PTLD: Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders

SAL: Sérum Anti-Lymphocytaire

TCR: T Cell Receptor

Th: T helper

TLR: Toll-like receptor

Tr1: T regulatory 1

Liste des figures

Figure 1: Schéma des principaux médiateurs intervenant dans la mise en place du rejet aigu d'une allogreffe.....	16
Figure 2 : Principales molécules impliquées dans l'activation d'un lymphocyte T.....	26
Figure 3 : Modèle d'induction de tolérance à une allogreffe rénale chez le primate développé par Sachs et Cosimi.....	39
Figure 4 : Mode d'action des lymphocytes Ts lors d'une greffe.....	56
Figure 5: Réponses induites par une vaccination par des cellules T autoréactives atténuées.	61
Figure 6 : Voie de signalisation intracellulaire dépendante de NFκB.....	66
Figure 7 : Voie de signalisation intracellulaire dépendante de AP1.....	67
Figure 8: Voie de signalisation intracellulaire dépendante de Jak/Stat.....	68
Figure 9: Voie de signalisation intracellulaire dépendante du TCR.....	75
Figure 10 : Phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC.....	84
Figure 11 : Activation de la voie classique du complément.....	85
Figure 12 : Apoptose déclenchée par l'interaction Fas/FasL.....	86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux mécanismes impliqués dans la mise en place d'un chimérisme par traitement non myéloablatifs.	37
Tableau 2 : Récapitulatif des différentes populations cellulaires de lymphocytes T régulateurs chez l'Homme.	45
Tableau 3 : Principaux anticorps de la Thymoglobuline, la réactivité et les titres correspondants.	82
Tableau 4 : Principaux anticorps du SAL de Frésenius, la réactivité et les concentrations qui permettent une inhibition de 50%.	83

Avant-propos

L'immunité est l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme pluricellulaire de maintenir la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent et d'assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants altérés et les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels ils sont exposés. Le système immunitaire a la capacité de distinguer les constituants normaux de l'organisme (le « soi ») qui doivent être conservés et les constituants altérés ou étrangers (le « non soi » ou « soi modifié ») qui doivent être éliminés. Un dysfonctionnement du système immunitaire peut déclencher soit des maladies auto-immunes (réponse immune contre le soi), soit des tumeurs (non réponse contre le soi modifié). Au cours de l'évolution des êtres vivants, deux processus complémentaires se sont successivement mis en place.

Le premier est l'immunité innée ou naturelle qui est présente chez les animaux et les végétaux. Sa mise en jeu est immédiate et permet un contrôle de l'infection. Elle peut être déclenchée par de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, levures, parasites) et passe par la reconnaissance de motifs absents de l'organisme hôte (exemples : constituants de la paroi bactérienne, ADN...). Cette reconnaissance induit un signal de danger puis une réponse inflammatoire qui aboutira à la destruction du pathogène. La première ligne de défense est le revêtement cutané-muqueux qui assure l'exclusion des microorganismes et l'information du système immunitaire. Lorsque le pathogène (bactérie ou levure) a traversé cette barrière et se retrouve dans la circulation sanguine, il déclenche l'activation de facteurs plasmatiques comme le complément (composante humorale) et de cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et macrophages). Lors d'une infection virale, interviennent des cytokines produites par la cellule infectée et qui inhibent la réplication du virus ainsi que des cellules NK cytotoxiques naturelles qui détruisent la cellule infectée.

Chez les Vertébrés, le second processus correspond à l'immunité adaptative ou spécifique. Sa mise en place est plus lente que celle de l'immunité innée. Les principaux médiateurs sont les lymphocytes T et B qui possèdent des récepteurs susceptibles d'interagir de façon spécifique avec un antigène particulier. Les lymphocytes B stimulés

par l'antigène se multiplie et se différencie en plasmocytes sécrétant des anticorps (composante humorale). Les lymphocytes T stimulés par l'antigène se différencient soit en cellules T auxiliaires/helper ou en cellules T cytotoxiques (composante cellulaire). Enfin, l'immunité adaptative est caractérisée par une capacité de mémoire qui permet une réponse ultérieure plus rapide contre un même antigène.

Si cette réponse immunitaire est essentielle pour combattre les infections, elle empêche aussi l'acceptation de cellules ou d'organes étrangers. En effet, la transplantation génère une réponse immune, appelée rejet de greffe, qui nécessite d'être détournée ou contrôlée afin que l'organisme hôte reconnaisse ou tout au moins ignore le greffon. Actuellement, les traitements immunosuppresseurs ne permettent pas d'éviter entièrement cette réponse et génèrent de nombreux effets secondaires (cancers, infections...). L'objectif de la recherche en transplantation est donc aujourd'hui d'induire une acceptation indéfinie du greffon sans immunosuppression permanente ; c'est la tolérance « opérationnelle ».

Après un chapitre sur les caractéristiques et les mécanismes du rejet de greffe, je présenterai donc les différentes voies de recherche pour tenter d'induire une tolérance chez le primate et chez l'Homme. Quelques cas de tolérance « opérationnelle » ont toutefois été décrits chez l'Homme. Parmi les mécanismes potentiellement impliqués dans cette tolérance, je me suis principalement intéressée au cours de mes travaux, au rôle des lymphocytes T régulateurs. L'étude d'une cohorte de patients greffés rénaux spontanément tolérants a fait l'objet d'une partie de mes travaux. La deuxième partie a consisté en l'analyse de patients greffés rénaux inclus dans un protocole de minimisation des glucocorticoïdes sous effet d'un sérum anti-lymphocytaire. Je décrirai donc plus particulièrement les mécanismes d'action de ces deux molécules immunosuppressives: les glucocorticoïdes et les sérums anti-lymphocytaires.

Introduction

I. Le rejet de greffe

La transplantation est le traitement de choix pour remplacer un organe ou un tissu dont le fonctionnement est définitivement altéré. L'autogreffe concerne les greffes de peau et surtout de moelle osseuse. Pour la greffe d'organes, il faut trouver un donneur soit de la même espèce que le receveur (allogreffe), soit d'espèces différentes (xénogreffe). Dans les deux cas, cela consiste en l'implantation d'éléments étrangers au système immunitaire de l'hôte qui génère donc une réponse immune, appelée rejet de greffe. Ce phénomène regroupe trois types de rejets: le rejet hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique (Orosz, 2002). Néanmoins, il existe aussi une composante non immunologique du rejet qui est la conséquence de l'acte chirurgical et est notamment lié au phénomène d'ischémie/reperfusion qui entraîne une réponse inflammatoire locale.

A. Le rejet hyperaigu

Dès les premières minutes qui suivent la transplantation, peut survenir, dans un contexte particulier, un rejet hyperaigu dû à la présence chez le receveur d'anticorps préformés circulants dirigés contre les antigènes du donneur (Loh et al., 1994; Stiller et al., 1975). Ce type de rejet ne concerne que des organes vascularisés. Dans le cas d'une allogreffe, les cibles de ces anticorps sont les antigènes du système sanguin ABO ou les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ils se sont formés suite à une transfusion sanguine, à une grossesse ou lors d'une précédente transplantation. Lorsque ces anticorps rencontrent leur cible sur les cellules endothéliales du greffon, leur fixation induit l'activation de l'endothélium qui devient alors « procoagulant » (Pober, 1999). Les anticorps préformés fixés activent la voie classique du complément aboutissant aussi à la

création de pores dans la membrane des cellules endothéliales et consécutivement à une désorganisation du cytosquelette. La coagulation excessive et l'activation du complément entraînent un dysfonctionnement du système vasculaire du greffon et donc son asphyxie. Lors d'un rejet hyper aigu, on trouve un infiltrat de polynucléaires neutrophiles et de macrophages (Kilgore et al., 1996) qui ont été recrutés par l'activation du complément et par la sécrétion de molécules attractrices, appelées chimiokines (MCP1, IL8). Cliniquement, ce type de rejet est, de nos jours, rare en allotransplantation (<1%), puisqu'une recherche systématique de ces anticorps préformés chez le futur hôte est effectuée par des tests « cross-match ».

B. Le rejet aigu

Le rejet aigu peut survenir dans la semaine ou les mois consécutifs à la greffe. Il fait intervenir diverses composantes de l'immunité innée et adaptative (figure 1).

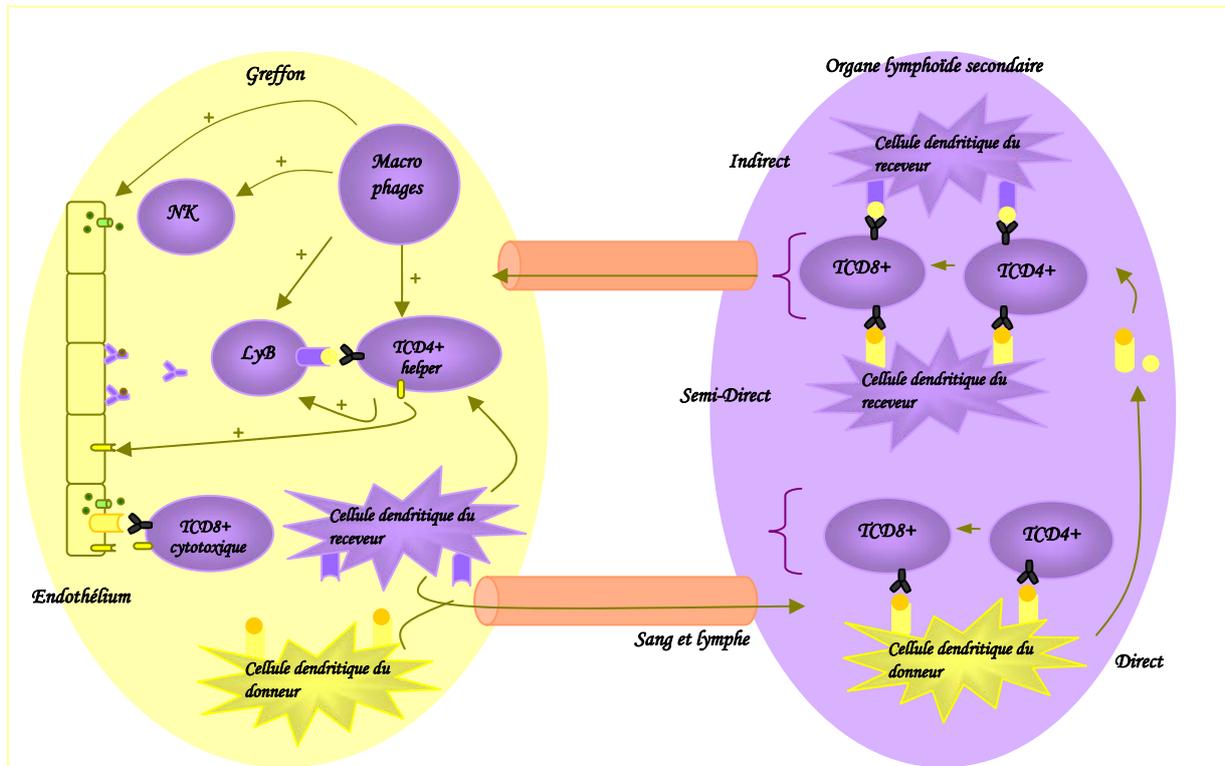


Figure 1: Schéma des principaux médiateurs intervenant dans la mise en place du rejet aigu d'une allogreffe.

La réponse inflammatoire locale provoquée par l'acte chirurgical active les cellules de l'immunité innée (macrophages et cellules NK). Parallèlement, les cellules dendritiques du greffon migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont stimuler des lymphocytes T spécifiques selon les voies directe, semi-directe et indirecte de présentation des antigènes. Ces lymphocytes T activés sont ensuite attirés vers le greffon où ils sont restimulés par les antigènes du donneur. Les lymphocytes Thelper participent à une réaction d'hypersensibilité retardée et activent la production d'immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B. La fixation des Ig sur les cellules endothéliales du greffon entraîne l'activation de complément. Les lymphocytes T CD8+ exercent une cytotoxicité (dépendante de Fas/FasL et de perforine/granzyme) contre les cellules du donneur.

1. *Les cellules de l'immunité innée*

Les cellules de l'immunité innée, principalement des macrophages et des cellules NK, sont les premières à intervenir sur le site de l'inflammation, attirées par les molécules chimiotactiques produites lors de la procédure chirurgicale.

Les macrophages sécrètent trois cytokines dites pro-inflammatoires : l'IL1 (α et β), le TNF α et l'IL6. L'IL6 et l'IL1 favorisent l'activation des lymphocytes T et B (Emilie et al., 1988; Vink et al., 1990). L'IL1 et le TNF α activent l'endothélium vasculaire qui devient alors perméable à l'exsudat inflammatoire (Brown et al., 2001). Le TNF α , par un processus autocrine, stimule les fonctions cytotoxique et phagocytaire des macrophages (Heidenreich et al., 1988). De plus, les macrophages synthétisent l'IL12, cytokine intervenant dans l'activation des cellules NK et la polarisation des lymphocytes T CD4+ vers un profil de type Th1 (voir §c) (Trinchieri, 1998). Ils sécrètent aussi des médiateurs pro-inflammatoires comme les leucotriènes et les prostaglandines ainsi que des chimiokines (IL8) qui « attirent » l'infiltrat cellulaire. Enfin, une des fonctions majeures des macrophages est la destruction des cellules étrangères. Suite à la phagocytose, le phagosome fusionne avec des lysosomes où de multiples molécules interviennent : le monoxyde d'azote (NO), produit par l'enzyme iNOS, qui inhibe la synthèse et la réparation de l'ADN de la cellule cible (Wink and Laval, 1994) et des protéases telles que des collagénases et élastases.

L'implication des cellules NK dans le rejet de greffe a été suggérée par Maier et coll (Maier et al., 2001). Les cellules NK sont des lymphocytes à larges granules, cytotoxiques, impliqués dans l'élimination des virus et des parasites. Leur activation par des cellules n'exprimant pas de molécules de CMH de classe I non classique du soi, entraîne la libération du contenu cytotoxique de leurs granules et amène à la production de cytokines tels que le TNF α et l'IFN γ (Campos-Martin et al., 2004). Leur fonction est modulée par la présence en surface de récepteurs inhibiteurs (KIR) ou activateurs (KAR) (Middleton et al., 2002).

Plus récemment, le rôle des récepteurs Toll-like (TLR) dans le rejet aigu a été suggéré par Goldstein et coll (Goldstein et al., 2003) ainsi que Palmer et coll (Palmer et al., 2003). Ces récepteurs, impliqués dans l'immunité innée, sont portés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telles que les cellules dendritiques et reconnaissent des motifs particuliers (ex : lipopolysaccharide (LPS), heat shock protein (HSP)...). En transplantation, les TLR peuvent aussi être activés par la greffe et permettre la migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires (Goldstein et al., 2003) où les mécanismes de l'immunité adaptative vont alors se mettre en place. Cette activation pourrait en partie se faire par l'interaction avec les nombreuses HSP qui apparaissent au cours d'un rejet aigu (Pockley, 2001).

2. *L'immunité adaptative*

En plus d'une réponse précoce innée indépendante des antigènes, se mettent en place des événements plus tardifs et notamment l'activation de lymphocytes T spécifiques des antigènes du donneur. Cette activation a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires où ont migré les CPA du donneur (principalement les cellules dendritiques) (Lakkis et al., 2000).

a) *Différentes voies de présentation antigénique*

Trois voies de présentation des antigènes aux lymphocytes T sont alors possibles (figure 1) : la voie de présentation indirecte, directe et semi-directe.

Dans la voie de présentation indirecte, les cellules du donneur sont phagocytées par les cellules dendritiques de l'hôte et les peptides processés sont exposés sur les molécules du CMH du soi. Ces complexes CMH du soi/peptide allogénique sont reconnus par des lymphocytes T spécifiques. Les peptides présentés sont principalement issus des molécules du CMH du donneur, mais aussi de protéines polymorphiques ou non. Cette voie de

présentation des antigènes du donneur est à elle seule capable d'entraîner un rejet (Auchincloss et al., 1993).

Il existe une seconde possibilité qui consiste en la reconnaissance directe par les lymphocytes T du receveur du complexe CMH allogénique/peptide allogénique sur les cellules dendritiques du donneur. C'est la voie directe ou réactivité croisée. Cette dernière est plus rapide à se mettre en place et mobilise un très grand nombre de lymphocytes T (1 à 10%) (Matis et al., 1987), tandis que la voie indirecte nécessitant au préalable un apprêtement des antigènes du donneur est plus tardive et la fréquence des clones 100 fois plus faible (Benichou, 1999). La voie directe participe au rejet aigu du fait de la présence des cellules dendritiques circulantes du donneur. Mais elle joue aussi un rôle dans le rejet chronique (cf §C) puisque les cellules endothéliales du greffon qui expriment constitutivement les molécules du CMH de classe I peuvent aussi être la cible des lymphocytes T (Epperson and Pober, 1994).

Enfin, Herrera et coll ont mis en évidence une troisième voie de présentation, appelée semi-directe (Herrera et al., 2004). Les cellules dendritiques du receveur seraient capables de phagocyter entièrement les cellules du donneur et de présenter les complexes CMH/peptides entiers du donneur à leur surface.

b) L'activation du lymphocyte T

Lors de la présentation des antigènes du donneur dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ spécifiques sont activés par les cellules dendritiques qui ont préalablement subi une maturation. L'activation d'un lymphocyte T naïf est un phénomène complexe qui fait intervenir de nombreuses interactions moléculaires. Les grandes étapes sont ici résumées. La première étape correspond à la reconnaissance, par l'intermédiaire des récepteurs des cellules T (TCR), d'un peptide du donneur présenté sur les molécules du CMH de classe I (pour les lymphocytes T CD8⁺) ou de classe II (pour les lymphocytes T CD4⁺) par les CPA. L'engagement d'un petit nombre de TCR au départ provoque la redistribution de molécules membranaires aboutissant à la

formation d'une synapse immunologique qui est la zone de contact entre le lymphocyte T et la CPA (revue (Bromley et al., 2001)). Le centre de la synapse est constitué principalement de TCR et de complexes CMH/peptides. Cette reconnaissance est stabilisée par de nombreuses interactions moléculaires (CD4/CMH de classe II, CD8/CMH de classe I, CD28/B7, CD40/CD154, etc...) qui amplifient les signaux dépendant du TCR. Cette zone centrale est entourée d'un anneau de molécules d'adhésion (CD2/LFA3, CD11a/ICAM1...) qui jouent aussi un rôle dans la stabilisation synaptique. L'activation complète du lymphocyte T naïf nécessite la synthèse de l'IL2 et l'expression d'un récepteur à l'IL2 de haute affinité (CD25 + CD122 + CD132). Par un mode autocrine et paracrine, l'interaction de l'IL2 avec son récepteur permet alors l'expansion clonale et la phase effectrice de la réponse immune. Néanmoins, d'autres cytokines, comme l'IL7 et l'IL15, peuvent aussi induire la prolifération de lymphocytes T naïfs (Geginat et al., 2001; Schluns et al., 2000). Enfin, la régulation de la réponse immune est primordiale. Elle fait intervenir l'expression sur le lymphocyte T activé de molécules inhibitrices comme CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) ou encore PD1 (Programmed Death 1), deux membres de la famille CD28 (Dong et al., 2001; Freeman et al., 2000). Une fois les antigènes éliminés et la réponse inflammatoire arrêtée, la grande majorité des lymphocytes T activés meurent par apoptose, tandis qu'un petit contingent constituera un pool de cellules mémoires. Dans le cas de lymphocytes T mémoires, qui peuvent également reconnaître des antigènes du donneur par des phénomènes de réactivité croisée, la stimulation minimale est moins stringente car elle ne nécessite pas la présence du second signal (Croft et al., 1994). Si l'IL2 n'est donc pas primordiale, la prolifération des lymphocytes T mémoires est assurée par l'IL7 ou l'IL15 (Geginat et al., 2001; Schluns et al., 2000).

c) Réaction d'hypersensibilité retardée et cytotoxicité

Une fois activés, les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ retournent dans le greffon où ils sont restimulés et déclenchent deux types de phénomènes : une réaction

d'hypersensibilité retardée pour les cellules T CD4+ et une cytotoxicité pour les cellules T CD8+.

La réaction d'hypersensibilité retardée (DTH) est effectuée par les lymphocytes T CD4+ différenciés vers un profil de type Thelper 1 (Th1), c'est-à-dire qu'ils produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que IL2, IFN γ et TNF α . Ces cytokines de type Th1 sont impliquées dans l'activation des macrophages notamment en favorisant leur activité de présentation des antigènes, c'est-à-dire en augmentant l'expression des molécules de CMH de classe I et II à leur surface (Celada and Maki, 1991). Deux études ont montré que la présence d'une réaction d'hypersensibilité retardée était associée à la perte du greffon (Sirak et al., 1997), tandis qu'une survie à long terme d'un greffon cardiaque était corrélée à l'absence de DTH (Orosz et al., 1997). De plus, les lymphocytes Th activent les lymphocytes B, présents dans le greffon, par reconnaissance des molécules CMH de classe II présentes à leur surface. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th permettent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'anticorps dirigés contre les antigènes du donneur. Les lymphocytes Th participent aussi à la commutation de classes des immunoglobulines (Ig) (Leclercq et al., 1985). Les IgG et IgM produites par les plasmocytes recrutés sur le site inflammatoire vont alors se fixer sur les cellules endothéliales du greffon. Cette fixation entraîne non seulement l'activation de la cascade du complément, la destruction consécutive de l'endothélium, mais aussi la liaison, et donc l'activation, de cellules immunitaires porteurs de récepteurs pour la partie Fc de l'Ig (macrophages, cellules NK...) (Duijvestijn et al., 2000; Leeuwenberg et al., 1990).

L'implication des lymphocytes T CD8+ dans le rejet a également été suggérée avec l'isolement de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dans des greffons rénaux humains rejetés (Strom et al., 1975). Une fois activés par les CPA, les lymphocytes T CD8+ acquièrent des fonctions cytotoxiques. Elles induisent, en effet, l'apoptose des cellules du greffon soit par un système perforine/granzyme, soit par une interaction dépendante des molécules Fas/FasL.

C. Le rejet chronique

Avec les progrès considérables réalisés ces dernières décennies sur l'amélioration des traitements immunosuppresseurs, le rejet aigu est aujourd'hui peu fréquent et peut être réversible avec un certain nombre de molécules (anti-Récepteur à l'IL2, OKT3...) (Cantarovich et al., 1994; Hourmant et al., 1994). Par contre, les traitements immunosuppresseurs actuels ne peuvent prévenir l'apparition à long terme d'une dysfonction chronique, principale cause de la perte d'un greffon. Ils possèdent, de surcroît, de multiples effets secondaires tels qu'une néphrotoxicité ou le développement d'infections et de cancers (Dantal et al., 1998; Hojo et al., 1999; Soulillou and Giral, 2001). Cette dysfonction chronique en transplantation rénale est définie comme la perte lente et progressive de la fonction du greffon associé ou non à une protéinurie et une hypertension artérielle. Si le terme « rejet chronique » était usuel dans les années 1980-1990, il a été remplacé en 2000 par « néphropathie chronique du transplant » (NCT). Sous cette dénomination, sont regroupés 4 entités caractérisées histologiquement : 1) le rejet vasculaire chronique qui présente un dépôt de la molécule du complément C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires, dû à des anticorps anti-donneur, ainsi qu'un dédoublement des membranes basales glomérulaires, 2) la toxicité aux anti-calcineurines (ciclosporine A, tacrolimus) caractérisée par des dépôts hyalins nodulaires à la périphérie des artéioles, 3) la néphroangiosclérose du donneur et 4) des infections chroniques du greffon. La gravité d'un rejet est ensuite déterminée par la classification de Banff qui permet de standardiser les aspects morphologiques et cliniques du rejet. Nankivell et coll ont récemment montré l'«histoire naturelle de la NCT» (Nankivell et al., 2003). Dans cette étude, la majorité des greffons présentaient des signes latents de NCT (rejet subaigu) dès la première année suivant la transplantation et la persistance de ces lésions de rejet subaigu aboutissait au rejet vasculaire chronique dans peu de biopsies (<6%). Contrairement au rejet vasculaire chronique peu fréquent, la totalité des biopsies à 10 ans a montré des lésions de toxicité chronique aux inhibiteurs de calcineurine.

Le développement d'un rejet chronique dépend de multiples facteurs aussi bien immunologiques que non immunologiques (Massy et al., 1996). Parmi les facteurs de risque, on distingue : la présence d'alloanticorps (Susal and Opelz, 2002), le nombre d'épisodes de rejets aigus (Matas et al., 1994; Matas et al., 1999), le nombre d'incompatibilité HLA (Morris et al., 1999; Terasaki and Ozawa, 2004), le retard de démarrage du greffon (Giral-Classe et al., 1998; Perico et al., 2004), l'âge du donneur (Opelz and Wujciak, 1994; Oppenheimer et al., 2004; Oriol et al., 1980), le poids du greffon (Giral et al., 2005) et la pression sanguine du receveur (Pratschke et al., 2004).

II. L'induction d'une tolérance d'allogreffe : modèles précliniques et essais cliniques

Le principal objectif de la recherche en transplantation est actuellement d'établir une tolérance spécifique vis-à-vis des antigènes du donneur. On définit la tolérance à une allogreffe comme l'acceptation indéfinie du greffon en l'absence de thérapie immunosuppressive et de signes de rejet chronique, dans un contexte général d'immunocompétence. Même si les mécanismes exacts de la tolérance restent encore mal connus, on distingue 3 grands principes : l'anergie qui désigne une inactivation fonctionnelle du lymphocyte T (Schwartz, 1990), la suppression caractérisée par des populations cellulaires inhibant la fonction d'autres cellules (Wood and Sakaguchi, 2003) et la délétion clonale définie comme l'élimination intrathymique (délétion centrale) (Tomita et al., 1994) ou extrathymique (délétion périphérique) (Webb et al., 1990) des lymphocytes T ayant une certaine spécificité antigénique. Chacun de ces mécanismes intervient à des degrés variables dans les phases d'induction et de maintien de la tolérance.

Depuis les premiers travaux de Medawar et coll dans les années 1950 (Medawar and Woodruff, 1958), de nombreuses stratégies d'induction (y compris dans notre laboratoire) ont permis d'établir une tolérance à une allogreffe chez les rongeurs (Bugeon et al., 1992; Bugeon et al., 1993; Chiffolleau et al., 2002; Guillot et al., 2000; Sebille et al., 2003). Cependant, toutes ces approches semblent très difficiles à transposer dans des modèles précliniques chez le primate ou dans des essais cliniques chez l'Homme. Seules trois stratégies semblent émerger; elles correspondent au blocage des voies de costimulation, à la déplétion des lymphocytes T et à l'induction d'un chimérisme.

A. Blocage des voies de costimulation

Il existe de multiples voies de costimulation (voir figure 2) nécessaires à une activation complète du lymphocyte T. En l'absence de costimulation, l'activation du lymphocyte T n'est que partielle ce qui conduit à une anergie, c'est-à-dire à une période réfractaire à toute nouvelle stimulation, ou à la mort par apoptose. Par conséquent, l'une des stratégies pour induire une tolérance est de bloquer l'interaction de ces molécules de costimulation. L'objectif de ma thèse n'étant pas une étude mécanistique, je ne développerai ici que les différentes molécules utilisées pour induire l'anergie des lymphocytes T sans détailler leur mécanisme d'action.

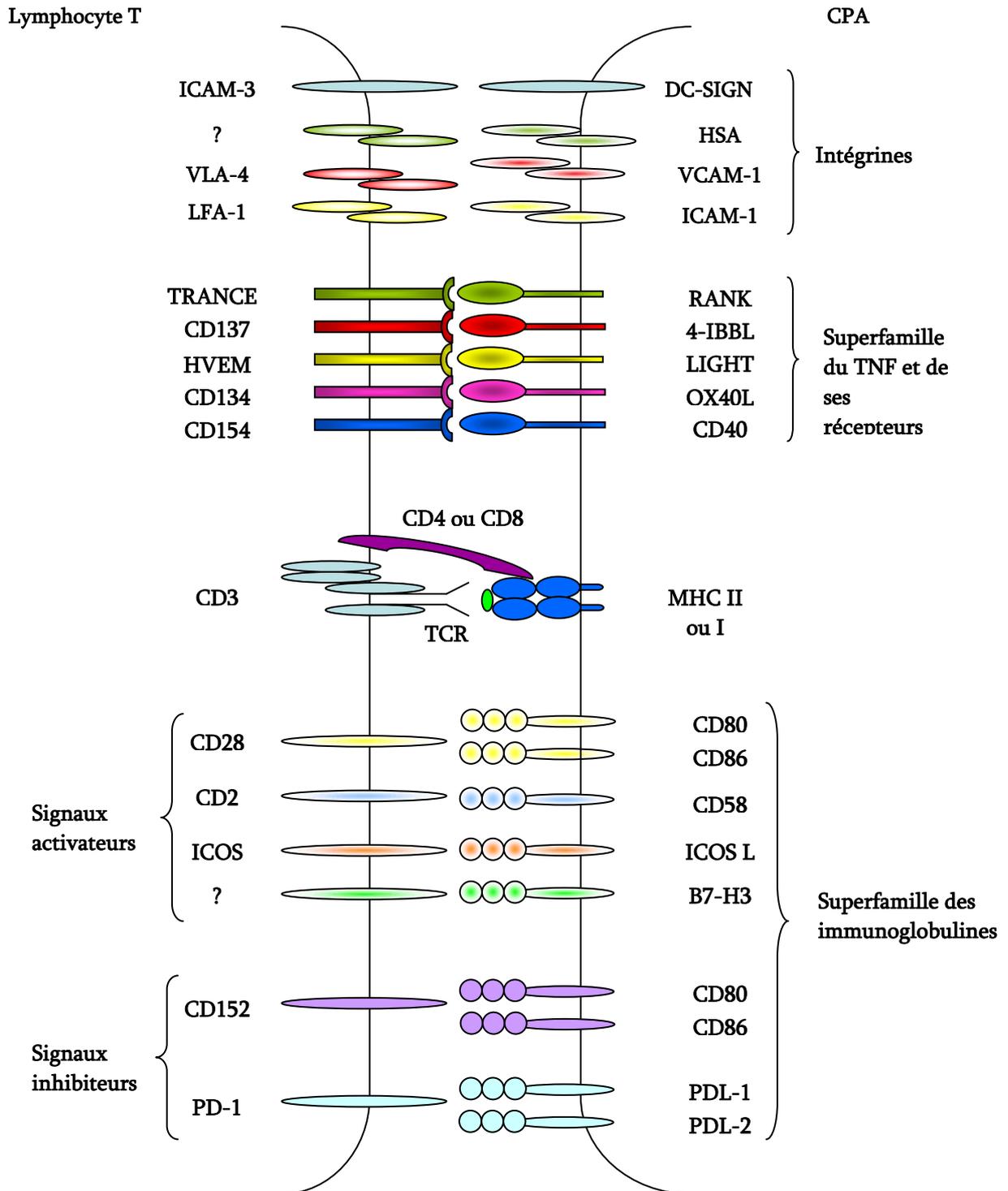


Figure 2 : Principales molécules impliquées dans l'activation d'un lymphocyte T.

1. *L'interaction CD28/B7*

La voie de costimulation la mieux caractérisée est celle qui implique les récepteurs CD28 et CD152 (CTLA4) et leurs ligands CD80 (B7-1), CD86 (B7-2). L'importance de celle-ci a conduit au développement d'un puissant antagoniste de CD28, la molécule de fusion CTLA4Ig (Linsley et al., 1991). Elle est constituée du domaine extracellulaire de CTLA4 humaine et de la partie Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine. La première forme de cette molécule a permis de prolonger modestement la survie d'une allogreffe rénale chez le singe (Kirk et al., 1997). Néanmoins elle s'est révélée peu affine pour les molécules B7 humaines et nécessitait de trop grandes quantités pour l'adapter en clinique. De cette observation, a été développée par Bristol-Myers Squibb une forme mutante de CTLA4Ig, commercialisée sous le nom de LEA29Y (belatacept), qui est dix fois plus affine pour les molécules B7-1 et B7-2. Adams et coll ont montré que le LEA29Y inhibait la production d'IFN γ par les lymphocytes T et la production d'anticorps par les lymphocytes B après stimulation contre le donneur et qu'il prévenait le rejet d'une allogreffe d'îlots pancréatiques chez des primates sous couvert d'une immunosuppression minimale à base de rapamycine et d'un anticorps anti-IL2R (Adams et al., 2002). Mais, contrairement aux modèles animaux (Guillot et al., 2000), aucune tolérance n'a pu être établie. De plus, un essai clinique multicentrique en phase II et III avec cette molécule est actuellement en cours (Matthews et al., 2003).

Une alternative pour bloquer la voie CD28/B7 est l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre CD80 (h1F1) et CD86 (h3D1) (développés par Wyeth). Des résultats encourageants ont été obtenus dans des modèles de greffe rénale chez le primate, puisque les auteurs ont observé une modeste prolongation de la survie du greffon (Boulday et al., 2004; Pearson et al., 2002). De même, en clinique, leur utilisation combinée à un traitement à base de Ciclosporine A (CsA), Mycophénolate Mofétil (MMF) et corticostéroïdes semble bien tolérée même si aucune tolérance n'a pu être induite (Vincenti, 2002).

Un des inconvénients du CTLA4Ig et des anticorps anti-CD80/CD86 est qu'ils bloquent non seulement l'interaction de B7 avec CD28, mais aussi avec CTLA4 qui assure un contrôle négatif de la réponse du lymphocyte T. Un anticorps anti-CD28 non stimulant ou une protéine de fusion telle que la molécule Sc28AT (Vanhove et al., 2003) représente une option qui est actuellement en cours d'étude chez le babouin.

2. *L'interaction CD40/CD154*

Le récepteur CD40 et son ligand CD154 ont un rôle critique dans la régulation humorale et cellulaire. Kirk et coll ont montré qu'un anticorps anti-CD154 (hu5C8), donné en monothérapie, prévenait l'incidence du rejet aigu d'une allogreffe rénale chez le primate (Kirk et al., 1999). Mais, dès 60 jours après la greffe, des alloanticorps apparaissent, probablement dus à une absence de régulation de la réponse humorale, et entraînent le développement d'un rejet chronique. Malheureusement, cet anticorps hu5C8, testé chez des patients greffés rénaux, a entraîné de graves thromboses non détectées lors des phases précliniques. Une explication envisagée est que l'anticorps anti-CD154 active les plaquettes humaines qui expriment CD154 (ce qui n'est pas le cas chez la souris), provoquant la formation de caillots sanguins (Aukrust et al., 2004).

Le blocage d'une seule voie de costimulation ne semble pas induire de tolérance chez le primate ou chez l'Homme. Même si les raisons pour l'expliquer restent mal connues, elles pourraient être liées à une redondance plus importante du système immunitaire, les voies de costimulation ayant la possibilité de se compenser. Des travaux ont ainsi combiné un antagoniste de CD28 avec un inhibiteur de la voie CD40/CD154. Kirk et coll ont montré l'effet synergique de CTLA4Ig et d'un anticorps anti-CD154 chez des singes greffés rénaux (Kirk et al., 1997). Toutefois, malgré une nette prolongation de survie du greffon, aucune tolérance n'a pu être obtenue. Enfin, les anticorps anti-CD80 et CD86, à défaut d'augmenter la prolongation de survie observée avec l'anticorps anti-CD154 seul, retardent l'arrivée des alloanticorps dans le greffon (Montgomery et al., 2002).

Une alternative à l'utilisation de l'anticorps anti-CD154 est aussi envisagée avec un anticorps ciblant CD40. Un anticorps chimérique de souris dirigé contre le CD40 humain (Chi220), administré en monothérapie, ne permet qu'une prolongation modérée de la survie d'un greffon rénal chez le primate, avec toujours l'apparition d'alloanticorps qui peut être toutefois inhibée par une combinaison avec CTLA4Ig (Pearson et al., 2002). Plus récemment, la combinaison LEA29Y/Chi220 a aussi permis de prolonger la survie d'une allogreffe d'îlots chez des singes Rhésus (Adams et al., 2005).

3. *L'interaction LFA1/ICAM-1*

CD11a est une chaîne composante de la molécule d'adhésion LFA1 présente sur le lymphocyte T et qui reconnaît ICAM-1 sur la CPA. Le blocage de cette interaction amène, d'après les résultats obtenus chez le rongeur, à inhiber l'activation, le trafic et l'adhésion des lymphocytes T (Isobe et al., 1992). Chez l'Homme, l'anticorps anti-LFA1 (Odulimomab), utilisé pour la première fois en transplantation rénale, s'est révélé incapable de réverser les épisodes de rejet aigu (Le Mauff et al., 1991). Par contre, des résultats encourageants ont été obtenus lors d'une utilisation prophylactique (Hourmant et al., 1996), sans toutefois induire de tolérance comme chez la souris (Corbascio et al., 2002). De même, un autre anticorps anti-LFA1 (Efalizumab), testé chez des patients greffés rénaux et traités avec CsA/MMF ou sirolimus/corticostéroïdes, n'a fait qu'améliorer le taux des épisodes de rejet aigu (Dedrick et al., 2002). De trop fortes doses de cet anticorps sont associées au développement de syndromes lymphoprolifératifs (PTLD) (Vincenti, 2002). En outre, un autre anticorps anti-LFA1 commercialisé par Sangstat a récemment montré une faible efficacité pour la prévention des rejets chez des patients greffés rénaux à haut risque (Matthews et al., 2003).

4. *L'interaction VLA4/VCAM-1*

VLA4 et ses ligands (VCAM-1, MadCAM-1, ICAM-4) jouent un rôle important dans le recrutement des cellules immunitaires sur le site de l'inflammation, en stabilisant les interactions entre lymphocyte T et CPA et en fournissant des signaux de costimulation. Un inhibiteur de VLA4 (Natalizumab) a été testé dans un essai clinique de phase III pour le traitement de la sclérose en plaque et a montré une diminution des lésions au gadolinium (O'Connor et al., 2004). Le Natalizumab est aussi actuellement étudié en clinique pour la maladie de Crohn (Ghosh et al., 2003). Mais aucun essai n'a été réalisé en transplantation.

B. Déplétion lymphocytaire T

La seconde stratégie pour induire une tolérance est la déplétion massive des lymphocytes T, principaux médiateurs du rejet d'allogreffe. Cette approche permettrait d'éliminer les cellules effectrices au moment de la greffe et ainsi de favoriser la « cicatrisation » de l'organe sans réponse immune destructrice. Plusieurs méthodes ont été décrites pour parvenir à cette déplétion incluant des anticorps spécifiques des lymphocytes T ou des anticorps polyclonaux.

1. *Anticorps ciblant les molécules associées au TCR*

Le récepteur des lymphocytes T (TCR), impliqué dans la reconnaissance spécifique de l'antigène, est associé à des protéines (CD2, CD3, CD4, CD8) qui permettent une stabilisation du complexe CMH/peptide et une augmentation du signal dépendant du TCR (figure 2). Toutes ces molécules sont susceptibles d'être des cibles pour éliminer les lymphocytes T.

a) *La molécule CD3*

Le TCR est associé à un complexe moléculaire CD3 qui assure la transduction du signal lors d'une stimulation antigénique. Ce complexe est formé de multiples chaînes (2ζ , 2ε , γ , δ). L'anticorps murin anti-CD3 (OKT3) a été le premier anticorps monoclonal utilisé en transplantation rénale. Malgré une très grande efficacité pour traiter les épisodes de rejet aigu, de sévères effets secondaires dus à son activité mitogène, à une production excessive de cytokines et à une réponse contre les antigènes murins ont été observés (Kaiser et al., 1991; Rossi et al., 1993). Par la suite, des améliorations, principalement en humanisant l'OKT3, ont permis d'éliminer ces effets indésirables et d'utiliser cette molécule pour le traitement des rejets aigus (Woodle et al., 1999), de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD = Graft Versus Host Disease) (Hebart et al., 1995) et dans le cas de maladies auto-immunes (Utset et al., 2002). Mais aucun protocole n'a réussi à induire une tolérance avec l'OKT3 (Henry et al., 2001).

Si un anticorps anti-CD3 peut avoir des propriétés immunosuppressives intrinsèques, son utilisation en tant que vecteur d'une molécule immunosuppressive a aussi été envisagée. Ainsi, en 1998, Knechtle et coll montrèrent l'efficacité de l'anticorps anti-CD3 couplé à une immunotoxine (toxine diphtérique) (FN18-CRM9) dans un protocole d'induction de tolérance chez le primate (Knechtle et al., 1998). En effet, son administration le jour de la transplantation, combinée à du MMF avec ou sans corticostéroïdes engendre une profonde lymphopénie périphérique et centrale et permet de prolonger la survie du greffon rénal. Toutefois ce traitement n'empêche pas l'installation d'un rejet chronique. Le succès de cette approche est lié à la forte capacité déplétante de l'immunotoxine dont la toxicité systémique a été réduite. De la même façon, cette molécule, combinée à un traitement à base de CsA et de Rapamicine, prolonge la survie du greffon rénal sans établir une tolérance (Jonker et al., 2002). Au contraire, plus récemment, Torrealba et coll ont réussi à induire une tolérance spécifique du donneur chez des singes greffés rénaux traités avec l'anticorps FN18-CRM9, de la CsA et du MMF (Torrealba et al., 2004). Cette acceptation du greffon est contemporaine d'un fort infiltrat

de lymphocytes TCD4⁺ exprimant la forme latente du TGFβ, connue pour ses propriétés immunomodulatrices. Mais cet état de tolérance pouvant être rompu après la greffe, les auteurs parlent de tolérance métastable (Knechtle and Burlingham, 2004).

Une autre stratégie a été mise en place, toujours dans des modèles de greffe rénale chez le primate, en associant l'anticorps FN18-CRM9 avec la 15-déoxyspergualine (DSG) (Thomas et al., 2000) qui inhibe la signalisation dépendante de NFκB nécessaire à la fonction des CPA (Diegel et al., 2002). Thomas et coll réussirent ainsi à induire une tolérance spécifique du donneur sans rejet aigu ni chronique (Thomas et al., 2000). Les mécanismes d'induction de cette tolérance sont une déplétion des lymphocytes T, un arrêt de la maturation des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques, une déviation des cytokines vers un profil Th2 (augmentation d'IL10 et diminution d'IFNγ) (Thomas et al., 2000). Hutchings et coll ont suggéré que les cellules NKT productrices d'IL10, présentes dans les ganglions lymphatiques des animaux tolérant leur greffon, pourraient jouer un rôle dans cette tolérance (Hutchings et al., 2003). Cependant, un tel procédé efficace pour les transplantations d'organes vascularisés ne semble pas agir dans la cas de greffe cellulaire comme la greffe d'îlots, puisque, malgré une déviation vers un profil Th2, les singes traités par FN18-CRM9 et DSG ont tous développés un rejet aigu et ont une réponse proliférative positive contre le donneur (Contreras et al., 2003; Thomas et al., 2001).

Enfin, Myburgh et coll ont développé un modèle d'induction de tolérance en combinant une irradiation lymphoïde totale et l'administration d'anticorps anti-CD3 couplé à l'immunotoxine Idarubicine (Myburgh et al., 2001). Ce traitement a permis d'obtenir une tolérance durable (>10 ans) chez des singes transplantés rénaux et hépatiques. Cette tolérance est caractérisée par une diminution de la synthèse d'IL2 et de son récepteur, une absence de réponse proliférative *in vitro* contre le donneur, la présence dans le sérum des singes tolérants d'une IgG inhibitrice d'une culture cellulaire mixte et, dans le sang, de cellules suppressives non spécifiques du donneur.

b) La molécule CD2

La molécule CD2, exprimée sur les lymphocytes T et les cellules NK, a été la première connue pour amplifier le signal dépendant du TCR, lorsqu'elle se lie à LFA-3 présent sur les CPA. Chez l'Homme, un anticorps ciblant spécifiquement CD2 (BTI-322) détruit la majeure partie des cellules T activées et inhibent l'activation de celles qui ont résisté à la déplétion. Son efficacité *in vivo* a été démontrée en réduisant l'incidence des épisodes de rejet aigu (Besse et al., 1997) et dans la cas de GVHD consécutive à des greffes de moelle osseuse ou de cellules souches (Przepiorka et al., 1998). Plus récemment, un nouvel anticorps anti-CD2 prolonge la survie d'une greffe rénale chez le primate (Dehoux et al., 2000).

De même, le traitement par une protéine de fusion LFA-3Ig (Alefcept) a montré des résultats prometteurs dans le psoriasis chez l'Homme en réduisant les plaques observées (Ellis and Krueger, 2001) et dans un modèle de greffe cardiaque chez le singe (Kaplon et al., 1996).

c) La molécule CD4

La molécule CD4 est un corécepteur qui consolide l'interaction du TCR avec le complexe CMH/peptide en se liant à la molécule CMH de classe II. De multiples anticorps murins anti-CD4 ont été développés, certains avec des propriétés déplétantes (cM-T412, B-F5, BL4, Max.16H5), d'autres non (OKT4A, TRX1). Chez le primate, les résultats obtenus sont relativement modestes que ce soit dans un modèle de greffe rénale (Cosimi et al., 1990) ou de maladies autoimmunes (Rose et al., 1987). Chez l'Homme, l'effet des anticorps anti-CD4 a surtout été étudié chez des patients atteints par une maladie autoimmune telle que l'arthrite rhumatoïde (Moreland et al., 1995) ou encore la sclérose en plaque (van Oosten et al., 1997). En transplantation, deux études ont été publiées pour le rein (Dantal et al., 1996) et le coeur (Meiser et al., 1994). Que ce soit pour les maladies

autoimmunes ou en transplantation, les résultats sont modérés et l'effet souvent transitoire.

2. *Campath-1H*

La déplétion des lymphocytes T peut être réalisée par un anticorps humanisé dirigé contre la molécule CD52 (Campath-1H ou Alemtuzumab). La molécule CD52 est présente sur les lymphocytes T et B humains ainsi que sur quelques monocytes (Hale et al., 1990) et sur les éosinophiles (Elsner et al., 1996). Les premiers essais cliniques, menés par l'équipe de Calne, ont permis de développer une stratégie constituée d'une déplétion T par Campath-1H suivie d'une minimisation de l'immunosuppression avec la CsA donnée en monothérapie (Calne et al., 1998). L'anticorps anti-CD52 induit une rapide lymphopénie T et B en périphérie et dans les organes lymphoïdes secondaires. Sur les 13 patients greffés rénaux de cette étude, seuls 2 ont connu un épisode de rejet aigu, les autres ayant gardé une bonne fonction rénale sous faible dose de CsA. Enfin, la déplétion massive des lymphocytes T ne provoque pas plus d'infections ou de tumeurs. Ces résultats encourageants ont permis de mettre en place deux essais cliniques, actuellement en cours, en associant Campath-1H avec du sirolimus ou du tacrolimus et du MMF (Matthews et al., 2003). Cependant aucune tolérance n'a pu être induite jusqu'alors. De plus, des travaux de Kirk ont montré qu'un court traitement par Campath-1H couplé avec des corticostéroïdes entraînait, malgré la lymphopénie, un rejet aigu dû à un infiltrat de monocytes/macrophages activés entre la 3^e et la 4^e semaine post-greffe (Kirk et al., 2003). Afin de bloquer aussi cet infiltrat macrophagique, l'utilisation de la DSG combinée au Campath-1H a été testée. Mais, ce traitement n'empêche pas la survenue du rejet aigu (Elster et al., 2004).

3. *Sérum anti-lymphocytaire*

Une autre méthode consiste à utiliser des anticorps polyclonaux, comme les sérums anti-lymphocytaires (SAL), pour éliminer massivement les lymphocytes. Depuis la découverte des effets immunosuppresseurs des SAL (Gray et al., 1964; Waksman et al., 1961; Woodruff and Anderson, 1963), de multiples modèles expérimentaux pour induire une tolérance ont été publiés. Même si certaines études chez la souris ont montré que le SAL seul pouvait promouvoir des cellules régulatrices (Maki et al., 1982) et la survie d'une allogreffe (Gotoh et al., 1988), les voies de recherche se sont plutôt attachées à coupler les effets des SAL avec d'autres traitements.

Une des principales voies explorées par Lance et Medawar chez la souris (Lance and Medawar, 1969), a été la combinaison d'un traitement anti-lymphocytaire et l'injection intraveineuse de cellules de moelle osseuse du donneur. Contrairement aux modèles expérimentaux chez les rongeurs, ce modèle SAL/greffe de moelle osseuse testé chez le primate en transplantation rénale (Kawai et al., 2002; Thomas et al., 1983) et hépatique (Myburgh et al., 1971) a donné des résultats plutôt mitigés et n'a pas permis d'induire une tolérance. En 1983, Thomas et coll montrèrent que des singes ayant reçu une double greffe rein/moelle osseuse et un traitement à base de SAL de lapin pendant 5 jours développaient une tolérance spécifique du donneur (Thomas et al., 1983). Cette tolérance a été associée à l'émergence, à partir des cellules de la moelle osseuse, de cellules suppressives, appelées cellules « veto », ayant un phénotype caractéristique des cellules NK (CD2+, CD8+, CD16+, CD3-, HLADR-, CD38-) (Thomas et al., 1991). Malgré une survie à long terme du greffon sans immunosuppression, s'installe un rejet chronique lié à la production d'anticorps anti-donneur. Contrairement aux résultats reportés chez les rongeurs par Hayamizu (Hayamizu et al., 1999) ou Higuchi (Higuchi et al., 2002), une irradiation totale en plus du protocole de base ne permet pas d'induire une tolérance (Kawai et al., 2002). Chez l'Homme, cette combinaison SAL plus injection de cellules de la moelle osseuse a donné des résultats encourageants, mais pas de tolérance (Barber et al., 1991; Millan et al., 2002; Monaco et al., 1976).

Une deuxième voie de tentative d'induction de tolérance avec un traitement à base de SAL a été explorée en injectant dans le thymus, 2 à 3 semaines avant la greffe, des cellules du donneur. Mais cette approche thérapeutique couronnée de succès chez le rongeur (Kline et al., 1993), ne semble pas adaptée pour l'Homme. En effet, un délai de 3 semaines entre l'injection intrathymique et la greffe est nécessaire pour induire une tolérance chez l'animal et ne peut être envisagé en clinique. Goldstein et coll ont montré qu'un intervalle de 24h entre l'injection et la greffe rénale n'induisait aucune tolérance (Goldstein et al., 1996). De même, dans un modèle de greffe de peau chez le primate, aucune tolérance ou même prolongation de survie n'a été obtenue, mais au contraire une sensibilisation (Jonker et al., 2001).

Enfin, malgré des résultats prometteurs chez le rongeur (Hayamizu et al., 1998; Sirak et al., 1997), l'association des SAL avec des transfusions du sang du donneur n'a, à ce jour, pas abouti à une acceptation à long terme d'une allogreffe (Cho et al., 1983).

C. Mise en place d'un chimérisme

La troisième stratégie pour induire une tolérance est la mise en place d'un état chimérique en injectant des cellules de la moelle osseuse du donneur avant la transplantation d'organes.

1. Définitions et mécanismes

Le chimérisme est défini comme la présence de cellules étrangères chez un individu. On en distingue deux types (Wekerle, 2001). Lorsque les cellules du donneur représentent moins d'1% des cellules, on parle de microchimérisme. Il peut se produire spontanément après une greffe d'organe, mais son rôle dans la tolérance reste très controversé (Reinsmoen et al., 1999; Strober et al., 2000). Quand le nombre des cellules du donneur est supérieur à 1%, on parle de macrochimérisme (Wekerle, 2001). Notons qu'il existe deux

formes distinctes de macrochimérisme : un chimérisme complet correspondant à l'ensemble des cellules hématopoïétiques d'origine du donneur et un chimérisme mixte, lorsque les cellules du receveur et du donneur coexistent. Le chimérisme complet est obtenu après un conditionnement myéloablatif, telle qu'une irradiation totale, qui détruit toutes les cellules hématopoïétiques du receveur et par la reconstitution de son système hématopoïétique par une greffe de cellules de la moelle osseuse du donneur. Ce traitement myéloablatif permet à la fois d'éliminer toutes les cellules (immunitaires et souches) du receveur et de créer une immunosuppression suffisante pour recevoir la greffe, aboutissant ainsi à une tolérance. Cependant, ce protocole est associé à une morbidité accrue due à de multiples infections et à des GVHD sévères (Diaconescu et al., 2004). D'autres approches ont donc été mises en place et notamment des traitements non myéloablatifs qui permettent d'établir un macrochimérisme mixte (Diaconescu et al., 2004). Ces traitements non myéloablatifs font intervenir plusieurs mécanismes (tableau 1).

Délétion centrale	Irradiation thymique locale Migration des cellules du donneur vers le thymus
Délétion périphérique	Anticorps déplétants (ex SAL) Cyclophosphamide
Anergie	Immunosuppresseurs Cellules de moelle osseuse Blocage des signaux de costimulation
Immunodéviation	Cellules de moelle osseuse
Suppression	Cellules de moelle osseuse

Tableau 1 : Principaux mécanismes impliqués dans la mise en place d'un chimérisme par traitement non myéloablatifs.

La tolérance induite par chimérisme est dépendante de la présence des cellules dendritiques du donneur dans le thymus. En effet les cellules du donneur migrent vers le thymus où elles vont participer à la sélection des lymphocytes T naïfs. Ainsi les thymocytes dont le TCR reconnaissent avec une forte affinité les antigènes du donneur sont éliminés (délétion centrale). Mais, à cause du renouvellement des cellules dendritiques, un stock de cellules de la moelle osseuse du donneur devrait être présents tout au long de la vie de l'individu. Or des études montrent que l'état chimérique est souvent transitoire et que la tolérance est maintenue malgré la disparition des cellules du donneur (Kampinga et al., 1990). Par conséquent, d'autres mécanismes doivent probablement entrer en jeu. En effet, certains travaux ont montré que les cellules de la moelle osseuse avaient la capacité de rendre anergiques des lymphocytes T (anergie) (Jin et al., 2002). A leur tour, ces cellules anergisées inhibent le développement de lymphocytes T cytotoxiques (suppression). De même, les cellules de la moelle osseuse semblent polariser les cellules T vers un profil de type Th2 avec la production des cytokines dites anti-inflammatoires (IL4, IL5, IL6, IL10, IL13) et l'expression du récepteur CCR3 (immunodéviation) (Jin et al., 2000). Enfin, la délétion thymique des lymphocytes T spécifiques du donneur n'est pas parfaite et laisse échapper des cellules alloréactives présentes au moment de la transplantation. C'est pourquoi une action en périphérie est nécessaire dès le jour de la greffe. Elle passe par une immunosuppression globale par des inhibiteurs de la calcineurine (CsA ou tacrolimus), une déplétion assurée par des anticorps ou des sérums cytotoxiques, une irradiation thymique locale (TLI) ou l'injection de cyclophosphamide, ou parfois, le blocage des signaux de costimulation (Pelot et al., 1999; Sharabi and Sachs, 1989; Wekerle et al., 2003).

2. Protocoles d'induction de tolérance par induction d'un chimérisme

Pour l'application clinique en transplantation d'organes, il était essentiel de mettre en place des protocoles non toxiques (et donc non myéloablatifs) et ne commençant pas avant le jour de la greffe pour s'adapter non seulement aux greffes à partir de donneurs

vivants mais aussi à partir de cadavres. Deux équipes ont principalement travaillé sur le développement de tels protocoles d'induction de tolérance dans des modèles précliniques ou des essais cliniques.

Chez le primate, l'équipe de Sachs et Cosimi a obtenu une tolérance dans un modèle d'allogreffe de rein avec un protocole indiqué sur la figure 3 (Cosimi and Sachs, 2004).

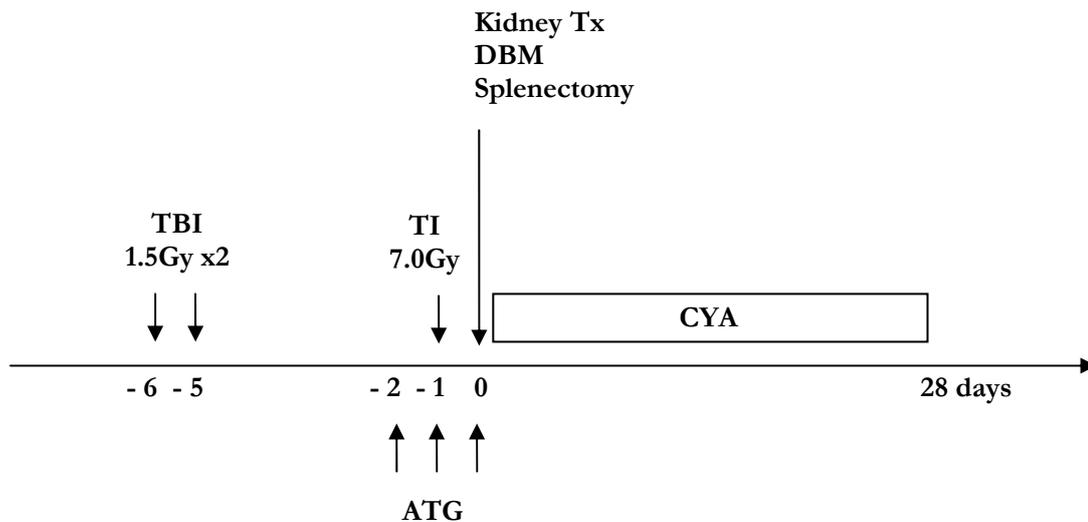


Figure 3 : Modèle d'induction de tolérance à une allogreffe rénale chez le primate développé par Sachs et Cosimi.

D'après (Cosimi and Sachs, 2004). TBI : Total Body Irradiation ; TI : Thymic Irradiation ; ATG : Anti-ThymoGlobulin ; CYA : Cyclosporine A ; DBM : Donor Bone Marrow, Tx: transplantation

Au cours de leurs travaux, ils ont comparé les effets d'un sérum anti-lymphocytaire (SAL) avec un anticorps anti-CD2. Ils ont pu ainsi mettre en évidence que le SAL, malgré une moins profonde déplétion en cellules T, améliorait la tolérance probablement en inhibant plus longtemps la fonction des cellules NK (Kawai et al., 2000). Afin de savoir si cet état de tolérance pouvait permettre à une autre greffe d'être acceptée à long terme, des îlots pancréatiques provenant du même donneur ont été greffés aux singes tolérants et

rendus diabétiques artificiellement par injection de streptozotocine (Kawai et al., 2001). Bien que les animaux soient redevenus diabétiques 300 jours après la greffe, des îlots viables ont été retrouvés dans le foie et sous la capsule rénale sans signe de rejet, suggérant plutôt une trop faible quantité d'îlots greffés. Toutefois il ne peut pas être exclu que les mécanismes impliqués dans un rejet d'organe vascularisé et celui de cellules soient différents et donc plus ou moins sensibles à ce type de traitement. Par conséquent, si ces résultats très prometteurs confirment l'efficacité de ce protocole pour induire une tolérance, il ne semble pas pouvoir être adapté à toutes les transplantations d'organes. En effet, dans un modèle de cœur, Kawai et coll ont observé, malgré la présence d'un chimérisme, le développement de réponses humorale et cellulaire contre le donneur provoquant un rejet du greffon (Kawai et al., 2002). Enfin, afin d'adapter ce protocole pour des essais cliniques, la splénectomie, essentielle pour réduire en périphérie les lymphocytes T et B du receveur, a été remplacée par l'injection d'anticorps anti-CD154 (Kawai et al., 2004). Les résultats ont montré que cet anticorps améliorait la prise de la greffe de moelle osseuse chez tous les animaux mais que seuls 50% des singes toléraient leur greffon.

Un tel protocole d'induction de tolérance a été testé en clinique chez deux patientes présentant une grave insuffisance rénale consécutive à des myélomes, en remplaçant l'irradiation lymphoïde totale par une injection de cyclophosphamide. Ces patientes avaient, après un chimérisme transitoire, une bonne fonction rénale sans immunosuppression et sans signe de rejet (Cosimi and Sachs, 2004). De plus, la greffe de moelle osseuse, avec son effet anti-tumoral, a permis de réduire le myélome. Toutefois, il est important de signaler que ces deux patientes ont reçu une greffe CMH-compatible. Mais, ces résultats ont encouragé la mise en place d'une étude similaire, actuellement en cours, dans le cas de greffes CMH-incompatibles (Cosimi and Sachs, 2004). Strober a aussi rapporté le cas d'un patient transplanté rénal tolérant depuis plus de 10 ans ayant reçu un conditionnement non myéloablatif comprenant une TLI, un SAL et des corticostéroïdes suivi par une greffe de moelle osseuse (Strober et al., 2000). Il n'a été détecté ni trace de chimérisme ni réponse contre le donneur. Enfin, des essais cliniques ont été réalisés en

injectant des cellules souches CD34+, au lieu de cellules de moelle osseuse, chez des patients greffés rénaux conditionnés avec une TLI, un SAL, de la CsA et des corticostéroïdes (Millan et al., 2002). Malheureusement, bien qu'un chimérisme ait été constaté, l'arrêt de l'immunosuppression a provoqué des rejets aigus.

III. La tolérance « opérationnelle »

En clinique, la tolérance est définie comme l'acceptation à long terme d'un greffon sans immunosuppression ou sous une dose minimale d'immunosuppresseurs (Calne et al., 1998; Cortesini and Suci-Foca, 2004). Tolérance opérationnelle, partielle, métastable ou « quasi » tolérance sont autant de termes utilisés pour désigner de tels patients (Cortesini and Suci-Foca, 2004).

Le foie est considéré comme un site immunologiquement « privilégié », puisque les compatibilités du CMH ne semblent pas contribuer au phénomène de tolérance spontanée et que l'incidence des rejets est faible (Calne et al., 1969; Opelz et al., 1999). Des protocoles d'arrêt total ou de minimisation du traitement immunosuppresseur ont donc été mis en place en transplantation hépatique (Calne et al., 1998; Devlin et al., 1998; Starzl et al., 1993; Takatsuki et al., 2001). Mais à cause du manque de critères de la tolérance, il est difficile de connaître les patients chez qui la réduction du traitement ne représenterait aucun risque de rejet. Diverses études ont tenté d'établir une « signature » et, par la même occasion, de comprendre les mécanismes intervenant dans les phénomènes de maintien de la tolérance chez l'Homme. Récemment, il a été montré, chez des patients greffés hépatiques sans traitement, un profil distinct de celui d'un individu sain à savoir une augmentation des lymphocytes B, des cellules T CD4+CD25hi et du ratio V δ 1/V δ 2 combinée à une diminution des cellules NK et NKT (Li et al., 2004). Le rôle exact de ces changements phénotypiques reste toutefois à démontrer. De plus, Vanbuskirk et coll, grâce à une nouvelle méthode, le « trans vivo DTH assay », ont montré, chez trois patients tolérants (greffes rénale et hépatique) sur quatre, la présence d'une régulation active vis-à-vis des antigènes du donneur et dépendante du TGF β ou de l'IL10 (VanBuskirk et al., 2000). Cette méthode, utilisée sur 8 patients en majorité sous immunosuppression et avec une fonction hépatique stable, a révélé que 50% de ces patients présentaient une régulation, suggérant ainsi que ce test pourrait être envisagée en clinique pour détecter une tolérance (Geissler et al., 2001).

Même si la « tolérance opérationnelle » concerne plus fréquemment la transplantation hépatique (environ 30% des greffés hépatiques), il existe quelques rares cas de patients « opérationnellement tolérants » en transplantation rénale (Burlingham et al., 1995; Christensen et al., 1998; Fischer et al., 1996; Strober et al., 2000). Burlingham et coll ont décrit, chez un patient tolérant ayant reçu une greffe rénale familiale, une faible réponse cytotoxique contre les antigènes du donneur, due à la présence d'un microchimérisme, alors que la réponse proliférative anti-donneur reste normale (Burlingham et al., 1995). Au contraire, une étude plus récente a montré qu'un microchimérisme n'était pas nécessaire au maintien de la tolérance (Strober et al., 2000). Christensen et coll décrivent aussi un cas de tolérance à une greffe rénale familiale (3 ans sans traitement immunosuppresseur) où il n'y avait pas de réponse proliférative contre les antigènes du donneur (Christensen et al., 1998). Enfin, des cas de tolérance sont observés à la suite d'un arrêt des immunosuppresseurs, décidé pour raison médicale comme le développement d'un lymphôme. Deux études ont trouvé, chez ces patients, une corrélation entre leur état de tolérance et la présence d'IL10 d'origine virale (Birkeland et al., 1999; Nast et al., 1997).

IV. Les cellules T régulatrices humaines

Comme cela a été déjà évoqué dans les chapitres précédents, il existe plusieurs mécanismes intervenant aussi bien dans la phase d'induction que dans le maintien d'un état de tolérance. L'un de ces mécanismes passe par une régulation active de la réponse immune par l'intermédiaire de cellules dites suppressives ou régulatrices. Une cellule suppressive ou régulatrice est une cellule possédant la capacité d'inhiber la fonction d'autres cellules (Wood and Sakaguchi, 2003). Je me concentrerai, dans ce chapitre, principalement sur les lymphocytes T régulateurs décrits chez l'Homme (tableau 2).

Nom	Mécanismes	Naturelles/ induites	Pathologies	Références
Treg	Contact dépendant	Naturelles	Maladies autoimmunes cancers, allergies, transplantation	(Taams et al., 2003)
Tr1	IL10 dépendant	Induites	Transplantation, infections chroniques, maladies autoimmunes	(Groux et al., 1997)
Th3	TGFβ dépendant	Induites	Maladies autoimmunes	(Kitani et al., 2000)
T CD8+ type 1	Contact dépendant	Induites	Transplantation	(Suciu-Foca et al., 2003)
T CD8+ type 2	IL6 et IFNγ dépendant	Induites	Maladies autoimmunes	(Filaci and Suciu- Foca, 2002)
T CD8+ type 3	IL10 (voire TGFβ) dépendant	Induites	Infections chroniques	(Gilliet and Liu, 2002).
NKT	?	?	Maladies autoimmunes cancers, infections virales	(van der Vliet et al., 2002)
T anti-idiotypiques et anti-ergotypiques	Cytokine-dépendant Cytotoxicité	Induites	Maladies autoimmunes (après vaccination)	(Hellings et al., 2004)

Tableau 2 : Récapitulatif des différentes populations cellulaires de lymphocytes T régulateurs chez l'Homme.

A. Les cellules T CD4+

On distingue plusieurs types de cellules régulatrices parmi les lymphocytes T CD4+ selon si elles sont naturelles (T CD4+CD25+) (Dieckmann et al., 2001) ou induites (Tr1 (Groux et al., 1997) et Th3 (Weiner, 2001)). D'abord découvertes dans des modèles animaux, elles sont maintenant largement étudiées chez l'Homme.

1. *Les cellules T CD4+CD25+ naturelles*

a) Origine et localisation

Plusieurs expériences réalisées dans des modèles animaux suggèrent que les cellules T CD4+CD25+ naturelles sont d'origine thymique (Fehervari and Sakaguchi, 2004). Au cours de la formation du répertoire des lymphocytes T dans le thymus, les thymocytes dont le TCR interagit avec les molécules CMH du soi exprimés sur les cellules cortico-épithéliales thymiques sont sélectionnés positivement, puis négativement si elles reconnaissent les antigènes du soi présentés par les molécules du CMH portées par les cellules dendritiques. Au contraire, les thymocytes qui sont incapables d'interagir avec les molécules de CMH du soi ou qui reconnaissent les antigènes du soi sur les cellules dendritiques sont éliminés. Des études chez la souris ont montré que les cellules T CD4+CD25+ régulatrices avaient une affinité intermédiaire pour ces complexes CMH II/peptides entraînant ainsi leur anergie et non leur délétion (Jordan et al., 2001). Chez l'homme, l'origine thymique des cellules T CD4+CD25+ est confirmée par la présence de thymocytes CD4+CD25+ (approximativement 10%) possédant des capacités suppressives chez l'adulte (Annunziato et al., 2002; Stephens et al., 2001) et au niveau du fœtus (dès la 13^{ème} semaine de gestation) (Darrasse-Jeze et al., 2005).

Chez un individu sain, ces cellules représentent 5 à 15% des lymphocytes T CD4+ circulantes et leur nombre diminue avec l'âge (Tsaknaridis et al., 2003). On les trouve dans

le sang périphérique, dans le sang de cordon, le thymus et les organes lymphoïdes secondaires (rate, amygdales) (Godfrey et al., 2004; Taams et al., 2003).

b) Caractéristiques phénotypiques

La caractérisation phénotypique des cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices est essentielle notamment dans le but de déterminer un ou des marqueur(s) spécifique(s) de ces cellules. La molécule CD25, correspondant à la chaîne α du récepteur à l'IL2 et étant inductible après l'activation d'un lymphocyte T CD4⁺ naïf, ne permet pas de distinguer, sur ce seul critère, une cellule régulatrice d'une cellule activée. Baecher-allan et coll ont montré qu'une distinction pouvait cependant se faire selon l'intensité de l'expression de CD25 (Baecher-Allan et al., 2001). Chez l'Homme, seules les cellules T CD4⁺ qui expriment fortement le CD25 (CD4⁺CD25^{hi}) possèderaient des propriétés suppressives, alors qu'un niveau intermédiaire de CD25 (CD4⁺CD25^{lo}) correspondrait aux lymphocytes activés. Toutefois, Tsaknaridis et coll ont récemment démontré que les cellules CD4⁺CD25^{lo} avaient aussi des capacités suppressives (Tsaknaridis et al., 2003).

Le phénotype activé ou mémoire des cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices est renforcé par l'expression des marqueurs CD45RO, CD122, CD71, GITR, CTLA4 (intracellulaire et extracellulaire) ainsi que par la présence de télomères courts suggérant de multiples divisions (Baecher-Allan et al., 2001; Tsaknaridis et al., 2003; Wing et al., 2002). Toutefois, elles n'expriment pas les marqueurs CD69, CD154 et peu d'HLA-DR, ce qui correspond plutôt à un phénotype naïf (Baecher-Allan et al., 2001; Levings et al., 2001b). Elles sont sensibles à l'apoptose du fait de la faible expression de la molécule anti-apoptotique bcl-2 et de la présence en surface de CD95 (Taams et al., 2001; Wing et al., 2002). Par conséquent, les cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices ont un phénotype intermédiaire mémoire/naïf. Si l'on considère la distinction observée par Baecher-Allan, la plupart de ces molécules (CD45RO⁺, CD95⁺, CD45RB^{lo}) sont exprimées de manière équivalente sur les cellules CD4⁺CD25^{hi} et CD4⁺CD25^{lo} excepté CTLA4 et CD122 que l'on retrouve

majoritairement sur les cellules CD4⁺CD25^{hi} (Wing et al., 2002). Ces deux molécules seraient donc les meilleures pour différencier ces cellules régulatrices.

De plus, les lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ régulatrices possèdent un profil chimiotactique particulier (CCR8⁺, CCR4⁺) qui leur permet d'être attirés spécifiquement par les cellules dendritiques matures localisées au niveau du site inflammatoire (Iellem et al., 2001). Mais, ces molécules ne sont pas spécifiques des cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices, puisque ces récepteurs de chimiokines sont aussi associés aux lymphocytes de type Th2 (D'Ambrosio et al., 1998). Zou et coll ont aussi montré que le trafic des cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices peut être contrôlé par les signaux CXCR4/CXCL12 (Zou et al., 2004).

Plus récemment, de nouvelles molécules spécifiques des cellules régulatrices ont été mises en évidence. Premièrement, les cellules T CD4⁺ CD25⁺ expriment naturellement le facteur de transcription FOXP3 (Walker et al., 2003). Des cellules T CD4⁺ CD25⁻ naïves transfectées avec un gène codant pour FOXP3 acquièrent le marqueur CD25 et des propriétés régulatrices (Piccirillo and Thornton, 2004). FOXP3 joue donc un rôle dans la génération des cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices, mais aussi dans leur fonction (Yagi et al., 2004). Néanmoins, contrairement aux cellules T CD4⁺CD25⁺ murines, l'activation des cellules T CD4⁺ humaines induit l'expression de ce facteur de transcription (Walker et al., 2003). Deuxièmement, Pae et coll ont montré que les cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices au repos expriment constitutivement l'hème oxygénase 1 (HO1) contrairement aux lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Pae et al., 2003). Mais, comme pour FOXP3, une stimulation polyclonale augmente l'expression de HO1 sur ces deux populations, par l'intermédiaire d'un signal dépendant de CD28. Un lien entre FOXP3 et HO1 a récemment été démontré par Choi et coll, puisque FOXP3 induirait l'expression de HO1, enzyme nécessaire au mécanisme de suppression des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ (Choi et al., 2005).

Enfin, après une stimulation, les cellules T CD4⁺CD25⁺ régulatrices sont capables de produire essentiellement du TGF β , un peu d'IL10, d'IL5, d'IL1R α , mais pas d'IFN γ , d'IL1 β ou d'IL2 (Dieckmann et al., 2001; Levings et al., 2002; Stephens et al., 2001). A noter aussi un rôle du TGF β dans leur génération (Yamagiwa et al., 2001; Zheng et al., 2002)

c) *Caractéristiques fonctionnelles*

Les cellules T CD4⁺CD25⁺ naturelles sont capables de reconnaître des antigènes d'origine différente (allogéniques, ingérés, du soi) (Taams et al., 2003). Elles sont anergiques, puisqu'elles ne répondent pas à une stimulation allogénique, polyclonale ou antigène-spécifique (Stassen et al., 2004). Cette anergie est partiellement levée avec l'IL2, l'IL15 (Dieckmann et al., 2001) ou après une forte stimulation par CD28 (Baecher-Allan et al., 2001). Une fois activées spécifiquement par l'intermédiaire de leur TCR, elles sont capables d'inhiber, de manière non spécifique, la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T CD4⁺ (Baecher-Allan et al., 2001), la prolifération et la fonction cytotoxique des lymphocytes TCD8⁺ (Camara et al., 2003), les cellules NK (Wolf et al., 2003) (Trzonkowski et al., 2004), les cellules NKT (Azuma et al., 2003), les monocytes/macrophages (Taams et al., 2005) et la maturation des cellules dendritiques (Misra et al., 2004). Le principal mécanisme d'inhibition de la prolifération semble être le blocage de la production de l'IL2 (Piccirillo and Thornton, 2004). L'absence d'IL2 au cours de la stimulation aboutit à l'anergie des cellules cibles qui acquièrent à leur tour des propriétés suppressives (voir §2). On parle alors de « tolérance infectieuse » (Stassen et al., 2004). Malgré le fait qu'elles produisent du TGFβ et de l'IL10 après une stimulation, leur mécanisme, tout du moins *in vitro*, semble indépendant de ces médiateurs solubles et nécessite un contact direct entre la cellule T CD4⁺CD25⁺ et la cellule cible, sans intermédiaire tel qu'une CPA (Piccirillo and Thornton, 2004). Mais les molécules impliquées dans cette régulation restent largement inconnues. En effet, l'implication de CTLA4, GITR ou du TGFβ membranaire est très controversée (Jonuleit and Schmitt, 2003; Piccirillo and Thornton, 2004; Taams et al., 2003). Toutefois, ces résultats contradictoires pourraient refléter le fait que les mécanismes des cellules T CD4⁺CD25⁺ puissent être différents *in vitro* et *in vivo* (Jonuleit et al., 2002).

d) Cellules T CD4+CD25+ régulatrices et pathologies

Les cellules T CD4+CD25+ étant capables de reconnaître des antigènes d'origine différente, elles peuvent être impliquées dans diverses pathologies humaines telles que les maladies autoimmunes, le développement de cancers, les phénomènes allergiques et en transplantation. Ils existent au moins deux causes, non mutuellement exclusives, pouvant conduire à ces pathologies : soit une réduction du nombre de ces cellules qui sont alors submergées par les cellules effectrices responsables de la maladie (Liyanage et al., 2002; Wolf et al., 2003; Woo et al., 2001), soit un défaut de fonctionnement de ces cellules (Balandina et al., 2004; Ehrenstein et al., 2004; Thompson and Powrie, 2004).

A côté de la présence des lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs chez un individu sain qui suggère leur rôle dans le contrôle de la réponse au soi, leur déficit a été démontrée dans des maladies autoimmunes. Les patients atteints par le syndrome d'IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked syndrome) dû à une mutation du gène codant pour FOXP3 ne possèdent aucune cellule CD4+CD25+ régulatrice naturelle et développent de multiples désordres autoimmuns (endocrinopathie autoimmune, diabète de type 1, thyroïdite) (Sakaguchi, 2003). De même, dans les cas de sclérose en plaque, de psoriasis, de syndrome autoimmun polyglandulaire de type II ou de myasthénie grave autoimmune, a été observé un défaut de l'activité régulatrice des cellules T CD4+CD25+ (Balandina et al., 2004; Sugiyama et al., 2005; Thompson and Powrie, 2004). Ehrenstein et coll ont montré, chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde active, une déficience partielle des lymphocytes T CD4+CD25+ régulateurs qui inhibent uniquement la production des cytokines pro-inflammatoires, sans empêcher la prolifération des cellules effectrices (Ehrenstein et al., 2004). Le traitement par un anticorps anti-TNF α augmente le nombre des cellules T CD4+CD25+ en périphérie et restaure leur capacité de suppression (Ehrenstein et al., 2004).

De plus, de nombreuses études ont suggéré le rôle des cellules T CD4+CD25+ régulatrices dans le développement incontrôlé de multiples cancers (épithélial (Wolf et al., 2003), pulmonaire et ovarien (Liyanage et al., 2002), pancréatique et du sein (Woo et al.,

2001). En effet, une augmentation du nombre de cellules T CD4+CD25+ régulatrices a été observée dans le sang et/ou dans l'infiltrat de la tumeur chez ces patients. Ces cellules T CD4+CD25+ sont capables d'inhiber la fonction des médiateurs responsables du rejet d'une tumeur, à savoir les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Liyanage et al., 2002) et les cellules NK (Wolf et al., 2003).

Les cellules T CD4+CD25+ régulatrices semblent aussi pouvoir contrôler les réponses allergiques. Tandis que des individus allergiques au nickel développent une réponse contre cet allergène, les lymphocytes T CD4+ d'individus non allergiques ne répondent à cette stimulation que s'ils sont déplétés en cellules CD25+ (Cavani et al., 2003). Des cellules T CD4+CD25+ actives sont retrouvées dans la peau lors d'un test cutané négatif pour le nickel. Elles ont probablement été recrutées grâce au récepteur de chimiokine CCR7 exprimé à leur surface. De même, pendant la saison des pollens, les patients allergiques montrent un défaut de régulation des cytokines Th2 (IL5 et IL13) par les lymphocytes T CD4+CD25+, sans affecter la production des cytokines Th1 comme IFN γ (Grindebacke et al., 2004).

Alors que les cellules T CD4+CD25+ régulatrices sont impliquées dans des modèles de tolérance d'allogreffe chez le rongeur (Chiffoleau et al., 2002; Kingsley et al., 2002; Wood and Sakaguchi, 2003), chez l'Homme, leur rôle est fortement suggéré dans la régulation de la voie indirecte de présentation des antigènes, puisque Salama et coll ont montré que 40% des patients greffés rénaux stables, qui n'ont jamais fait de rejet aigu, avaient une régulation dépendante des cellules CD25+ contre les peptides du CHM de classe II du donneur (Salama et al., 2003). Cette régulation apparaît au troisième mois après la greffe et persiste malgré l'immunosuppression. La génération *in vitro* de telles cellules régulatrices spécifiques d'un peptide correspondant à un CMH du donneur a été envisagée pour induire une tolérance. En effet, Jiang et coll ont récemment montré que ce type de cellules pouvaient non seulement inhiber la prolifération contre ce peptide, mais aussi par « suppression liée » (« linked suppression ») contre un autre peptide présenté sur la même CPA (Jiang et al., 2003). Au contraire, la voie directe de présentation ne semble pas être contrôlée par les lymphocytes T CD4+CD25+ (Game et al., 2003).

2. *Les cellules T CD4+ régulatrices induites*

A côté des lymphocytes T CD4+CD25+ naturels décrits précédemment, il existe des cellules suppressives induites en périphérie dont le mécanisme passe par la sécrétion de cytokines (Th3, Tr1). Jonuleit et coll ont démontré un lien entre ces différentes populations. En effet, les lymphocytes T CD4+CD25+ qui expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ induisent plutôt des lymphocytes Tr1, tandis que ceux exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ engendrent des cellules Th3 (Jonuleit et al., 2002). Dans ces deux cas, il a été observé une expression de FOXP3, suggérant donc un rôle important de ce facteur de transcription dans cette conversion (Jonuleit et al., 2002).

a) *Les lymphocytes Tr1*

Les lymphocytes Tr1 sont caractérisés par un profil de cytokines particulier, à savoir de grandes quantités d'IL10, d'IFN γ , d'IL5 mais jamais d'IL2 ou d'IL4 (Groux et al., 1997). De plus, ils possèdent des récepteurs de chimiokines de type Th1 et Th2. Ce profil est donc différent de celui des lymphocytes classiques Th1 (IFN γ) et Th2 (IL10) dont ils partagent certaines molécules. Les cellules Tr1 sont anergiques, conséquence de la sécrétion autocrine d'IL10 (Groux et al., 1997). Mais, leur capacité proliférative peut être augmentée par l'ajout exogène d'IL2 et IL15 (Bacchetta et al., 2002). Après une stimulation, elles sont capables comme un lymphocyte T naïf d'exprimer les marqueurs d'activation (CD25, CD69, CD154, HLA-DR, CTLA4) (Bacchetta et al., 2002). Elles sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4+ naïfs, la production d'Ig par les lymphocytes B et la capacité de présentation des antigènes par les monocytes et les cellules dendritiques (Cavani et al., 2000; Kitani et al., 2000). Contrairement aux cellules T CD4+CD25+ naturelles, leur fonction ne nécessite pas de contact cellulaire, mais passe par la production d'un facteur soluble, l'IL10 (Levings et al., 2001a). Ils sont spécifiques d'antigènes non

présents dans le thymus et proviennent de précurseurs périphériques que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Cottrez and Groux, 2004; Jonuleit and Schmitt, 2003).

Les lymphocytes Tr1 peuvent être générés *in vitro* à partir de cellules T CD4⁺ naïves par plusieurs méthodes nécessitant la stimulation répétée des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en présence de grandes quantités d'IL10 (Groux et al., 1997). Diverses stimulations peuvent ensuite être réalisées (cellules dendritiques immatures (Wakkach et al., 2003), anticorps anti-CD3+anti-CD46 (Kemper et al., 2003), fibroblastes murins exprimant des molécules humaines de costimulation (Levings et al., 2001a), cellules dendritiques plasmacytoïdes (Kuwana, 2002)). Plusieurs études ont montré que l'IL10 agissait sur les CPA en inhibant la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL1 β , IL6, IL12, TNF α), en diminuant les molécules de costimulation et en favorisant l'expression de molécules inhibitrices telles que ILT4 (Vlad et al., 2003; Wakkach et al., 2001). De même, l'IL10 inhibent la voie intracellulaire NF κ B responsable de la production d'IL2 dans les lymphocytes T CD4⁺ (Vigouroux et al., 2004). L'IL10 joue donc un rôle important non seulement pour la fonction des cellules Tr1 mais aussi pour leur génération. Mais la présence d'IL10 ne semble pas essentielle, puisque des lymphocytes Tr1 ont pu être générés suite à l'ajout de dexaméthasone/vitamine D3 (Barrat et al., 2002) et par activation de la voie Notch sur le lymphocyte T (Vigouroux et al., 2003).

In vivo, l'existence de ces cellules Tr1 a été démontrée chez des patients tolérant une greffe de cellules souches CMH-incompatibles, c'est-à-dire sans GVHD et sans immunosuppression. Ces cellules productrices d'IL10 sont dérivées du donneur et spécifiques des CMH du receveur (Bacchetta et al., 1994). De même, dans la greffe d'organes, des tests de DTH ont montré une régulation vis-à-vis du donneur passant par IL10 et TGF β chez des patients tolérant spontanément un greffon rénal ou hépatique (VanBuskirk et al., 2000). Des lymphocytes Tr1 spécifiques d'agents bactériens comme *Mycobacterium vaccae* ou d'helminthes semblent aussi responsables de la flambée des réponses immunes lors d'infections chroniques (Satoguina et al., 2002; Zuany-Amorim et al., 2002). De plus, certains virus, tel que le virus d'Epstein-Barr (EBV), peuvent échapper au système immunitaire en favorisant le développement de cellules Tr1 (Marshall et al.,

2003). Enfin, il est possible que les lymphocytes Tr1 jouent un rôle dans la modulation des réponses au soi, car ils sont présents dans le sang d'individu sain (Kitani et al., 2000).

b) Les lymphocytes Th3

Les lymphocytes Th3 sont caractérisés principalement par une forte sécrétion de TGF β , mais ils produisent aussi des quantités variables d'IL10 (Kitani et al., 2000). Comme pour les cellules Tr1, leur mécanisme d'action dépend d'un facteur soluble, le TGF β . La fixation de cette cytokine sur son récepteur active le complexe intracellulaire Smad qui est alors transloqué vers le noyau entraînant l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des cellules T ainsi que le blocage de la maturation des cellules dendritiques (Vigouroux et al., 2004).

Yvon et coll ont induit *ex vivo* des lymphocytes Th3 spécifiques du donneur par stimulation dépendante de Notch de cellules T naïves d'un receveur de greffe de moelle osseuse (Yvon et al., 2003). Ces cellules sont capables d'inhiber les réponses proliférative et cytotoxique dirigées contre le donneur. De plus, un traitement oral par des protéines constituantes de la myéline (MBP, PLP) chez des patients atteint de sclérose en plaque induit la génération de lymphocytes Th3 spécifiques de la MBP et de la PLP (Fukaura et al., 1996).

B. Les cellules T CD8+ suppressives

Parallèlement aux lymphocytes T CD4+, il existe des cellules suppressives dans le compartiment T CD8+. Chez l'Homme, on peut distinguer trois populations, principalement étudiées, avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles distinctes (Filaci and Suci-Foca, 2002).

1. *Les cellules T CD8+ suppressives (Ts) de type 1*

Ces cellules T CD8+ suppressives (Ts) ont perdu le marqueur CD28, expriment le facteur de transcription FOXP3 et sécrètent de l'IFN γ , un peu d'IL2 mais pas d'IL4 ou d'IL10 (Ciubotariu et al., 1998a; Manavalan et al., 2004). Elles ont, dans un premier temps, été générées *in vitro* contre des CPA autologues chargées avec des peptides de la toxine tétanique ou des molécules de CMH de classe II (Jiang et al., 1998), contre des CPA allogéniques (Liu et al., 1998) ou xénogéniques (Ciubotariu et al., 1998a). Elles sont spécifiques de l'antigène qui les a générées et donc auraient la capacité d'inhiber les voies directe et indirecte de présentation des antigènes du donneur en transplantation. Leur répertoire est restreint (Pennesi et al., 1999).

L'effet suppresseur des cellules Ts passe par une tolérogénisation des CPA professionnelles (cellules dendritiques) et semi-professionnelles (cellules endothéliales) qui induisent ensuite l'anergie des lymphocytes Th (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2004). La tripartite CPA/Ts/Th est obligatoire. En effet, le lymphocyte Ts en reconnaissant des molécules de CMH de classe I sur la CPA bloque la voie de signalisation NF κ B dépendante de CD40 (Li et al., 1999) (figure 4). Ainsi, l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 induites normalement au cours de la maturation de la CPA est inhibée. En l'absence du second signal, le lymphocyte Th qui reconnaît des complexes CMH de classe II/peptide sur la même CPA devient alors anergique (Jiang et al., 1998; Li et al., 1999). Au cours du processus de tolérogénisation de la CPA, il y a aussi une augmentation des molécules membranaires ILT3 et ILT4 (immunoglobulin-like transcripts) (Chang et al., 2002), récepteurs qui inhibent l'activation des monocytes/macrophages et cellules dendritiques. Ces deux molécules semblent caractéristiques des CPA tolérogènes (Manavalan et al., 2003). Mais le lien entre ILT3, ILT4 et CD40 reste inconnu. L'hypothèse avancée serait une activation de phosphatases dépendante des molécules ILT3 et ILT4 qui modèleraient la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B (Suciu-Foca et al., 2003). Manavalan et coll ont récemment démontré que les lymphocytes Th anergiques générés par les cellules Ts expriment les marqueurs CD25

et CD45RO et présentent des propriétés régulatrices (Manavalan et al., 2003). En effet, ces lymphocytes T CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ induisent, à leur tour, de nouvelles CPA tolérogènes ILT3⁺ ILT4⁺ et ainsi de suite ...

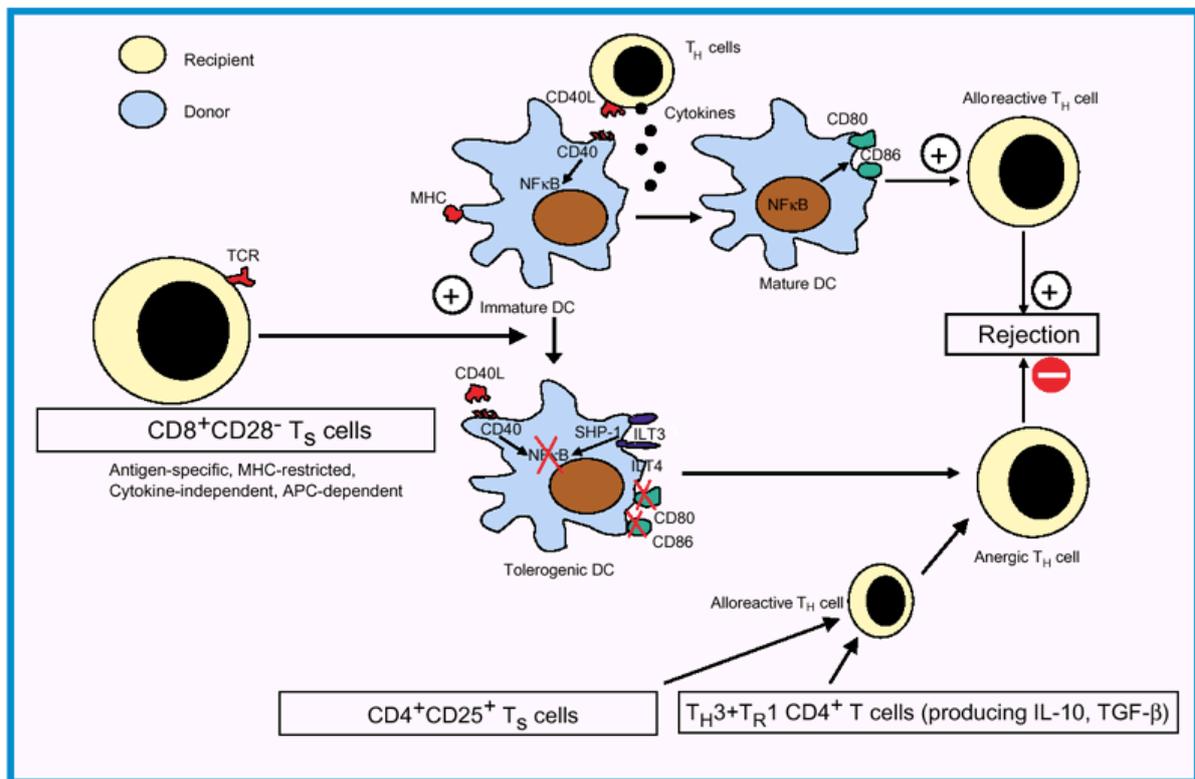


Figure 4 : Mode d'action des lymphocytes Ts lors d'une greffe.

Les lymphocytes Ts du receveur inhibent l'activation de NFκB dans les cellules dendritiques du donneur qui deviennent alors tolérogènes (ILT3⁺ ILT4⁺ CD80⁻ CD86⁻). Ces dernières anergisent les lymphocytes Th alloréactifs du receveur. D'après (Feinberg and Silvestri, 2002)

De ce mode d'action a été mise au point une méthode de détection des cellules Ts dans le sang de patients greffés (cœur, rein, foie) (Ciubotariu et al., 1998b; Colovai et al., 2003). Elle consiste en une mesure en cytométrie de flux de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 sur la CPA du donneur quand elle est incubée avec les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ et les Th du receveur (ou une lignée Jurkat transfectée par

CD40L) (Liu et al., 1998). Cette méthode a permis de montrer, chez des patients greffés rénaux et hépatiques, que la présence de cellules Ts dans les premiers mois qui suivent la transplantation, est inversement corrélée à une alloréactivité contre les peptides du CMH du donneur (et donc au rejet chronique). Il en a découlé, chez les patients qui présentaient de telles cellules, une diminution réussie de leur traitement immunosuppresseur (Ciubotariu et al., 1998b).

2. Les cellules T CD8+ suppressives de type 2

En 1995, Balashov et coll ont montré que des cellules T CD8+ cultivées en présence de monocytes autologues, d'IL2 et de GM-CSF développaient des capacités suppressives (Balashov et al., 1995). Elles ont un phénotype de cellules effectrices (CD28-, CD27+, CD45RA+, CCR7-, IL10R α +) (Filaci et al., 2004), sont non spécifiques de l'antigène, peu prolifératives, non cytotoxiques et exercent leur fonction régulatrice par l'intermédiaire de l'IFN γ et de l'IL6 (Filaci et al., 2001). Leur génération est dépendante de la sécrétion d'IL10 par les monocytes stimulée par le GM-CSF (Filaci et al., 2001). Ces cellules T CD8+ inhibent les réponses proliférative et cytotoxique des lymphocytes T. Cependant, il est impossible de générer de telles cellules à partir des lymphocytes T CD8+CD28- de patients en rechute avec une sclérose en plaque (Balashov et al., 1995) ou un lupus (Filaci et al., 2001). Ces cellules sont diminuées dans le sang de ces patients. Deux hypothèses sont évoquées : une déplétion et/ou une fuite de ces précurseurs du sang vers les tissus ou les ganglions lymphatiques (Filaci and Suci-Foca, 2002).

3. Les cellules T CD8+ suppressives de type 3

Enfin, des études ont découvert une dernière population de lymphocytes T CD8+ fonctionnant comme les cellules Tr1. Gilliet et coll les ont générés en incubant des lymphocytes T CD8+ naïfs avec des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC ou DC2)

activées (Gilliet and Liu, 2002). Ils ont obtenu 10 à 20% de cellules T CD8+ peu prolifératives, peu cytotoxiques et produisant de grandes quantités d'IL10, peu d'IFN γ et pas d'IL2, d'IL4 ou de TGF β . Elles sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD8+ par l'intermédiaire de l'IL10. Comme pour les lymphocytes Tr1, cette cytokine est non seulement importante pour leur fonction suppressive mais aussi pour leur génération. Plus récemment, Accapezzato et coll ont montré que des patients atteints par une infection chronique par le virus de l'hépatite C (HCV) possèdent, dans leur foie, une population de lymphocytes T CD8+CCR7-CD27-CD28-IL10+, peut-être générés grâce aux cellules pDC2 présentes dans des foies inflammés (Accapezzato et al., 2004). Ces cellules suppressives seraient capables de contrôler les réponses des cellules T CD8+ effectrices dirigés contre le virus présentes aussi chez ces malades. Enfin, de telles cellules T CD8+ suppressives ont été obtenues après l'injection de cellules dendritiques myéloïdes (DC1) immatures pulsées par le virus de la grippe (Dhodapkar et al., 2001).

C. Les cellules NKT

Les cellules NKT humaines constituent une population hétérogène possédant des caractéristiques phénotypiques partagées par les cellules NK et les lymphocytes T (van der Vliet et al., 2002). Elles expriment un TCR invariant constitué des segments V α 24 et V β 11 et des marqueurs NK tels que CD161. Elles peuvent être CD4+CD8-, CD8+CD4- ou CD4-CD8-. Elles reconnaissent des CMH de classe I non classique (CD1d) qui présentent l' α -galactosylcéramide (Godfrey et al., 2000). Les cellules NKT sont divisées en deux groupes fonctionnellement distincts : la sous-population CD4- qui produit essentiellement des cytokines Th1 et qui possède une activité cytotoxique et la sous-population CD4+ qui sécrète des cytokines Th1 et Th2 en grande quantité (Lee et al., 2002). La stimulation des cellules NKT entraîne une production rapide de cytokines (van der Vliet et al., 2002) qui leur permet d'influencer ou d'aider les cellules NK (Carnaud et al., 1999), les lymphocytes B (Galli et al., 2003) et les cellules dendritiques (Yang et al., 2000). Elles exercent

d'importantes fonctions effectrices dans l'immunité contre le cancer et contre des agents pathogènes (Crowe et al., 2002; Gumperz and Brenner, 2001).

Récemment, Ho et coll ont montré que les cellules NKT CD8 $\alpha\alpha$ + humaines étaient capables d'inhiber *in vitro* la prolifération de lymphocytes T (Ho et al., 2004). De même, une étude chez le primate a montré que des cellules NKT CD4-CD8- d'origine splénique possédaient des propriétés régulatrices (Gansuud et al., 2003). Un défaut des cellules NKT circulantes (du nombre et/ou de leur fonction) a été montré dans de nombreuses maladies autoimmunes comme le diabète de type I (Wilson et al., 1998), l'arthrite rhumatoïde (Kojo et al., 2001), la sclérose en plaque (Araki et al., 2003; Illes et al., 2000), la granulomatose de Wegener et la polychondrite chronique atrophiante (Takagi et al., 2004).

D. Les cellules T anti-idiotypiques et anti-ergotypiques

La vaccination par des cellules T autoréactives atténuées a montré, *in vitro* et *in vivo* dans des modèles expérimentaux de maladies autoimmunes, qu'elle pouvait entraîner une régulation (Ben-Nun et al., 1981). Lider et coll ont été les premiers à montrer, dans un modèle expérimental de sclérose en plaque après vaccination, la présence de cellules T régulatrices CD4+ et CD8+ dirigées contre des clones autoréactifs (Lider et al., 1988). Ces cellules régulatrices sont appelées anti-idiotypiques ou anti-clonotypiques. Par la suite, les travaux se sont multipliés et ont permis de révéler un réseau complexe de cellules T régulatrices anti-idiotypiques (Jiang and Chess, 2000; Kumar et al., 1997; Panoutsakopoulou et al., 2004). Ces cellules reconnaissent des peptides situés dans la région hypervariable du TCR et sont donc spécifiques d'un clone. De plus, la vaccination par des cellules T autoréactives atténuées peut induire d'autres cellules régulatrices, spécifiques de tous les lymphocytes T activés; ce sont des cellules T anti-ergotypiques (Lohse et al., 1989). Un ergotope est une molécule exprimée et présentée uniquement par des lymphocytes T activés (non par les cellules naïves) et capable d'activer les cellules régulatrices anti-ergotypiques (Lohse et al., 1989). Les peptides ergotypiques proviennent du TCR, du CD25, de l'HSP60 ou de récepteurs au TNF (Mor et al., 1996; Raz et al.,

2001)... Les peptides peuvent être présentés aux cellules T anti-idiotypiques et anti-ergotypiques de deux façons : soit directement par la cellule autologue activée et entraîner ainsi l'anergie des cellules T régulatrices, soit par cross-présentation sur des CPA (Cohen et al., 2004) (figure 5). Plusieurs mécanismes interviennent selon la nature de la cellule T anti-idiotypique ou anti-ergotypique. Les cellules T CD4+ agissent par sécrétion de cytokines (ex : IL10, TGF β ...), alors que les cellules T CD8+ induisent la cytotoxicité des clones autoréactifs (Cohen et al., 2004; Correale et al., 1997). Chez l'Homme, de nombreux protocoles de vaccination par des cellules T autoréactives atténuées chez des patients atteints de sclérose en plaque ont aussi montré des déplétions ou suppressions de lymphocytes T autoréactifs (Hellings et al., 2004). Les différentes réponses induites par la vaccination incluant le rôle des cellules T anti-idiotypiques et anti-ergotypiques sont résumées sur la figure 5. D'autres protocoles sont actuellement en cours pour l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le SIDA (Hellings et al., 2004).

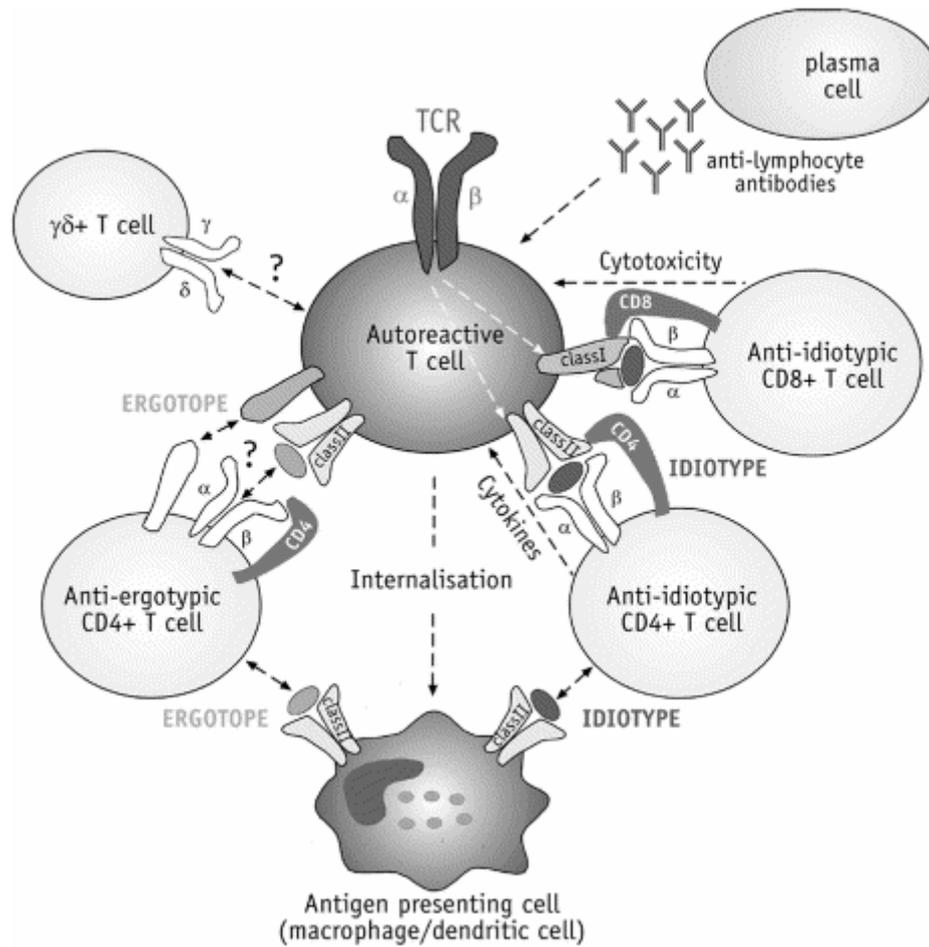


Figure 5: Réponses induites par une vaccination par des cellules T autoréactives atténuées.
D'après (Hellings et al., 2004)

V. Les glucocorticoïdes (GC)

Une partie de mes travaux a porté sur l'étude d'un protocole de minimisation des glucocorticoïdes qui a été mis en place à Nantes chez des patients greffés rénaux. Ce chapitre est destiné à comprendre pourquoi les glucocorticoïdes sont utilisés en transplantation, quels sont leurs modes d'action et pourquoi faut-il réduire leur utilisation.

A. Historique des corticostéroïdes

Le rôle physiologique des hormones corticosurréaliennes a été découvert au cours du 19^e siècle, notamment au travers des conséquences d'un dysfonctionnement chronique des glandes corticosurréales. Cette maladie, appelée maladie d'Addison, du nom du médecin qui l'a décrite, fut traitée la première fois par William Osler, en 1896, à l'aide d'extraits de corticosurréales. Par la suite, des extraits plus actifs issus de glandes animales ont été commercialisés (Rogoff and Stewart, 1929). La découverte des principes actifs que sont les hormones est attribuée à Taddeus Reichstein qui isola, pendant les années 1930, plus de 20 dérivés hormonaux biologiquement actifs (Reichstein and Euw, 1936). La synthèse du premier stéroïde, la désoxycorticostérone est acquise en 1937. A partir de 1934, Kendall et coll ont isolé, à partir de la bile de bœuf, la cortisone (Kendall et al., 1934) que Sarett réussit à produire quelques années plus tard à partir du cholestérol. Puis c'est en 1948 que l'on a pu observer les prémices de la corticothérapie avec l'utilisation de la cortisone comme anti-inflammatoire chez un patient atteint de rhumatisme articulaire aigu (Henech et al., 1950). Tous ces travaux sur la cortisone permirent à Hench, Kendall et Reichstein de partager le prix Nobel de médecine et physiologie en 1950. Des améliorations furent ensuite apportées pour obtenir des dérivés encore plus actifs, tels que la prednisone dont l'activité anti-inflammatoire et immunosuppressive fut quadruplée et la méthylprednisolone.

B. Les hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes correspondent à un groupe de molécules lipophiles dérivées d'un précurseur commun, le cholestérol. On distingue 4 types de stéroïdes : les progestatifs, les androgènes, les oestrogènes et les corticostéroïdes (Ashwell et al., 2000). Les derniers peuvent être divisés en deux sous-groupes : les minéralocorticoïdes qui régulent les transports ioniques et les glucocorticoïdes (GC) qui possèdent des activités variées comme la résistance au stress, l'influence de voies métaboliques (ex : glucides) et des effets immunosuppresseurs et anti-inflammatoires. La conversion du cholestérol vers ces différentes hormones est réalisée par des enzymes déshydrogénases qui nécessite la présence du cytochrome P450 ainsi que par des monooxygénases. La sécrétion des GC, sous contrôle de l'axe hypothalamo-pituitaire, est naturellement régulée dans l'organisme par l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) (Simpson and Waterman, 1988). Un taux faible de GC entraîne la production d'ACTH qui induit alors la sécrétion de GC et vice-versa. Lors de conditions physiologiques, ces deux hormones suivent un rythme circadien. Du fait de leur nature lipophile, leur transport dans la circulation sanguine est facilitée par deux protéines solubles que sont l'albumine qui a une forte capacité et une faible affinité ainsi que la transcortine qui est de forte affinité avec une faible capacité (Ashwell et al., 2000). Cependant il existe, dans le plasma, 1 à 10% des GC sous forme libre qui sont responsables des actions biologiques.

C. Les glucocorticoïdes et leurs récepteurs

Grâce à leur nature lipophile, les GC peuvent diffuser de manière passive dans la cellule et aller se fixer sur le récepteur aux GC (GR). Il existe deux types de récepteurs : le type I contrôle le rythme circadien de sécrétion des corticostéroïdes, le type II est impliqué dans la réponse au stress (Pepin et al., 1992). Appartenant à la superfamille des récepteurs aux stéroïdes, ils possèdent une structure commune (Beato et al., 1995). La région N-terminale correspond au domaine immunogénique, c'est-à-dire responsable de la

fonction transcriptionnelle du récepteur ainsi que de la fixation à d'autres facteurs de transcription. La région centrale, dissimulée à l'état inactif, est formée de deux « doigts de zinc », l'un impliqué dans la liaison à l'ADN et l'autre dans la dimérisation. Enfin, la région C-terminale correspond à la liaison à l'hormone. Les récepteurs GR sont associés à un dimère de hsp90, à une unité de hsp70 ainsi qu'à de multiples protéines chaperonnes dont les immunophilines FKBP52 (Hsp56) et CyP-40 (Owens-Grillo et al., 1995). Présents dans la plupart des cellules, ils sont, à l'état de repos, en équilibre entre le cytoplasme et le noyau. Lorsque les GC viennent s'y fixer, les changements conformationnels entraînent la dissociation de toutes les protéines associées, exposant ainsi le signal de localisation nucléaire. Le complexe ligand/récepteur est alors transloqué dans le noyau où il se dimérise avant de se lier à une séquence palindromique spécifique sur l'ADN, appelée élément de réponse aux GC (GRE) qui a pour motif TGGTACAAATGTTCT. Luisi et coll ont réussi en 1991 à cristallographier cet homodimère lié à sa séquence génique (Luisi et al., 1991).

D. Propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives des glucocorticoïdes

En conditions physiologiques, les GC ont un effet pléiotropique en influençant différents métabolismes dont celui des glucides, des protéines et des lipides, en régulant l'équilibre hydro-électrolytique, en jouant un rôle dans les fonctions cardio-vasculaires, rénales, cérébrales et musculaires et en contribuant à la compartimentation des cellules sanguines. Ils possèdent aussi une activité anti-inflammatoire, dans des conditions pathologiques, en désactivant tous les circuits d'auto-amplification essentiels à la poursuite d'une réaction inflammatoire. Utilisant le même récepteur pour exercer un effet physiologique ou anti-inflammatoire, les conséquences biologiques de la fixation des GC diffèrent selon l'état d'activation de la cellule. Une fois liés à l'ADN, les complexes GR/GC peuvent soit inhiber, soit favoriser la transcription de gènes.

1. *Glucocorticoïdes et voies de signalisations intracellulaires*

Les propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires des GC passent en partie par l'activation ou l'inhibition de la transcription de nombreux gènes, notamment en interférant avec les voies de signalisation intracellulaire.

L'exemple le mieux connu est l'inhibition de la voie dépendante de NFκB (figure 6). A l'état de repos, NFκB est séquestré au niveau du cytoplasme à cause de la molécule inhibitrice IκB. La phosphorylation de cette dernière entraîne la libération de NFκB qui va ensuite se lier à l'ADN pour activer la transcription de nombreux gènes. Plusieurs travaux ont démontré que la dexaméthasone, glucocorticoïde de synthèse, augmentait l'expression de IκB empêchant ainsi NFκB d'exercer sa fonction de facteur de transcription (Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995). Plus récemment, l'implication d'un autre inhibiteur de NFκB inducible par les GC, nommé GILZ, a été découverte (Ayroldi et al., 2001). Toutefois, certaines études n'ont pas réussi à établir de lien entre l'induction de IκB par les GC et l'inhibition de la voie NFκB (De Bosscher et al., 1997; Heck et al., 1997). Contrairement à cette inhibition indirecte, les GC peuvent agir directement sur la voie NFκB selon trois modèles (Almawi and Melemedjian, 2002). Premièrement, le complexe GR/GC peut se fixer sur NFκB et empêcher sa translocation vers le noyau (modèle simple). Deuxièmement, les GC peuvent intervenir une fois que NFκB s'est fixé sur sa séquence nucléotidique en bloquant son activité transcriptionnelle directement ou par l'intermédiaire du recrutement de co-répresseurs (modèle composite). Troisièmement, un modèle de compétition suggère que les complexes GR/GC se fixent à des co-activateurs essentiels à l'activité de NFκB.

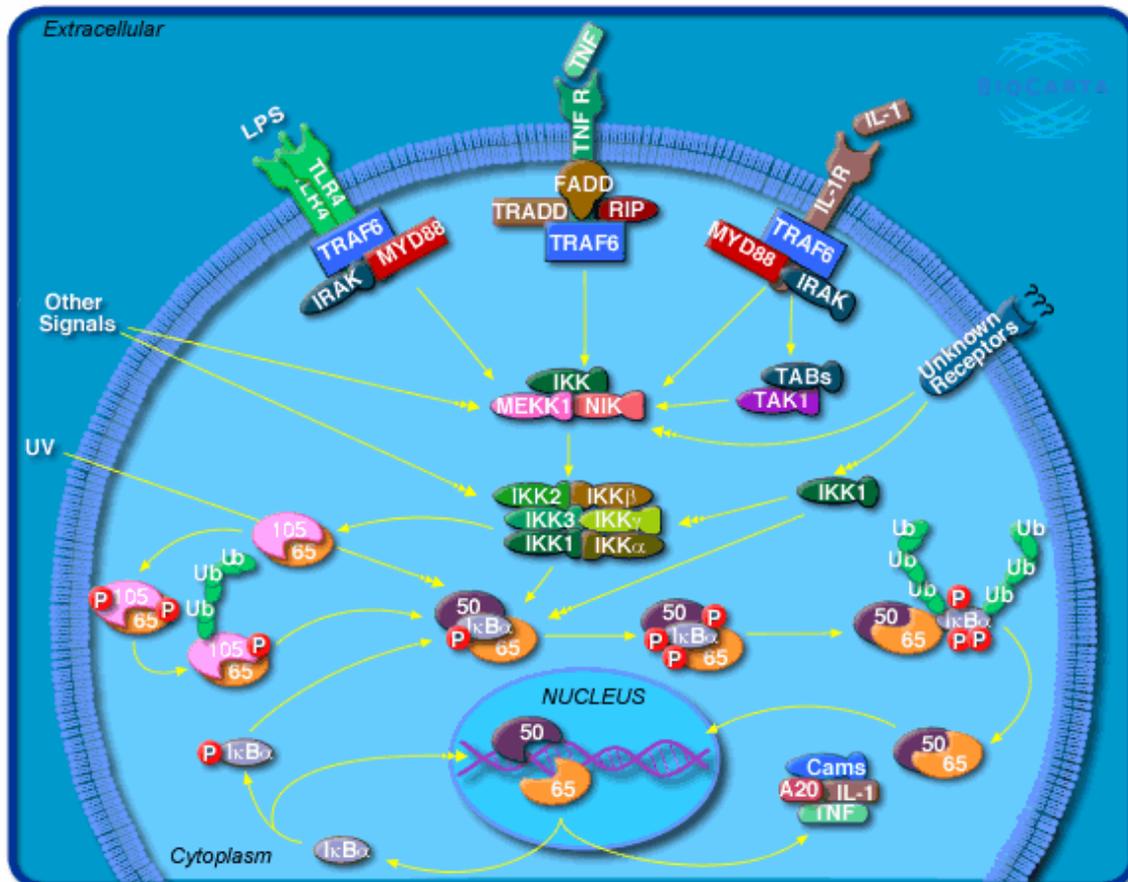


Figure 6 : Voie de signalisation intracellulaire dépendante de NFκB.

En outre, les GC interagissent avec la voie dépendante de AP1 (figure 7). AP1 est un hétérodimère constitué de c-Jun et c-Fos. Son activité transcriptionnelle est inhibée par un contact direct du complexe GR/GC avec la sous-unité c-Jun (Yang-Yen et al., 1990) ou, comme pour NFκB, grâce à l'expression de l'inhibiteur GILZ (Mittelstadt and Ashwell, 2001). Néanmoins, il a été rapporté que AP1 et les GC pouvaient collaborer pour induire la transcription de gènes lorsque leur site de liaison à l'ADN est proche (Pearce et al., 1998; Zhang and Young, 1991) ou lorsque AP1 est composé de deux unités de c-Jun (Gottlicher et al., 1998).

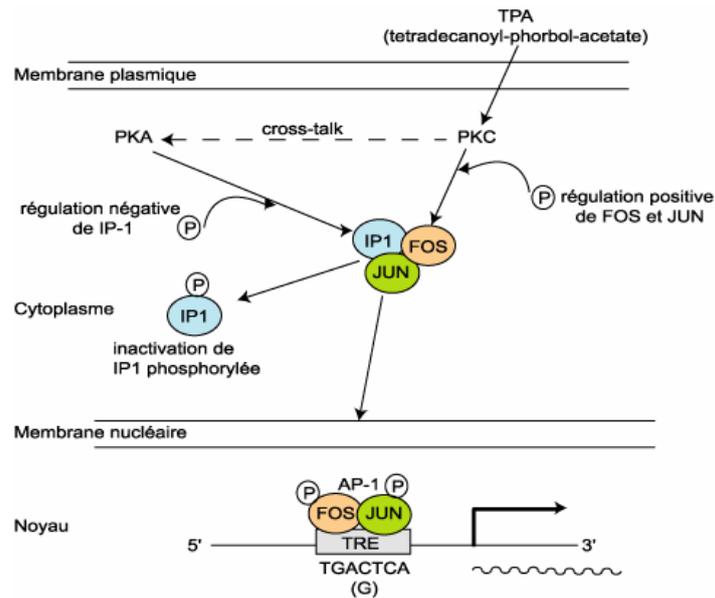


Figure 7 : Voie de signalisation intracellulaire dépendante de AP1.

Une autre voie intracellulaire bloquée par les GC est la voie Jak/STAT (figure 8). Suite à la liaison d'un ligand (par exemple une cytokine) à son récepteur, les kinases Jak étroitement associées à ces récepteurs sont activées. Elles vont alors phosphoryler les molécules STAT ce qui provoque leur dimérisation, leur translocation vers le noyau et la transcription de gènes. Il a été montré que les GC inhibaient la phosphorylation de différentes STAT telles que STAT1 (Hu et al., 2003), STAT3 (Ishida-Takahashi et al., 2004) et STAT5 (Bianchi et al., 2000). Comme pour les autres voies citées auparavant, les GC peuvent agir en synergie avec STAT3 (impliqué dans la signalisation dépendante de l'IL6) pour induire la transcription.

Enfin, les GC inhibent aussi d'autres facteurs de transcription comme NFAT (Paliogianni et al., 1993; Srivastava et al., 1999) et CREB (Imai et al., 1993).

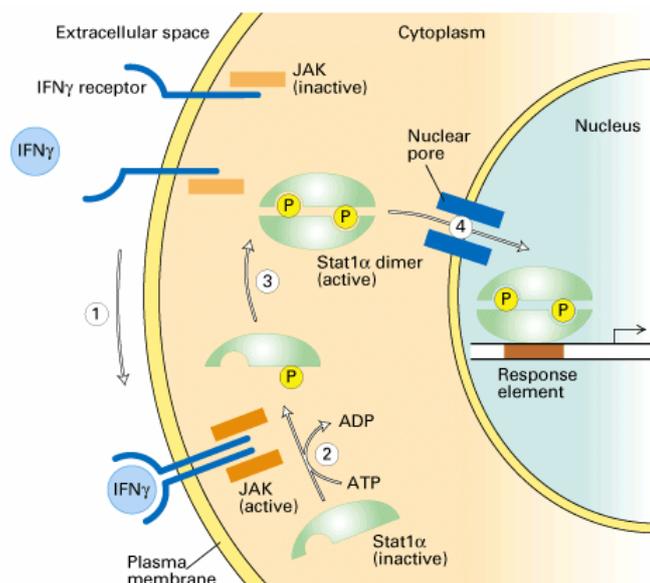


Figure 8: Voie de signalisation intracellulaire dépendante de Jak/Stat.

2. GC et apoptose

Le deuxième mécanisme qui confère aux GC des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives est l'induction ou l'inhibition de l'apoptose (Planey and Litwack, 2000; Riccardi et al., 2002).

D'une part, les GC induisent l'apoptose de nombreux types cellulaires tels que certaines cellules neuronales (Mitchell et al., 1998), les ostéoblastes (Weinstein et al., 1998), les cellules dendritiques (Brokaw et al., 1998), les polynucléaires basophiles (Yoshimura et al., 2001) et éosinophiles (Druilhe et al., 2003), les cellules NK (Migliorati et al., 1994), les macrophages (Dayyani et al., 2003) et les thymocytes (Ashwell et al., 2000). Les mécanismes apoptotiques varient selon les populations cellulaires, je prendrai ici l'exemple de l'apoptose des éosinophiles.

Des études *in vivo* ont montré, chez des patients asthmatiques traités par des GC, un fort taux de polynucléaires éosinophiles apoptotiques dans les biopsies bronchiques ainsi que dans les phagosomes des macrophages (Druilhe et al., 2003). En fait, les GC n'induisent pas directement la mort de ces cellules, mais plutôt amplifie un mécanisme spontané de mort cellulaire. Les GC peuvent agir directement ou indirectement sur l'induction de celle-ci. Le rôle indirect consiste en l'inhibition de la sécrétion autocrine et paracrine des facteurs de survie IL3, IL5 et GM-CSF et de la prévention de leur effets. Les GC induisent aussi l'augmentation de la molécule FasL. Le rôle direct des GC passe par l'activation des voies classiques d'apoptose. En effet, la fixation des GC sur leur récepteur induit la production de radicaux libres de l'oxygène qui sont responsables de l'activation précoce des kinases Jnk et du développement consécutif de la phase dépendante des mitochondries. Pendant la phase mitochondriale, on observe la translocation de Bax (molécule pro-apoptotique) vers la mitochondrie et la réduction du potentiel électrique de la membrane mitochondriale qui aboutit à la libération d'endonucléases et du cytochrome c. Le cytochrome c active des caspases qui fragmentent l'ADN et déstructurent la cellule avec la participation des endonucléases.

D'autre part, les GC peuvent aussi protéger de l'apoptose. C'est le cas pour les fibroblastes (Pagliacci et al., 1993), les cellules endothéliales (Newton et al., 2002) et les polynucléaires neutrophiles (Cox, 1995). Des études suggèrent que la survie des polynucléaires neutrophiles induite par les GC passent par l'expression du récepteur au leucotriène B₄, dont le ligand est un facteur de survie pour ces cellules (Stankova et al., 2002) et une protection contre les radicaux libres produits lors de l'apoptose (Ruiz et al., 2002).

Enfin, les GC sont de puissants régulateurs de l'apoptose des lymphocytes T, puisqu'ils activent simultanément des gènes de suicide et des gènes de protection (Zacharchuk et al., 1990). Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs expriment la molécule anti-apoptotique bcl2 et sont donc résistants à l'apoptose. Leur activation par l'intermédiaire du TCR induit l'expression des molécules Fas et FasL qui lorsqu'elles interagissent provoque l'apoptose des cellules activées par des mécanismes suicide et

fratricide. D'autres signaux (dépendant de CD4, CD28, CD44, CD2, IL2, IL4, IL9) sont impliqués dans la régulation de cette apoptose (Riccardi et al., 2002). Horigome et coll ont montré que ces effets n'étaient pas dû à une diminution de l'expression de Bcl2, mais plutôt à une augmentation de la quantité des récepteurs GR et qu'ils dépendaient d'une activation préalable de la cellule (Horigome et al., 1997). Les mécanismes pro-apoptotiques des GC incluent : une activation d'endonucléases et de caspases par libération du Ca²⁺ mitochondrial qui entraîne la fragmentation de l'ADN, une inhibition de la transcription des modulateurs de la survie tels que les prostaglandines et le NO, une diminution du proto-oncogène c-myc et une expression de diverses molécules pro-apoptotiques (Riccardi et al., 2002). Parallèlement, un programme anti-apoptotique est aussi enclenché. Il consiste principalement en l'inhibition de l'expression de FasL induite après une activation T (Yang et al., 1995). Cette inhibition nécessiterait la synthèse de GILZ qui interagit avec NFκB. De plus, Franchimont et coll ont montré que les GC induisaient l'expression sur les lymphocytes T CD4⁺ naïfs et activés du récepteur à l'IL7 (Franchimont et al., 2002). L'IL7 participant à l'expansion cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose, l'augmentation de son récepteur induite par les GC rend ces cellules plus résistantes à l'apoptose.

3. *Cibles cellulaires des glucocorticoïdes*

La conséquence directe des interactions des GC avec les différentes voies de signalisation est l'expression ou l'inhibition de la synthèse de nombreuses protéines impliquées non seulement dans les mécanismes d'apoptose, décrits précédemment, mais aussi dans la fonction de nombreux types cellulaires intervenant dans les réponses inflammatoires.

a) *Macrophages*

Les macrophages sont des cellules fortement impliquées dans les phénomènes d'inflammation puisqu'ils participent aussi bien à la réponse innée qu'adaptative. Les GC agissent sur ces cellules à différents niveaux.

D'abord, ils inhibent la myélopoïèse en bloquant la synthèse des facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF, essentiels à la prolifération des précurseurs hématopoïétiques des monocytes et des granulocytes (Lenhoff and Olofsson, 1996). En outre, ils interfèrent avec les fonctions des macrophages. Les macrophages sont d'importants producteurs de médiateurs de l'inflammation tels que les leucotriènes et les prostaglandines. Les GC induisent aussi l'expression de protéines anti-inflammatoires comme la lipocortine-1 (ou annexine 1). Cette protéine inhibe l'activité de la phospholipase A2, enzyme responsable de la production d'acide arachidonique qui est le précurseur des leucotriènes et des prostaglandines (Peers and Flower, 1990; Russo-Marie, 1992). Le blocage des prostaglandines se fait aussi au niveau de l'inhibition de la cyclo-oxygénase qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine (Santini et al., 2001). Les macrophages sécrètent quatre cytokines pro-inflammatoires que sont l'IL1 (α et β), le TNF α et l'IL6 ainsi que l'IL12 (voir chapitre I). La production de ces 4 cytokines est inhibée par les GC (Almawi and Melemedjian, 2002). L'IL10, sécrétée par les macrophages pour réguler leur propre activité ainsi que celle des lymphocytes T est, au contraire, augmentée par les GC (Mozo et al., 2004). Les GC interviennent aussi au niveau du recrutement de l'exsudat inflammatoire par inhibition de certaines chimiokines comme l'IL8 (Mukaida et al., 1994). Enfin, les GC inhibent l'activité microbicide des macrophages par inhibition de l'expression de iNOS (Walker et al., 1997) et de la collagénase I (Jonat et al., 1990).

b) Granulocytes et mastocytes

De même que les lymphocytes et les macrophages, un traitement par des GC diminue le nombre des polynucléaires basophiles, cellules impliquées dans les phénomènes d'allergie (Grattan et al., 2003). Ils interfèrent aussi avec leur fonction

puisqu'ils inhibent la production d'histamine (Kivity et al., 1997) et des cytokines IL4 et IL13 (Shimizu et al., 1998).

Les GC ont des effets répresseurs importants sur de nombreuses cytokines (IL3, IL5, GM-CSF) essentielles à la survie et à la fonction des polynucléaires éosinophiles (Druilhe et al., 2003). Mais ils exercent surtout un rôle direct en favorisant leur apoptose ce qui se traduit par une diminution de leur nombre chez des patients atteints d'asthme traités par des GC (Bentley et al., 1996).

De même, les mastocytes sont la cible des GC qui inhibent leur maturation, leur production de cytokines et l'expression du récepteur FcεRI (Smith et al., 2002). En plus de l'inhibition des fonctions microbicides décrite précédemment pour les macrophages, les GC agissent aussi sur les polynucléaires neutrophiles à deux autres niveaux. Le premier effet des GC est l'inhibition de leur apoptose (Cox, 1995) qui aboutit à une augmentation de leur nombre observée par exemple chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités par des GC (Aglas et al., 1997). Enfin, les GC diminuent l'adhérence des polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales empêchant leur recrutement sur les sites inflammatoires (Heimburger et al., 2000).

c) Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont aussi connues pour synthétiser, une fois activées, des molécules pro-inflammatoires comme les leucotriènes et les prostaglandines (Schorr, 1985). Les mécanismes d'inhibition de celles-ci par les GC sont les mêmes que pour les macrophages, à savoir la production de lipocortine-1 et l'inhibition de la cyclo-oxygénase. De plus, les GC diminuent la perméabilité vasculaire en empêchant l'expression des molécules d'adhérence comme ICAM1 et ELAM1, uniquement dans des cellules endothéliales activées par le LPS (Cronstein et al., 1992). Une autre étude a en effet montré qu'une incubation avec du TNFα ou de l'IL1 stimule correctement la synthèse de ces molécules même en présence de GC (Ghezzi and Sipe, 1988). Le recrutement des

cellules immunitaires sur les sites inflammatoires est aussi perturbé par l'inhibition de la sécrétion par les cellules endothéliales de chimiokines comme MIP2 (Liu et al., 2000).

d) Fibroblastes

Les fibroblastes jouent un rôle important dans les phénomènes de fibroses qui peuvent intervenir après une inflammation. Les GC touchent ainsi les fibroblastes en diminuant leur prolifération (Ponec et al., 1979) et leur production de collagène (Slavin et al., 1994). Les fibroblastes produisent aussi un certain nombre de cytokines, telles que IL6, IL8, GM-CSF, impliquées dans la régulation des réponses immunes. Tobler et coll ont démontré l'inhibition de leur expression dans des fibroblastes humains suite à une incubation avec la dexaméthasone (Tobler et al., 1992).

e) Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont un rôle central dans la réponse immune, puisqu'elles constituent les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces. Les GC les affectent à plusieurs niveaux. Premièrement, ils diminuent leur nombre et leur capacité à produire l'IFN γ (Shodell and Siegal, 2001). Deuxièmement, ils inhibent l'acquisition des molécules CD86, CD40, CD54 et CMH II lors de la maturation cellulaire, réduisant ainsi leur capacité à stimuler des lymphocytes T (Pan et al., 2001). A l'opposé, leur activité endocytaire n'est pas affectée. De même, la sécrétion de plusieurs cytokines (IL12, IL1 α , TNF α , IL6) est perturbée (de Jong et al., 1999; Pan et al., 2001), ce qui favorise plutôt le développement des lymphocytes Th2 de type anti-inflammatoire. Enfin, une étude plus récente suggère que le traitement de cellules dendritiques par une combinaison vitamine D3 et dexaméthasone accélère la maturation de ces cellules vers un phénotype régulateur (Pedersen et al., 2004). En effet, ces cellules exprimant le récepteur inhibiteur ILT4 et produisant beaucoup d'IL10 ne stimulent que très peu des lymphocytes T.

f) Cellules NK

Les GC inhibent l'activité cytotoxique des cellules NK *in vitro* (Nair and Schwartz, 1984) et *in vivo* (Takahashi et al., 1985). Plus récemment une étude suggère que cet effet passe par la diminution de la transcription de la protéase granzyme A (Zhou et al., 1997).

g) Lymphocytes T

Les lymphocytes T participent à la réponse adaptative. Les GC peuvent indirectement affecter l'activité des lymphocytes T soit en inhibant les capacités stimulatrices des CPA, comme mentionné précédemment pour les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales, soit en inhibant les réponses pro-inflammatoires de type Th1 et en favorisant une polarisation de type Th2, c'est-à-dire anti-inflammatoire (Almawi et al., 1999).

Outre les effets sur l'apoptose décrits auparavant, les GC empêchent l'activation des lymphocytes T en inhibant notamment leur prolifération. Dans des conditions optimales, la reconnaissance TCR/complexe CMH/peptide active par l'intermédiaire de kinases la phospholipase C γ (PLC γ) (figure 9). Cette dernière produit alors de l'inositol triphosphate (IP3) qui, à son tour, provoque la libération de Ca $^{2+}$ à partir de la mitochondrie. L'augmentation calcique cytoplasmique entraîne l'activation de facteurs de transcription (NFAT, AP1) et la synthèse, en particulier, de l'IL2 et de son récepteur, essentiels à la prolifération. Baus et coll ont montré que la dexaméthasone entraînait une diminution de la phosphorylation de la PLC γ et donc une réduction d'IP3 et de Ca $^{2+}$. Cet effet semble nécessiter la synthèse d'une protéine (Baus et al., 1996). La conséquence est une inhibition de la transcription de l'IL2 (Boumpas et al., 1991; Paliogianni et al., 1993). Les résultats concernant l'influence des GC sur la synthèse du récepteur à l'IL2 restent controversés. En effet, alors que certains travaux ne mettent en évidence aucun effet des GC sur

l'expression du récepteur (Bischof and Melms, 1998; Boumpas et al., 1991), Batuman et coll montrent au contraire une inhibition (Batuman et al., 1994). Une explication proposée par Paliogianni est que, dans une cellule au repos, les GC n'affectent que l'IL2 tandis que, dans un lymphocyte préactivé, une inhibition du récepteur est également observée (Paliogianni et al., 1993). Des travaux plus récents suggèrent que les GC agissent précocement dans la cascade d'activation dépendante du TCR en empêchant la bonne phosphorylation de nombreux substrats tels que CD3 ζ ou ZAP70 (Van Laethem et al., 2001). Cet effet serait dû non pas à des kinases défectueuses, mais à une anomalie de compartimentation des molécules nécessaires à l'activation. De même, les GC inhibent la production d'IFN γ par les lymphocytes T activés (Bischof and Melms, 1998).

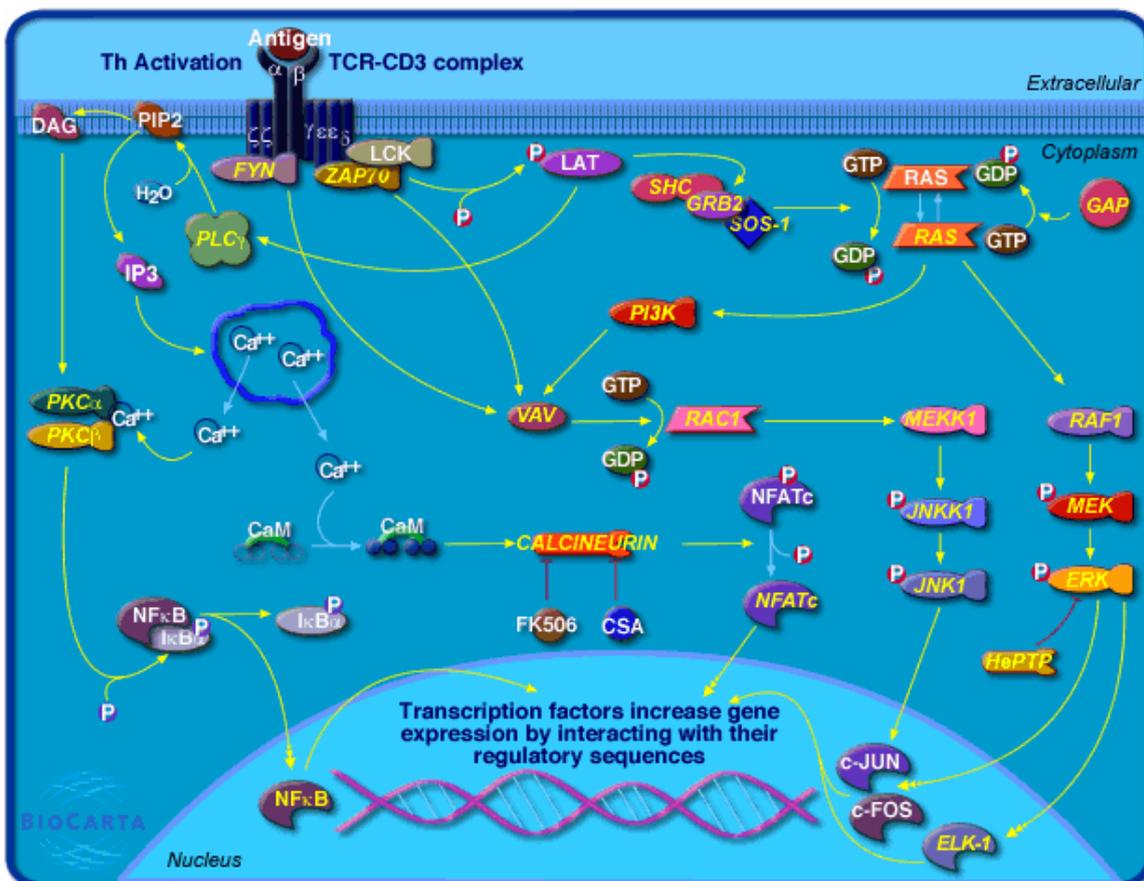


Figure 9: Voie de signalisation intracellulaire dépendante du TCR.

En outre, les GC affectent la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8+ en diminuant l'expression de la protéase granzyme B en interférant avec deux facteurs essentiels à sa transcription AP1 et Ikaros (Wargnier et al., 1998).

Enfin, des études ont montré que les GC pouvaient induire dans des lymphocytes T humains l'expression de certaines cytokines comme l'IL10 (O'Garra and Barrat, 2003; Richards et al., 2000) ou le TGFβ1 (Batuman et al., 1995), connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires.

b) Lymphocytes B

Même si les lymphocytes B sont moins sensibles aux GC que les lymphocytes T, il a été observé une inhibition de l'activation des lymphocytes B pris à des stades précoces (Dennis et al., 1987). Les GC sont inactifs, sauf à très fortes doses, sur les plasmocytes et sur leur production d'immunoglobulines. Enfin, les GC peuvent jouer un rôle indirect sur la maturation des lymphocytes B en diminuant l'expression de CD40L sur les lymphocytes T activés, qui est indispensable pour la production des Ig (Bischof and Melms, 1998).

E. L'utilisation des glucocorticoïdes en transplantation: pour ou contre ?

Du fait de la grande diversité de leurs effets et de leurs cibles, les GC sont utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies comme des maladies inflammatoires de type Th1 ou Th2 (ex arthrite rhumatoïde, asthme) (O'Garra and Barrat, 2003), des maladies auto-immunes et en transplantation (Almawi and Melemedjian, 2002). Mais, à cause aussi de cette diversité, ils possèdent de nombreux effets secondaires.

1. *Les avantages des glucocorticoïdes*

Dès les premières transplantations rénales dans les années 1950-1960, les GC (méthylprednisolone, prednisolone et prednisone) furent employés pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives en association avec l'azathioprine. Cette combinaison a permis l'essor des greffes. A partir des années 1970, d'autres immunosuppresseurs sont apparus tels que les sérums anti-lymphocytaires, puis la ciclosporine A en 1982. La trithérapie (CsA/azathioprine/GC) combinée à un court traitement d'induction par SAL est ensuite devenue le schéma de base du traitement d'un receveur. Au cours des années 1990, la disponibilité de nouveaux immunosuppresseurs s'est considérablement modifiée avec l'apparition des anticorps monoclonaux (anti-CD3, anti-CD25), de l'acide mycophénolate mofétil (MMF), du tacrolimus et de la rapamycine. Encore actuellement, de nouveaux bioréactifs sont en cours d'étude (ex FTY720, CTLA4-Ig). Cette nouvelle panoplie a permis de tester dans des protocoles cliniques de nombreuses combinaisons immunosuppressives, avec comme critère principal d'évaluation le nombre de rejets aigus. Dans la majorité des cas, les GC font encore partie intégrante du traitement immunosuppresseur (Mourad et al., 2001; Shapiro et al., 1999). Récemment, diverses études *in vitro* et dans des modèles expérimentaux murins ont suggéré l'intérêt des GC en transplantation et notamment dans le développement d'une tolérance. Barrat et coll ont montré que la dexaméthasone combinée à la vitamine D3 pouvait générer à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs humains et murins des cellules régulatrices de type Tr1 (Barrat et al., 2002). *In vivo*, Chen et coll ont observé, après le traitement d'une souris par la dexaméthasone, une augmentation des lymphocytes T CD4+CD25+CTLA4+GITR+ résistantes à l'apoptose, caractéristiques de populations régulatrices (Chen et al., 2004). De même, une augmentation transitoire de cellules T CD4+CD25+ et de FOXP3 a été observée chez des patients asthmatiques traités par GC (Karagiannidis et al., 2004).

2. *Les inconvénients des glucocorticoïdes*

L'administration chronique de GC présente de multiples effets secondaires qui peuvent découler de leurs mécanismes d'action ou de leurs propriétés pharmacologiques :

✓ La perturbation du métabolisme lipidique entraîne une redistribution de la masse lipidique essentiellement au niveau du dos, de la nuque et du visage ainsi qu'une hypercholestérolémie (Donahoo et al., 1998),

✓ Les GC détournent le métabolisme protidique au profit de la néoglucogénèse. De plus, ils gênent l'apport énergétique constitué par le glucose et les acides aminés dans les cellules musculaires, et notamment les muscles respiratoires (Janssens and Decramer, 1989),

✓ Les GC augmentent la glycémie par perte de la sensibilité à l'insuline (O'Byrne and Feely, 1990),

✓ Les GC ont une activité minéralocorticoïde qui est certes faible, mais suffisante pour induire des troubles de l'équilibre hydroélectrolytique (sodium/potassium) qui peuvent engendrer des oedèmes périphériques, une hypertension artérielle, asthénie, trouble du rythme cardiaque (Midtvedt and Neumayer, 2000)...

✓ La corticothérapie peut entraîner des vomissements, aggraver des ulcères (Messer et al., 1983) ou encore créer des hémorragies du colon,

✓ A cause de leurs nombreux effets sur le système immunitaire, les GC augmentent le risque infectieux qu'il soit bactérien, viral, parasitaire ou fongique (Citterio, 2001),

✓ Le développement de tumeurs est un autre effet non désirable des GC (Sayer et al., 1994),

✓ L'utilisation chronique des GC chez l'enfant est particulièrement délicate, puisqu'ils entraînent des retards de croissance (Falcini et al., 1991),

✓ Les GC ont des effets secondaires sur la peau : apparition d'acnés, retards de cicatrisation, eczéma...

✓ Des problèmes oculaires ont aussi été observés après un traitement par des GC (cataracte, ulcère de la cornée, kératites infectieuses (Pai et al., 2000)...)

✓ Les GC augmentent aussi les risques d'ostéoporose (Lukert and Raisz, 1990)...

Enfin, contrairement aux travaux de Barrat, Chen et Karagiannidis décrits précédemment, les GC sembleraient empêcher l'induction d'une tolérance dans plusieurs modèles d'allogreffe (intestinale (Koshiha et al., 2001), cardiaque (Levy and Alexander, 1996), hépatique (Qian et al., 1997; Wang et al., 2001)).

3. *Les protocoles visant à minimiser les glucocorticoïdes*

A cause de toutes ces manifestations et puisqu'il existe, actuellement, une grande diversité d'immunosuppresseurs sur le marché, de nombreuses tentatives de minimisation des GC ont été initiées. Deux grandes stratégies se sont alors mises en place. L'une de ces stratégies, appelée « steroid withdrawal » consiste à donner des GC dès le premier jour de la transplantation, puis à réduire progressivement les doses dans les mois qui suivent jusqu'à l'arrêt complet. Les données cliniques obtenus avec cette stratégie sont contradictoires, puisque certaines études ont montré, consécutivement à l'arrêt des GC, une amélioration des effets secondaires associés aux GC sans détérioration de la fonction du greffon tandis que d'autres ont observé une augmentation des rejets aigus (Chakrabarti et al., 2000; Grinyo et al., 1997; Opelz, 1994; Shapiro et al., 1996). La difficulté pour ce type de stratégie est de déterminer sur quelle période réduire les GC et quand commencer cette réduction. L'accroissement du nombre des rejets peut être expliqué par une sensibilisation des lymphocytes T aux GC comme l'ont suggéré les travaux d'Almawi et coll. En effet, un traitement court avec des GC augmentent le nombre des récepteurs de cytokines sur les lymphocytes T activés entraînant une augmentation de leur prolifération (Almawi et al., 1999). L'arrêt des GC devrait donc être combiné à des inhibiteurs de l'action des cytokines comme la rapamycine. La seconde stratégie de minimisation des GC est le « steroid avoidance » qui propose un traitement immunosuppresseur totalement dépourvu de GC (Birkeland, 2001; Cantarovich et al., 2000a; Cantarovich et al., in press). Les résultats pour cette stratégie sont plutôt encourageants avec peu d'épisodes de rejets.

VI. Les sérums anti-lymphocytaires (SAL)

Pour tenter de contrebalancer l'augmentation des épisodes de rejet aigu dû à l'absence des GC dans le traitement immunosuppresseur, nous avons pris l'option, à Nantes, du sérum anti-lymphocytaire. Ce chapitre est consacré à la description de sa composition et de ses modes d'actions.

A. Historique

Les propriétés anti-inflammatoires des sérums anti-lymphocytaires (ou sérums anti-thymocytaires) sont connues depuis la fin du 19^e siècle avec les travaux de Metchnikoff. Mais, leur application en tant qu'immunosuppresseur a été découverte avec Woodruff et Forman dans les années 1950 lorsqu'ils démontrèrent que l'administration de SAL entraînait, *in vivo*, une profonde déplétion lymphocytaire dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires associée à une suppression de l'hypersensibilité de type retardé (Woodruff and Forman, 1951).

Les effets bénéfiques sur le rejet d'allogreffe, et même de xéngreffe, ont ensuite été rapidement mis à profit dans des modèles de greffes de peau chez les rongeurs (Gray et al., 1964; Waksman et al., 1961; Woodruff and Anderson, 1963). Durant les années qui ont suivi, l'utilisation des SAL en transplantation rénale chez l'homme est apparue avec Monaco et coll (Monaco, 1967), Starzl et coll (Starzl et al., 1967) ou encore Dubernard et coll (Dubernard et al., 1974). De nos jours, ils sont préconisés chez les sujets dits à risque immunologique pour la prévention du rejet de greffe rénale (Brennan et al., 1999) (Zuckermann et al., 2000) pendant la période postopératoire, classiquement appelée « phase d'induction » (en moyenne 10 jours) (Touraine et al., 1987), ou en traitement de première intention du rejet aigu ou en cas de rejets résistants aux corticostéroïdes (Birkeland, 1975). Un atout des SAL (ou des anticorps monoclonaux) en traitement d'induction est de retarder l'administration de CsA ou d'autres immunosuppresseurs

néphrotoxiques pendant la phase de récupération postopératoire (Hourmant et al., 1987; Sommer et al., 1987). Ils ont aussi été utilisés dans le traitement de la GVHD après une greffe de moelle osseuse (Deeg et al., 1985) et dans le traitement de l'anémie aplastique auto-immune (Young et al., 1988).

B. Composition

Les SAL sont un mélange d'immunoglobulines de type IgG obtenues par immunisation de lapins ou de chevaux (plus rarement de chèvres) avec des thymocytes humains (Traeger et al., 1978), avec des lignées lymphocytaires T comme JURKAT (Eiermann et al., 2001) ou contre des clones lymphocytaires cytotoxiques humains (Bonneville et al., 1989). Il existe, dans le commerce, plusieurs SAL qui semblent présenter des efficacités différentes en clinique (Gaber et al., 1998). La diversité de ces résultats peut résider en la distribution différente des anticorps présents dans ces sérums (Bonney-Berard et al., 1991; Bourdage and Hamlin, 1995; Raefsky et al., 1986). Rebellato et coll ont trouvé des anticorps dirigés contre 23 cibles différentes dans la Thymoglobuline, issue de sérum de lapin anti-thymocytes humains (Rebellato et al., 1994) (tableau 3). Les plus abondants semblent être des anticorps non spécifiques des cellules T. Cependant, ceux qui persistent le plus longtemps dans le plasma de singes ayant reçu une greffe rénale sont dirigés contre CD3, CD4, CD8, CD11a, CD40, CD45, CD54 et CMH de classe I.

Au contraire, un autre SAL de lapin anti-JURKAT, commercialisé par Frésenius, contiendrait des anticorps principalement dirigés contre les lymphocytes T (tableau 4). Plus récemment, Michallet et coll ont montré, dans trois SAL différents, la présence d'anticorps dirigés contre des molécules d'adhésion et des intégrines (LFA1, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VLA-4, intégrine $\alpha 4\beta 7$, CD50, CD54, CD102) ou des récepteurs de chimiokines (CCR7, CXCR4, CCR5) (Michallet et al., 2003a). De même, des anticorps anti-CTLA4 ont été trouvés dans les SAL (Pistillo et al., 2002).

Antigène	Réactivité	Titre
CD6	Lymphocytes T et B	>1:4000
CD16	Cellules NK, cellules de moelle osseuse	>1:4000
CD18 (LFA1 β)	Leucocytes	>1:4000
CD28	Lymphocytes T	>1:4000
CD38	Lymphocytes T et B activés	>1:4000
CD40	Lymphocytes B	>1:4000
CD58 (LFA3)	Leucocytes	>1:4000
CD2 (LFA2)	Cellules NK, lymphocytes T	1:512
CD4	Lymphocytes T, cellules de moelle osseuse	1:512
CD8	Cellules NK, lymphocytes T	1:512
CD11a (LFA1 α)	Leucocytes	1:512
CD45	Leucocytes	1:512
CD3	Lymphocytes T	1:128
TCR β	Lymphocytes T	1:128
CD5	Lymphocytes T et B	1:128
HLA-DR (CMH II)	Cellules de moelle osseuse, lymphocytes T activés et lymphocytes B	1:128
HLA-DQ (CMH II)	Cellules de moelle osseuse, lymphocytes T activés et lymphocytes B	1 :32
CMH I	Leucocytes	1 :32
CD1	Thymocytes, lymphocytes B et cellules dendritiques	1 :32
CD20	Lymphocytes B	1 :16
CD44	Leucocytes	1 :4
CD56	Cellules NK	1 :4

Tableau 3 : Principaux anticorps de la Thymoglobuline, la réactivité et les titres correspondants.

D'après Rebellato et coll (Rebellato et al., 1994)

Antigène	Réactivité	Concentration moyenne pour 50% d'inhibition (µg/ml)
CD2	Cellules NK, lymphocytes T	246
CD3	Lymphocytes T	4586
CD4	Lymphocytes T, cellules de moelle osseuse	>5000
CD5	Lymphocytes T et B	234
CD7	Lymphocytes T	288
CD8	Cellules NK, lymphocytes T	1644
CD11a	Leucocytes	2203
CD18	Leucocytes	3796
CD28	Lymphocytes T	2989
CD44	Leucocytes	>5000
CD45	Leucocytes	797
TCRαβ	Lymphocytes T	>5000

Tableau 4 : Principaux anticorps du SAL de Frésenius, la réactivité et les concentrations qui permettent une inhibition de 50%.

D'après Bourdage et coll (Bourdage and Hamlin, 1995)

C. Mécanismes d'action

La grande diversité de spécificités dans les SAL laisse suspecter que plusieurs mécanismes interviennent. Cette diversité découle des antigènes immunisants, des concentrations en anticorps et des méthodes de purification, rendant illusoire une compréhension précise des mécanismes. Cependant, compte tenu de l'importance pratique

de ces produits, certaines « idées forces » peuvent se dégager et méritent d'être individualisées.

1. *Apoptose*

La principale manifestation des SAL, quelque soit leur origine, est l'induction d'une profonde lymphopénie qui peut s'expliquer par une mort cellulaire programmée appelée apoptose. Mais, selon la dose administrée, les mécanismes apoptotiques mis en jeu varient (Genestier et al., 1998). Premièrement, à faibles doses (0.1-1µg/ml), les anticorps du SAL recouvrent la surface des lymphocytes. C'est l'opsonisation. Les cellules opsonisées sont ainsi la cible de cellules effectrices porteuses de récepteurs pour la partie Fc des Ig (monocytes, macrophages, polynucléaires, cellules NK...), qui peuvent ainsi phagocyter ou lyser leur cible. Ce mécanisme, appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (figure 10), ne concerne que les lymphocytes activés et le SAL issu de lapin.

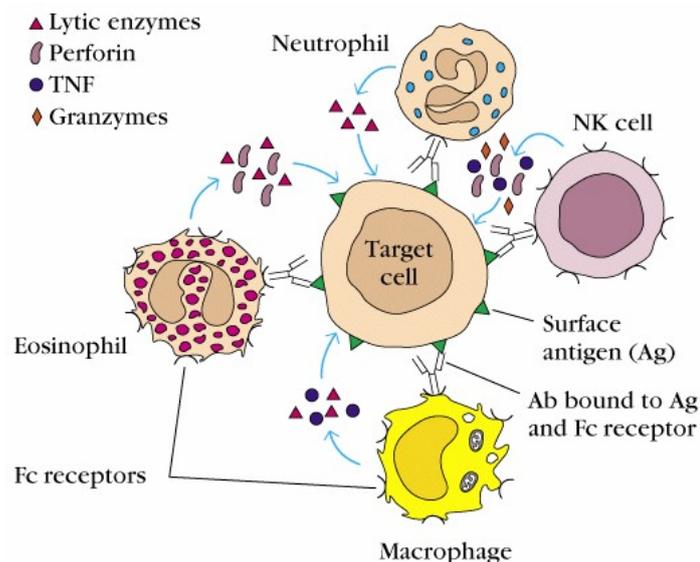


Figure 10 : Phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC.

Deuxièmement, de fortes concentrations de SAL (100-1000 µg/ml) induisent la fixation du complément et la lyse des cellules opsonisées via la voie classique d'activation du complément (figure 11). Ce type de mécanisme affecte aussi bien des lymphocytes naïfs qu'activés.

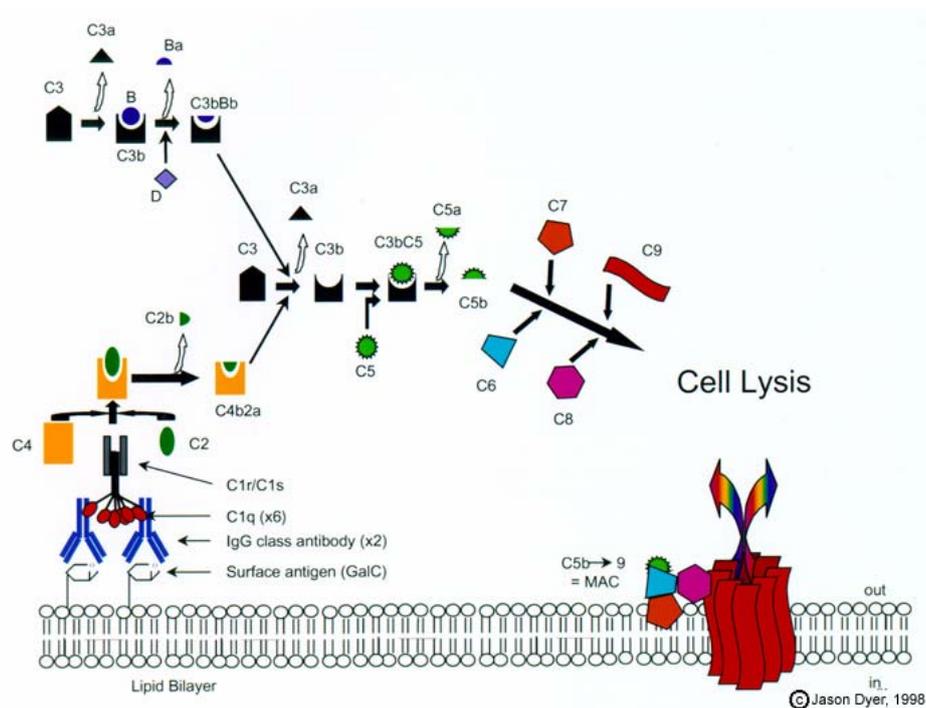


Figure 11 : Activation de la voie classique du complément.

D'après J. Dyer, 1998.

L'apoptose faisant suite à une activation, appelée Activation Induced Cellular Death ou AICD (figure 12), est le troisième processus impliqué dans la déplétion lymphocytaire induite par les SAL. Il fait intervenir des molécules de la famille du TNF. En effet, à des concentrations intermédiaires, les anticorps anti-CD2 et anti-CD3 présents dans le sérum conduisent à l'expression des molécules Fas sur les lymphocytes naïfs et FasL sur les

lymphocytes naïfs et activés. L'interaction Fas/FasL entraîne alors, via l'activation de la cascade des caspases, l'apoptose des cellules exprimant Fas. Comme l'a montré Genestier et coll, cette voie d'apoptose étant dépendante de la production d'IL2 (Fournel et al., 1996), elle est interrompue par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie d'IL2 comme la ciclosporine, le tacrolimus ou les corticostéroïdes (Genestier et al., 1998).

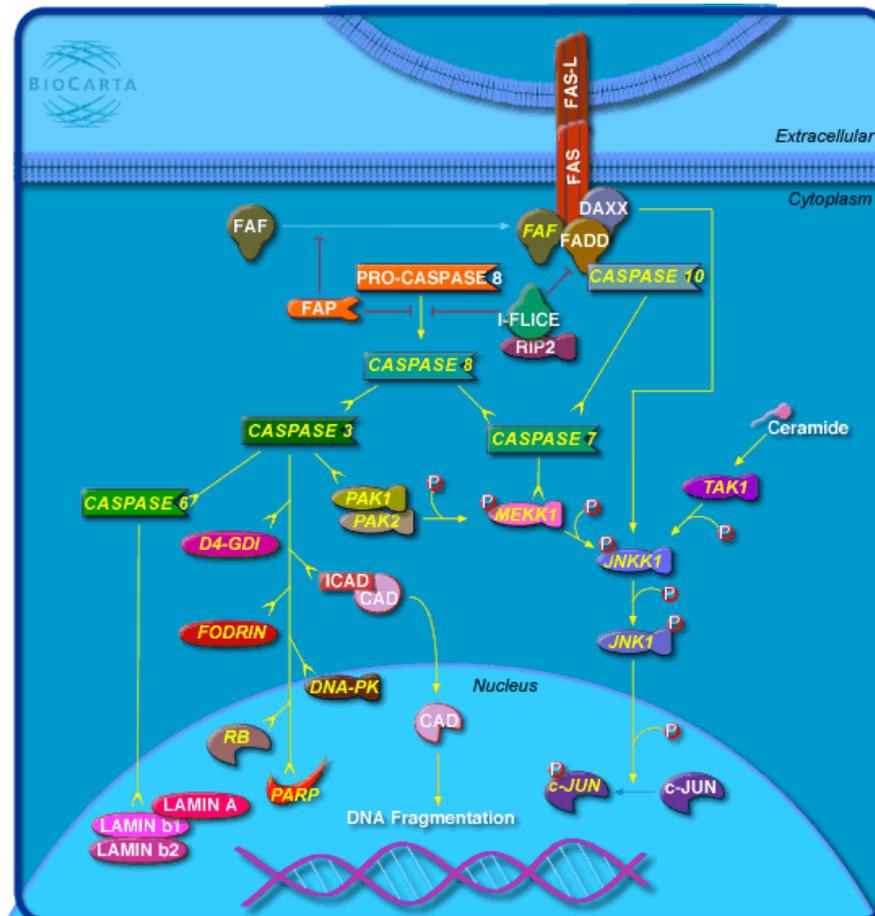


Figure 12 : Apoptose déclenchée par l'interaction Fas/FasL.

Enfin, plus récemment Michallet et coll ont démontré une quatrième voie supplémentaire d'apoptose indépendante des caspases, passant par la libération, des lysosomes vers le cytosol, de la protéase cathepsine B (Michallet et al., 2003b). Enfin, même si les effets déplétants des SAL sont dirigés essentiellement vers les lymphocytes T,

des travaux de Bonnefoy Berard ont montré *in vitro* l'apoptose de lymphocytes B activés par les SAL (Bonnefoy-Berard et al., 1994).

2. *Anergie*

Dès 1994, Rebellato et coll suggéraient que, comme les anticorps monoclonaux anti-CD3 (Anasetti et al., 1990) ou anti-CD2 (Chavin et al., 1993), les anticorps anti-CD3 et anti-CD2 présents dans les SAL pourraient induire une anergie des lymphocytes T en périphérie. En 1998, les travaux de Mérimon et coll ont montré qu'un sérum équin anti-thymocytes humains inhibaient *in vitro* la prolifération des lymphocytes T stimulés par des mitogènes ou par des cellules allogéniques de même que la cytotoxicité des cellules effectrices (Merion et al., 1998). En effet, l'occupation simultanée de plusieurs récepteurs (CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, TCR $\alpha\beta$) aboutit à une activation partielle du lymphocyte T qui se traduirait par une absence de synthèse de l'IL2. Mais, des résultats contradictoires avaient précédemment montré que le mécanisme d'action des SAL sur la prolifération T n'était pas associé une absence de synthèse d'IL2, mais à une inhibition post-transcriptionnelle d'un composant de son récepteur (CD25) ainsi que de l'IFN γ (Bonnefoy-Berard et al., 1992). Le SAL induirait une libération de Ca²⁺ intracellulaire qui, couplée à une activation de la protéine kinase C (par exemple avec un ester de phorbol comme la PMA), conduit à l'activation du lymphocyte T (Merion et al., 1998). L'effet des SAL sur le flux calcique a été récemment confirmé par les travaux de Fujii qui montrent que le SAL induit, dans une lignée cellulaire T, la sécrétion d'acétylcholine par augmentation transitoire de Ca²⁺ intracellulaire (Fujii et al., 2002).

3. *Modulation des molécules de surface*

Un troisième effet des SAL a été démontré. Les SAL induisent la modulation de certaines molécules de surface. Les anticorps anti-intégrines (LFA1, VLA-4, $\alpha4\beta7$)

présents dans le SAL provoquent une diminution de ces molécules d'adhésion sur les lymphocytes et les monocytes. Ces données *in vitro* suggèrent que cette modulation pourrait empêcher la migration des cellules immunitaires lors d'un rejet aigu vers le greffon ou après l'ischémie/reperfusion (Michallet et al., 2003a). Le recrutement des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires peut aussi être perturbé par la modulation des récepteurs CCR5, CXCR4 et CCR7 qui ne peuvent plus fixer les chimiokines Rantes ou MIP-3 β . De plus, Préville et coll observaient dans un modèle de greffe de peau chez le primate une modulation *in vivo* de molécules impliquées dans l'activation cellulaire T (CD2, CD3, CD4, CD6) (Preville et al., 2001). Cette diminution qui peut aussi être responsable des phénomènes d'anergie décrits précédemment, contribue aux effets immunosuppresseurs des SAL. Enfin, le taux de modulation de certaines molécules (ex : CD3) a été proposé comme outil de monitoring des taux circulants efficaces des SAL (Abouna et al., 1995).

4. *Lyse des cellules dendritiques*

Les cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigènes dites « professionnelles », sont impliquées dans la stimulation des lymphocytes T en particulier naïfs. Monti et coll ont montré que les sérums anti-lymphocytaires et anti-thymocytaires contenaient aussi des anticorps dirigés contre les cellules dendritiques immatures et matures (CD1a, CMH de classe I et II, CD11a, CD4, CD86, CD11b, CD32...) (Monti et al., 2003). Cette fixation entraîne leur lyse par le complément sans gêner la maturation, l'endocytose ou les capacités stimulatrices des cellules dendritiques. Plus précisément, Fang et coll ont récemment démontré que le SAL induisait *in vitro* et *in vivo* la lyse des cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes (Fang et al., 2005).

D. Effets *in vivo* des SAL

1. *Déplétion des lymphocytes circulants*

Le principal effet du SAL est une chute rapide du nombre des lymphocytes périphériques due à une apoptose massive. Ce mécanisme a été prouvé chez l'animal dans des modèles de greffe de peau (Preville et al., 2001) et chez des patients atteints d'anémie aplastique (Dubey et al., 2002). Mais cette mort cellulaire n'affecte pas de manière égale toutes les populations lymphocytaires. En effet, Müller et coll ont montré, chez des patients transplantés rénaux, une déplétion importante et persistante (jusqu'à au moins 5 ans après la transplantation) des lymphocytes TCD4⁺ circulants après un traitement par le SAL (Muller et al., 1997). Parallèlement, le nombre de cellules T CD8⁺, principalement CD8⁺CD57⁺ « cytotoxiques », qui subissent dans un premier temps le même sort, finit par augmenter progressivement. Ces évolutions différentes amènent à une inversion tangible et persistante du ratio CD4/CD8. Au contraire, le nombre des lymphocytes B et des cellules NK n'est pas altéré à long terme par le SAL. Des effets similaires ont été observés, en transplantation hépatique, avec une augmentation du pourcentage de marqueurs d'activation T comme le récepteur de la transferrine CD71 et HLA-DR, à l'exception de CD25 qui tend à diminuer (Oertel et al., 2002). Les deux études précédentes montrent une déplétion des lymphocytes sanguins par le SAL. Toutefois, une diminution des lymphocytes des ganglions lymphatiques et de la rate, mais pas du thymus, a été rapporté chez le primate (Preville et al., 2001).

2. *Inhibition de la prolifération*

Des études sur des receveurs de greffe rénale ont mis en évidence une diminution de la prolifération des lymphocytes contre les cellules du donneur après administration de SAL de lapin chez le primate (Preville et al., 2001) et avec un SAL équin chez l'Homme

(Merion et al., 1998). Notamment, Prévaille et coll ont montré que les lymphocytes des ganglions lymphatiques qui n'ont pas été déplétés présentent une modulation de molécules associées à l'activation (CD2, CD3, CD4, CD8) certainement reliée à une réduction de leur réponse proliférative (Preville et al., 2001).

3. Réponse humorale contre les protéines xénogéniques

L'injection de SAL peut entraîner une réponse immune contre les anticorps de lapin ou de cheval (Preville et al., 2001). Cette réponse apparaît dès le 8^e jour et se caractérise par une chute des taux circulants de SAL et une augmentation des IgM et des IgG anti-lapin ou anti-cheval (Birkeland and Munk-Andersen, 1975; Vincent and Revillard, 1977). Sans traitement approprié, une maladie sérique peut alors se développer à cause des dépôts de complexes immuns circulants.

Résultats 1 : Contribution à l'analyse de patients greffés rénaux « opérationnellement » tolérants

I. Objectifs de l'étude

Certains rares patients greffés rénaux qui ont arrêté leur traitement immunosuppresseur de leur plein gré ou plus souvent sur raison médicale gardent un greffon fonctionnel. Cet état sera désigné comme la « tolérance opérationnelle ». L'objectif de cette étude est d'établir une signature de la tolérance et de tenter de comprendre, par la même occasion, les mécanismes qui pourraient expliquer cet état.

II. Description des patients

Nous disposons d'une petite cohorte de 10 patients greffés rénaux (DF-Tol) qui ne reçoivent plus aucun traitement immunosuppresseur depuis au moins 3 ans à l'exception d'un patient qui a arrêté sa thérapie depuis 6 mois (7.65 ans en moyenne ; 0.5-17 ans). Ces patients, appelés « opérationnellement tolérants », présentent une fonction stable définie comme une créatinémie inférieure à 160 μ mol/l et une protéinurie inférieure à 1 g/jour.

Nous avons défini quatre groupes contrôles :

- ✓ des patients sous immunosuppression minimale (MIS) qui ont les mêmes critères de stabilité de la fonction rénale que ceux du groupe DF-Tol mais qui sont sous faible dose de corticostéroïdes (<10mg par jour) depuis 7.1 +/- 6.3 ans.
- ✓ des patients greffés ayant une fonction rénale stable sous immunosuppression standard (Sta)
- ✓ des patients greffés présentant une dégradation progressive de leur fonction rénale et des signes histologiques de rejet vasculaire chronique (CR). Parmi eux, certains ne recevaient plus de traitement immunosuppresseur au moment du prélèvement.
- ✓ des individus sains non greffés sans infection connue depuis au moins 6 mois avant le prélèvement.

III. Résultats

A. Les patients « opérationnellement tolérants » présentent un répertoire lymphocytaire T fortement altéré

Publié Am. J. Transpl, février, 2005

B. Les patients greffés rénaux en rejet chronique présentent un déficit en cellules T CD4+CD25hi et en FOXP3 couplé à la présence de molécules associées à une cytotoxicité sur les lymphocytes T CD4+ par rapport aux patients « opérationnellement tolérants »

En révision, Am. J. Transpl

Kidney recipients with chronic rejection and operational drug-free tolerance display contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells and FOXP3 patterns.

Stéphanie Louis^{1*}, Cécile Braudeau^{1*}, Magali Giral¹, Alexandre Dupont¹, Frédérique Moizant¹, Nelly Robillard², Anne Moreau³, Jean-Paul Soulillou^{1,4} and Sophie Brouard^{1*}.

** Authors contributed equally to this work.*

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.) and Nantes University (UMR 643: “Immunointervention dans les Allo- et Xénotransplantations”) and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), University Hospital of Nantes, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

² Laboratory of Hematology, University Hospital of Nantes, France.

³ Service d’Anatomopathologie, Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu, Nantes, France.

This work was partially supported by the “Fondation Progreffe”, the “Etablissement Français des Greffes” and a European “Indices of Tolerance” grant (EP5: #QLK3-CT-2002-02127).

⁴ Corresponding author: Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France, Tel: +33.2.40.08.74.10, Fax: +33.2.40.08.74.11, e-mail: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Abstract

Whereas immunosuppression withdrawal in kidney recipients usually leads to rejection, in some patients it does not, leading to a state of clinical operational tolerance. We compared these highly contrasted situations by analyzing blood cell phenotype and transcriptional patterns in drug-free spontaneously tolerant kidney recipients, recipients with chronic rejection, recipients with stable graft function under standard or minimal immunosuppression and healthy individuals. The blood cell phenotype of clinically tolerant patients did not differ from that of healthy individuals. In contrast, recipients with chronic rejection had significantly less CD25^{hi}CD4⁺T cells and lower levels of FOXP3 transcripts compared with clinically tolerant recipients. Patients with chronic rejection also displayed CD25⁺CD4⁺T cells expressing NKG2D⁺CD94⁺ and CD57⁺CD27⁻CD28⁻ cytotoxic-associated markers ($p < 0.05$). These data show that whereas clinically tolerant recipients displayed normal levels of CD25^{hi}CD4⁺T cells and FOXP3 transcripts, chronic rejection is associated with a decrease in CD25^{hi}CD4⁺T cells and FOXP3 transcripts, suggesting that clinically “operational tolerance” may be due to a maintained phenomenon of natural tolerance that is lacking in patients with chronic rejection.

Introduction

Continuous improvements in immunosuppression and the clinical management of transplant recipients have contributed to increasing graft survival and to limiting the risks of rejection in kidney transplantation (1). However, such life-long immunosuppression, which poorly influences long-term chronic transplant dysfunction (2), may promote tumor growth by a direct effect on tumoral cells (3) and may also decrease recipient immune responses to pathogens, including oncogenic viruses (4, 5). In humans, immunosuppression withdrawal leads, in most cases, to transplant rejection. Nevertheless, certain rare patients maintain stable graft function despite the absence of treatment, suggesting that a state of non-responsiveness can be achieved in clinical transplantation (6). This phenomenon, which has been particularly described in liver transplantation (7, 8), can also occur in kidney recipients (6). Numerous studies have investigated the mechanisms involved in transplantation tolerance. Data from various experimental models suggest that suppressor/regulatory T cells may be involved in the induction and maintenance of tolerance (9, 10). These cells have been shown to display different phenotypes including CD28⁻CD8⁺T cells, Natural Killer T cells (NKT), IL10-producing Type 1 regulatory cells, “natural” CD25⁺CD4⁺T cells, TGFβ-producing T helper 3 cells, CD4⁻CD8⁻CD3⁺T cells and anergic CD4⁺T cells (see review (11)). Interestingly, some rare studies have also shown that a decrease in the number of natural regulatory CD25⁺CD4⁺T cells may be involved in certain suspected cases of abnormal immune regulation (12-15). A lack of regulation by CD25^{hi}CD4⁺ cells has also been suspected in several clinical conditions such as rheumatoid arthritis (16), multiple sclerosis (14) and GVHD (17). Due to their rarity, few studies have been done on operationally tolerant graft recipients. Recently, Li et al reported phenotypic changes in patients tolerant to liver transplants (18). However, to date, no extensive studies of phenotype or transcriptional patterns have been performed on the blood of kidney recipients with such a highly contrasted clinical state as that between drug-free clinical tolerance and chronic rejection. Furthermore, no indication is available as to whether “operational tolerance” is the result of an active regulatory process that is lacking in chronic rejection. In this paper, we analyzed, for the first time, the blood mononuclear cell phenotype in such patients and extended our study to investigating key factors that have been implicated in regulatory processes (such as FOXP3, CTLA4 and GITR). We report that drug-free clinically tolerant patients have normal numbers of CD25^{hi}CD4⁺T cells and FOXP3 transcripts. In contrast, this phenotype was found to be significantly altered in patients with chronic rejection. These data suggest that the state of clinically “operational tolerance” may

resemble that of self-tolerance and that chronic rejection may be favored by a reduction in CD25^{hi}CD4⁺ cells and low-levels of FOXP3 transcription.

Patients, Materials and Methods

Patients

A total of 8 DF-Tol patients, 11 MIS patients, 17 CR patients, 15 Sta patients and 14 healthy individuals were included in the present study. Because of the rarity of DF-Tol patients and because the experiments performed span several years, the different analyses were not performed on all patients.

Drug-free clinically tolerant recipients (DF-Tol). DF-Tol recipients (n=8; mean age: 46.5; range: 25-73) were patients with a stable kidney graft function in the absence of immunosuppression for at least two years (range: 2-17), except for one who was drug-free for 6 months (19). Seven of the eight patients were cadaveric graft recipients. These patients had a creatinemia inferior to 160µmol/l and a proteinuria below 0.5 g/day, as indicated in figure 1. Biopsies were not taken from these patients due to recommendations by the University Hospital Ethical Committee and the Commit for the Protection of Patients from Biological Risks. Their clinical history is summarized in table 1.

Minimally immunosuppressed recipients (MIS). MIS patients (n=11; mean age: 58; range: 28-83) received low doses (\leq 10mg/day) of prednisone monotherapy and exhibited a creatinemia inferior to 160µmol/l and a proteinuria below 0.5 g/day. All other immunosuppressive drugs had been stopped for 7.1 +/- 6.3 years due to medical reasons. As for the DF-Tol patients, due to ethical reasons, no biopsy was taken from these patients with normal graft function.

Chronic rejection group (CR) (n=17; mean age: 53.1 years; range 27-74). These patients exhibited a progressive degradation of their renal function (figure 1). In all cases, a biopsy confirmed signs of chronic vascular rejection which, in 9 cases (53%), was associated with an allograft glomerulopathy. Eleven of the seventeen patients with chronic rejection were under immunosuppression (***treated CR***). Six patients with CR, who had returned to dialysis and had been off immunosuppressive treatment for at least one year (***DF-CR***), were also studied in an attempt to identify immunosuppressive drug-related patterns. In order to take the effects of

renal insufficiency into account, patients with non immunological kidney diseases (**polycytosis** or uteral reflux) with a moderate-to-severe level of chronic renal failure (creatinemia: 455 $\mu\text{mol/l}$, range: 200-800) (**RI**, n=5) were also included. Finally, 9 patients who had not received a transplant but were on chronic dialysis were also studied (**Dialysis**).

Stable group (Sta) (n=15; mean age 50.5 years; range 22-78). These patients had a creatinemia lower than 160 $\mu\text{mol/l}$ and a proteinuria below 0.5 g/day (figure 1) under standard immunosuppression (calcineurin inhibitor and Azathioprin or mycophenolate mofetyl and/or steroids).

Healthy individuals (N^L) (n=14; mean age 47.9 years; range 25-60). This group included healthy individuals with a normal blood formula and no infectious pathology for at least 6 months prior to the study.

Materials and Methods

Antibodies: Antibodies were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France) (anti-CD45 FITC, anti-CD3 PC5 or PC7, anti-CD4 APC, anti-CD8 APC or PE, anti-CD16 PE, anti-CD56 PE, anti-CD19 PE, anti-CD28 FITC, anti-CD160 PE, anti-CD45RA FITC, anti-CD62L PE, anti-TCR $V\alpha 24$ PE, anti-TCR $\gamma\delta$ FITC, anti-TCR $\alpha\beta$ PE and anti-CD40L PE), from BD Biosciences (Mountain View, CA) (anti-HLADR PE, anti-CD25 PE or FITC, anti-CD4 APC, anti-CCR4 PE, anti-CCR5 PE and anti-CD103 PE), from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) (anti-TLR4 PE) and from R&D Systems (Minneapolis, MN) (anti-GITR PE, anti-CXCR3 PE, anti-CCR7 PE and anti-CCR9 PE).

Purification of blood cell subsets from PBMC and surface antigen analysis: Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) were used directly or conserved in a medium consisting of PBS/50% autologous serum /10% DMSO and frozen in liquid nitrogen. For RNA extraction, PBMC were frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Negative selection of CD4⁺/CD8⁺ T cells was performed using MACS® human CD4⁺ or CD8⁺ T cell isolation kits II (Miltenyi Biotec, Germany). Purity was routinely > 85%. Extracellular four-color staining was performed either on whole blood or on PBMC. For intracellular staining, cells were permeabilized with PBS/0.5% saponin. Four-color staining was analyzed using a FACS Calibur with Cellquest Pro software (BD Biosciences, Mountain View, CA).

Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) : Messenger RNA was reverse transcribed using the M-MLV reverse-transcriptase kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for PBMC and the RT Omniscript kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) for CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Real-time quantitative PCR was performed using labeled TaqMan[®] probes. GAPDH, HPRT, FOXP3, CTLA4, TGFβ1, IL-2, PD1 and GITR quantitative analyses were performed using Assay on Demand products (Applied Biosystems). HPRT and GAPDH were used as endogenous controls to normalize RNA amounts. Transcript levels were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (ABI PRISM 7900 user bulletin, PE Applied Biosystems, Foster City 2:11-24,1997).

Statistical analysis: The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non-parametric tests were performed in the appropriate conditions. A Wilcoxon paired test was used for the stability in time. Differences were defined as statistically significant when $p < 0.05$ (*).

Results

CR recipients display a decrease in circulating B cells.

No significant difference was observed for the CD45RA and CD62L markers for CD4⁺ and CD8⁺ T cells between DF-Tol, CR recipients and healthy individuals (*results available in table 1 online <http://www.blackwell-synergy.com>*). CR recipients displayed a significantly lower absolute number of B cells than DF-Tol recipients ($p < 0.05$) (figure 2) but these numbers were not significantly different to those of healthy individuals. Moreover, drug-free and immunosuppressed CR patients as well as patients on dialysis and patients with renal insufficiency displayed less B cells than DF-Tol recipients ($p < 0.05$) (figure 2). Taken together, this suggests that the difference in blood B cells counts between CR and DF-Tol patients may be more related to renal failure than to chronic rejection per se. Finally, no significant difference was found for NK cells (*results available on table 1 online <http://www.blackwell-synergy.com>*).

CR recipients have less CD25^{hi}CD4⁺T cells than DF-Tol patients and healthy individuals and lack FOXP3 transcripts.

We next looked for markers that have been associated with regulatory T cells in various experimental and clinical situations (9, 20, 21) in purified CD4⁺ and CD8⁺ blood T cells from

the various groups. TCR $\alpha\beta^+$ CD8 $^-$ CD4 $^+$ T cell and CD28 $^-$ CD8 $^+$ T cell numbers did not differ between DF-Tol patients, CR patients and healthy individuals (*exhaustive data are available in table 1 online <http://www.blackwell-synergy.com>*). Interestingly, CR patients displayed significantly less CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells than DF-Tol recipients and healthy individuals, both in absolute value (figure 3) and in percentage (*data not shown*) ($p < 0.05$). This reduction was observed in both the treated CR patients and in the DF-CR recipients ($p < 0.05$) (figure 3), and coincided with the normal average values observed in immunosuppressed stable patients (45.4 +/- 26.3 CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells/ μl), suggesting that this decrease was not related to immunosuppression. It was not due to the initial ATG induction treatment either (*data not shown*). Moreover, the values of CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells in patients on dialysis or with RI were normal (46.7 +/- 21.2 cells/ μl and 54.6 +/- 24.7 cells/ μl respectively, *NS*) (figure 3), indicating that the decrease in CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells was not related to dialysis and/or renal insufficiency. A sequential analysis of these cells was performed in two DF-Tol and two CR patients (at 2 month to 3 year intervals) and showed CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cell numbers to be stable in time ($p = 0.25$).

FOXP3 transcript levels were analyzed in CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells from CR patients, DF-Tol recipients and healthy individuals. Two house keeping genes (HPRT and GAPDH) were used to normalize the FOXP3 transcript levels. Interestingly, a significant decrease in FOXP3/HPRT (and FOXP3/GAPDH, *data not shown*) transcript levels was observed in the CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells of CR patients compared to those of DF-Tol recipients and healthy individuals ($p < 0.05$) (figures 4A, 4B). CTLA4, TGF β 1, IL-2, PD1 and GITR transcript levels did not differ between the different groups (*data not shown*). Taken together, these data suggest a major deficit in CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells and in FOXP3 transcripts in CR patients, rather than an accumulation of these subsets and transcripts in DF-Tol recipients, who display a cell profile similar to healthy individuals.

Recipients under standard immunosuppression with stable graft function display a composite blood phenotype, analogous to that of either DF-Tol or CR patients.

Interestingly, some Sta patients shared characteristics with DF-Tol and/or with CR recipients. As for the DF-Tol group, a significantly higher number of CD25 $^{\text{hi}}$ CD4 $^+$ T cells was detected compared to CR recipients ($p < 0.05$) (figure 3). The levels of FOXP3 and IL2 transcripts were higher in CD8 $^+$ /CD4 $^+$ T cells from Sta patients than in those from CR recipients ($p < 0.05$) (figures 4A, 4B and *data not shown*). They had significantly less B cells ($p < 0.05$) (figure 2), a

lower level of TGF β transcripts in their CD4⁺T cell compartment and a lower level of PD1 transcripts in their CD8⁺T cell compartment (*data not shown*) compared with DF-Tol patients ($p<0.05$). Taken together, these results suggest this group of patients to be highly heterogeneous.

The CD25⁻CD4⁺T cell subset of CR patients expresses molecules associated with a cytotoxic-effector cell phenotype (CD27⁻NKG2D⁺CD94⁺CD57⁺CD28⁻)

We subsequently focused on the expression of chemokine receptors (CCR4, CCR8, CXCR3, CCR5, CCR9 and CCR7), clusters of molecules classically associated with cytotoxic cells (CD28, CD27, CD57, perforin, CD94, NKG2D and KIR-NKAT2), activation/memory markers (CTLA4, CD40L, CD95, CD62L, CD45RO, CD69 and CD127) and regulatory markers (GITR, CD103 and TLR4). For all the molecules tested, the CD25⁺CD4⁺ and CD25^{hi}CD4⁺ T cell populations displayed the same phenotypic profile, i.e. they expressed significantly more CCR4, GITR, CD103 and intracellular CTLA4 than their CD25⁻CD4⁺T cell counterparts ($p<0.05$) (figure 5). Moreover, CR patients were characterized by a CD25⁻CD4⁺T cell population expressing more NK associated molecules, NKG2D, CD94 and CD57 and less CD27/CD28 ($p<0.05$) (figure 6 and *data not shown*) than their CD25⁺CD4⁺T cell counterparts, a pattern that has been associated with cytotoxic-effector cells (22). No difference was observed for the expression of the chemokine receptors (CXCR3, CCR5, CCR7 and CCR8), activation/memory cell markers (CD40L, CD95 and CD45RO) and other molecules associated with cytotoxic-effector cells (intracellular perforin and KIR-NKAT2) (*data not shown*).

Minimally immunosuppressed recipients (MIS) under low-dose corticosteroids are lymphopenic but display the same marker distribution as DF-Tol recipients.

The fact that the MIS recipients displayed a good and stable graft function for years following minor immunosuppressive drug treatment suggests that they may also be clinically “operationally” tolerant. We thus compared their blood cell phenotype with that of DF-Tol recipients. MIS patients were significantly lymphopenic ($p<0.05$), displaying less B cells ($p<0.01$) and consistently less T cells than DF-Tol recipients (TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁺, CD25⁺CD4⁺, CD25^{hi}CD4⁺ (figure 7), as well as less naïve CD45RA⁺CD62L⁺CD8⁺/CD4⁺, central CD45RA⁻CD62L⁺CD4⁺ and effector memory CD45RA⁻CD62L⁻CD4⁺T cell subsets ($p<0.05$)) (*exhaustive data are available online in table 1 <http://www.blackwell-synergy.com>*). Nevertheless, they exhibited a percentage of CD25⁺CD4⁺, CD25^{hi}CD4⁺T cells and B cells

similar to that of DF-Tol recipients (figure 7). Taken together, our results show that, whereas MIS patients had significantly lower absolute B and T cell numbers, probably due to a combination of chronic steroid intake (23), a past history of chemotherapy for malignancies and/or ATG induction treatment (24), they displayed percentages of CD25^{hi}CD4⁺T cells and B cells similar to DF-Tol recipients.

Discussion

In this study, we analyzed blood cell phenotype and transcriptional patterns in kidney recipients presenting various clinical statuses: clinically operational tolerance (drug-free or under minimal immunosuppression), chronic rejection and stable function under standard maintenance immunosuppression. These patterns were also compared with those of healthy individuals. The existence of such drug-free patients with a perfectly stable renal function suggests that tolerance, tentatively defined as “*a state of quiescence of the transplanted organ, functioning without a destructive immune response*” (25), can occur in clinical transplantation. Clinically tolerant kidney recipients are extremely rare and the time interval between engraftment and testing often exceeds a decade. Recently, we showed that some of these recipients displayed altered blood V β families with low accumulation of IL10, IL2, IL13 and IFN γ transcripts compared with chronically rejecting patients (19) suggesting hyporesponsiveness. The subsequent lack of viable donor cells (all involved a cadaveric donor) meant that we were unable to directly test their anti-donor response. Nevertheless, T cells from these recipients do proliferate following anti-CD3/anti-CD28 or allogeneic stimulation and, when stimulated polyclonally, their T cells produced normal quantities of Th1 and Th2 cytokines (*data not shown*). Despite the necessity of an analysis of the reactivity of these patients to surrogate donors or specific peptides (which has not yet been described in the literature), these primary data suggest that the hypothesis of hyporesponsiveness may not explain the tolerant state of these patients.

A possible mechanism that may explain the clinically tolerant status observed in these patients is the generation of regulatory cells, an active process that has been shown to contribute to the maintenance of established graft tolerance (9, 10) as well as self-tolerance (26) in various experimental models. However, to date, no specific phenotype or transcriptional pattern has been described in the blood of recipients with highly contrasted clinical situations (drug-free clinical tolerance or recipients with chronic rejection) and finally, no indication is available concerning an active regulatory process in “tolerance” or a lack of it in chronic rejection. In humans, regulatory CD25^{+/hi}CD4⁺T cells, described in the blood (27, 28) and thymus (29, 30)

of healthy individuals, have been suggested to be involved in various pathological situations associated with abnormal self regulation (13-15, 31-33). Whereas drug-free clinically tolerant patients displayed numbers of peripheral CD25^{hi}CD4⁺T cells (17, 34, 35) expressing intracellular CTLA4 (27), GITR (36), CCR4 (37) and CD103 (38) similar to healthy individuals, patients with chronic rejection exhibited a profound reduction in CD25^{hi}CD4⁺T cells. This reduction was not due to immunosuppressive therapy, dialysis or the level of renal insufficiency, as shown using appropriate controls. Unfortunately, the putative regulatory function of CD25^{hi}CD4⁺T cells (17, 34, 35) could not be assessed in this study because of the limited availability of blood from these patients. A recent study in a model of lung transplantation (39) also suggests that a decrease in absolute CD25^{hi}CD4⁺T cell number may contribute to the development of chronic rejection. Our results are in accordance with the recent study by Li et al., who reported that tolerant liver recipients display as many CD25^{hi}CD4⁺ T cells (in absolute number) as healthy volunteers (18), whereas in the latter study, no comparison was made to patients with chronic rejection and CD25^{hi}CD4⁺ T cells were not characterized.

We also made the original observation that FOXP3 transcripts were strongly decreased in the CD4⁺ and CD8⁺T cell subsets from chronically rejecting recipients compared with drug-free clinically tolerant patients and healthy individuals. FOXP3 has recently been proposed as one of the most relevant markers for CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in mice (40) and humans (41), and its decrease has been correlated with pathological disorders such as the development of GVHD (42) or autoimmune Myasthenia Gravis (43). Because of the low quantity of blood available for these patients, FOXP3 analysis was not performed directly in purified CD25^{hi}CD4⁺ T cells but a positive correlation between CD25 expression and FOXP3 transcript levels was observed in the CD4⁺T cells of the drug-free tolerant patients ($r= 0.74$), whereas these molecules were negatively correlated in the chronic rejection group ($r= -0.78$). However it remains to be determined whether this FOXP3 level is due to an increase in the amount of FOXP3 per CD25^{hi}CD4⁺ T cell or simply to the higher CD4⁺CD25⁺ cell number in the clinically operationally tolerant patients compared to patients with chronic rejection. In any case, both alternatives point towards a significant lack of CD25^{hi}CD4⁺ T cells and FOXP3 in patients with chronic rejection.

Suciu-Foca and co-workers reported the presence of suppressive CD28⁻CD8⁺T cells that were able to inhibit the up-regulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86 on donor antigen presenting cells in liver and kidney recipients with stable graft function (44). Neither the drug-free tolerant patients nor the immunosuppressed patients with a stable renal function

from our own study displayed more blood CD28⁻CD8⁺T cells than CR recipients. These different results may be related to the fact that, in Suciú-Foca's work, the analysis was not performed in clinically tolerant patients but in stable patients under immunosuppression. In addition, this potentially suppressive population was only found in 40% of patients and only in the first few months following transplantation (45). Our patients (clinically tolerant and stable) were tested at a much later time point post transplantation.

Surprisingly, CD25⁻CD4⁺T cells with a cytotoxic-associated phenotype (CD94⁺, NKG2D⁺, CD57⁺, CD27⁻, CD28⁻) (46, 47) were more abundant in patients with chronic rejection compared to drug-free clinically tolerant patients. Based on data from experimental animal studies, two hypotheses may explain this finding. Firstly, such cells may be induced directly against donor alloantigens and induce graft rejection (48). Secondly, they may originate from pre-existing cells cytotoxic to viruses and cross-reactive with donor cells (49).

Finally, chronic rejection recipients displayed a reduced number of B cells in comparison with drug-free clinically tolerant patients and healthy individuals, a finding already reported for tolerant liver recipients (18). However, this feature seems to be related to the immunosuppressive treatment, dialysis and/or the renal insufficiency rather than being specifically associated with chronic rejection. Finally, our data also show that, despite a significant lymphopenia, probably due to ATG (24), chemotherapy and chronic steroid intake (23), minimally immunosuppressed patients displayed a percentage of CD25^{hi}CD4⁺T cells similar to drug-free clinically tolerant recipients. Thus, on the basis of their clinical status (i.e. stable long-term renal function with minimal immunosuppression), T cell phenotype and repertoire (19), this pattern suggests that minimally immunosuppressed patients may also be tolerant.

Taken collectively, our data suggest that clinically "operational" tolerance is not primarily due to an increased CD25^{hi}CD4⁺ T cell pool. In addition, we show, for the first time, a reduction in the blood CD25^{hi}CD4⁺ pool and FOXP3 transcripts in patients with chronic rejection, suggesting that clinically "operational tolerance" may be due to a maintained phenomenon of natural tolerance that is lacking in patients with chronic rejection. We suggest that this newly described defect may contribute to the development of chronic rejection and should be studied longitudinally following transplantation to discriminate clinically tolerant patients from patients who may develop chronic rejection in the context of reduced immunosuppressive therapy.

Acknowledgments

The authors thank Dr. P. Romagnani for technical advice and assistance for chemokine receptor staining, and Prof. C. Legendre (Hospital St Louis, Paris, France), Dr J.F. Subra (Angers Hospital, France), Dr E Cassuto-Viguiet and Dr J.M. Rebibou (Hospital St Jacques, Besancon, France) for providing samples and clinical data for four patients. We also thank Dr. J. Ashton-Chess for editing the manuscript and Dr. Cristina Cuturi for critically reading the manuscript.

Abbreviations

ATG : Anti-ThymoGlobulin

Aza : Azathioprine

CMV : CytoMegaloVirus

CNI : Calcineurin Inhibitor

CS : CorticoSteroids

CsA : Cyclosporin A

CR : Chronic Rejection

DF-Tol : Drug-Free Tolerant

EBV : Epstein-Barr Virus

FOXP3: Forkhead Box P3

GITR: Glucocorticoid-Induced TNF Receptor

GVHD: Graft-versus-Host Disease

HCV : Hepatitis C Virus

HLA : Human Leukocyte Antigen

HPRT: Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase

IS : ImmunoSuppression

MIS : Minimally ImmunoSuppressed

NA : Not Available

NKT : Natural Killer T cells

N^L : Normal Individuals

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PTLD : Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders

Sta : Stable Recipients

SD : Standard Deviation

Legends

Table 1: Clinical history of DF-Tol patients (n=8). One patient (patient DF-Tol#4) received a second graft. The mean HLA-A, -B and -DR incompatibility was 2.6. Three patients received an induction therapy after transplantation with a 10-day course of an anti-IL2-R α antibody (DF-Tol#5), a 15-day therapy of ATG (DF-Tol#6) and a 6-day therapy of ATG (DF-Tol#4). One patient (DF-Tol#2) underwent 2 acute rejection episodes and two patients (DF-Tol#7, DF-Tol#8). No patient in this group had a CMV disease during their follow-up. The patient DF-Tol#4 and DF-Tol#8 were chronically infected by the hepatitis C virus and the DF-Tol#6 had a Herpes Virus.

	DF-Tol 1	DF-Tol 2	DF-Tol 3	DF-Tol 4	DF-Tol 5	DF-Tol 6	DF-Tol 7	DF-Tol 8
Patient age at study time	37	73	71	24	38	58	36	38
Patient sex	Male	Female	Male	Male	Male	Male	Male	Male
Number of graft	1	1	2	1	1	1	1	1
Year of graft	1998	1993	1974	1991	2000	1987	1987	1981
Induction therapy (duration)	No	No	No	ATG (6 days)	anti-RIL2 mAb	ATG (15 days)	ND	No
HLA-A B-DR inc.*	0 (living related donor)	3 ^B	ND	3	3	4	ND	2 (HLA-DR typing not performed)
Pre-graft anti T PRA (%)	0	0	ND	0	ND	0	ND	0
Acute rejection episode	No	2	No	No	No	No	1	1
CMV infection	No	No	No	No	No	No	ND	No
Other viral infections	No	No	HCV	No	No	Herpes	ND	HCV
Reason of IS interruption	uncompliance	CNI toxicity	uncompliance	PTLD	uncompliance	uncompliance	uncompliance	uncompliance
Time period Drug Free	3 years	8 years	12 years	3 years	6 months	3 years	7 years	17 years

s: indicates typing by serology

Table 1

Figure 1: Graft function according to each patient group

Creatinemia and daily proteinuria in the DF-tol (■), Sta (▲) or CR (▼) patient groups. DF-tol and Sta patients display the same low level of each parameter, significantly lower than in the CR group.

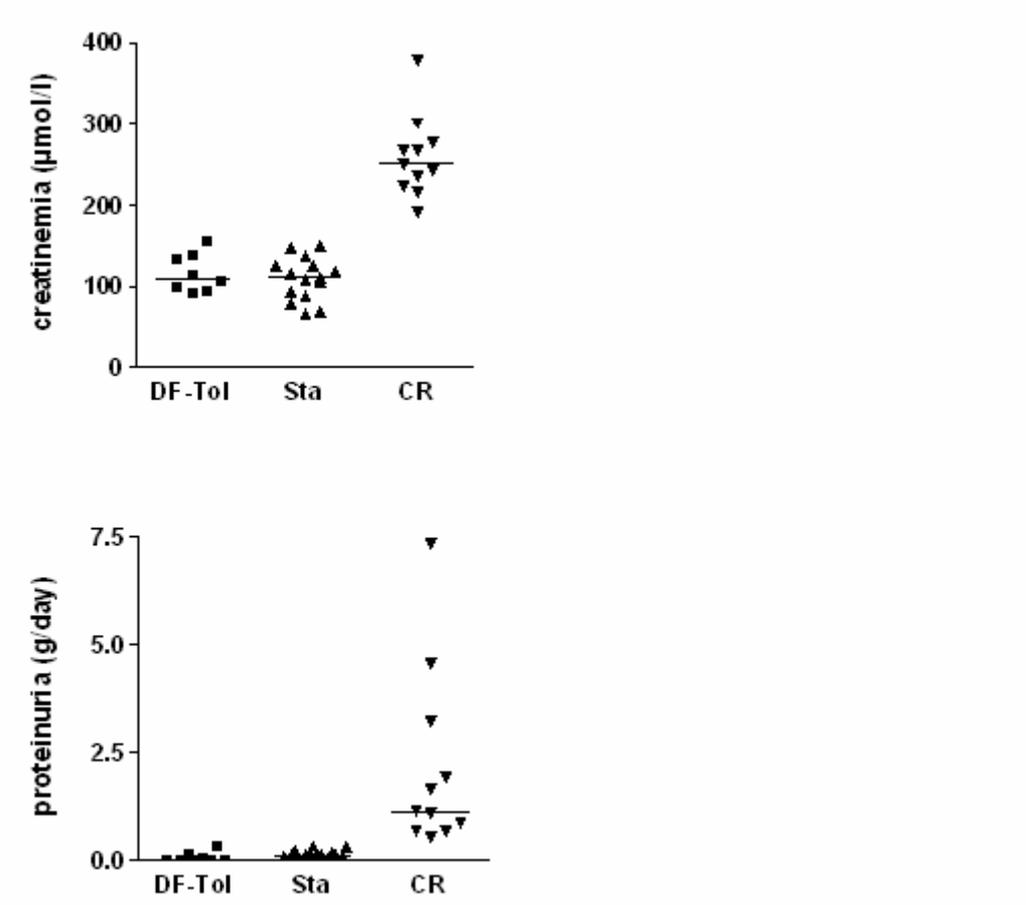


Figure 1

Figure 2: B cell population in the different patient groups. The blood cell counts of DF-Tol (n=5), CR (n=10), Sta (n=12) recipients and N^L individuals (n=9) are compared for B cells. To test the influence of immunosuppression, dialysis and renal insufficiency, four control groups were also compared (DF-CR, treated CR, dialysis and RI). The results are expressed as cell number per microliter of blood. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$.

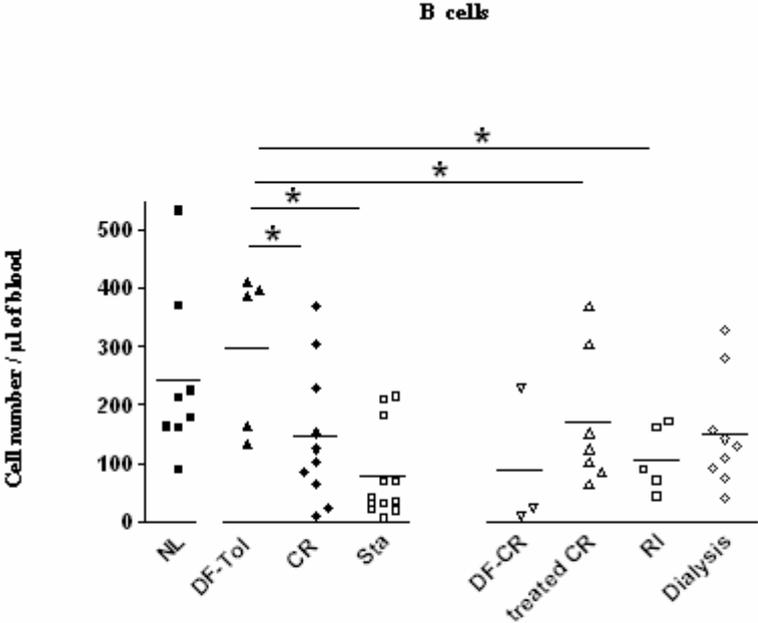


Figure 2

Figure 3: “Potentially regulatory” CD25^{hi}CD4⁺T cells in DF-Tol and CR recipients. Peripheral CD25^{hi}CD4⁺T cells from DF-Tol (n=4), CR (n=10), Sta (n=12) recipients and N^L individuals (n=9) are compared. To test the influence of immunosuppression, dialysis and renal insufficiency, four control groups were also compared (DF-CR, treated CR, dialysis and RI). The results are expressed as cell number per microliter of blood. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$.

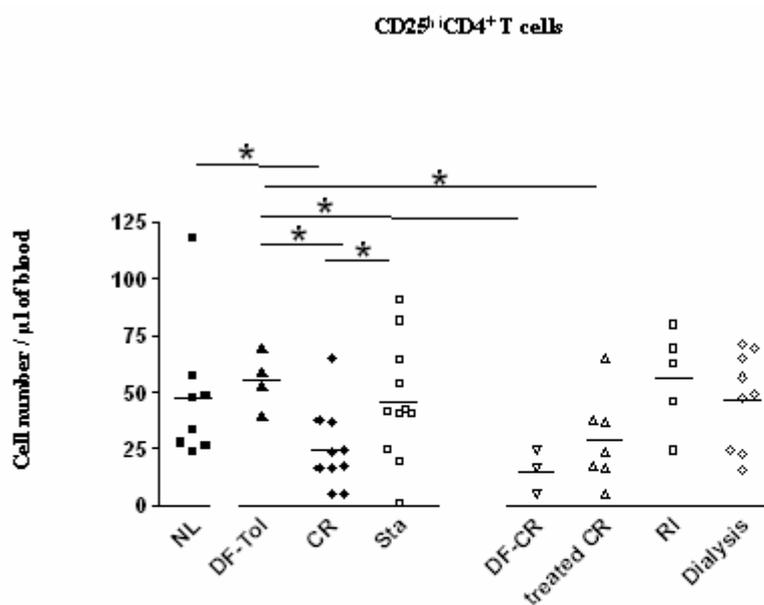


Figure 3

Figure 4: FOXP3 transcript analysis in CD4⁺ and CD8⁺T cells from different groups. Real-time PCR analysis at the FOXP3 mRNA level (normalized with HPRT) were performed on peripheral CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells from DF-Tol (n=4), CR (n=6) and Sta (n=5) kidney recipients and healthy individuals (n=5). Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$.

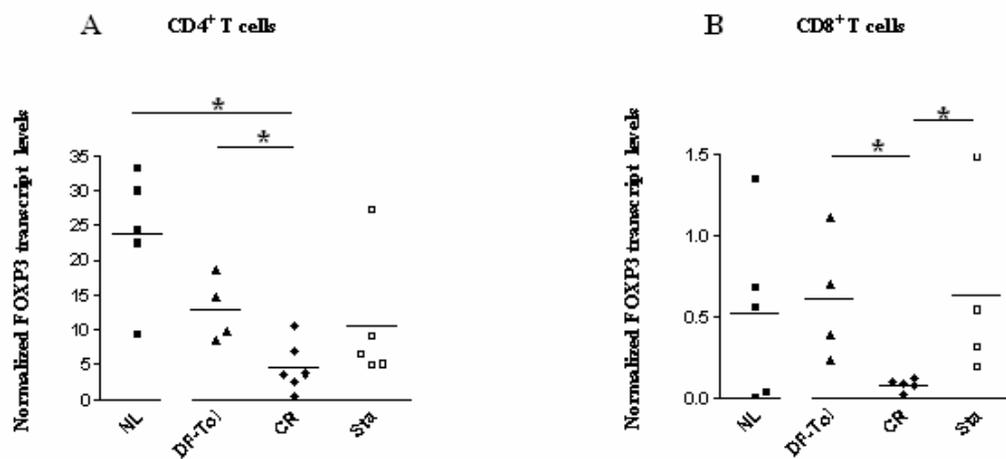


Figure 4

Figure 5: Expression of “potentially regulatory” molecules in the CD25⁺CD4⁺ versus the CD25⁻CD4⁺T cells. “Potentially regulatory” molecules were compared in the CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺T cell subsets from DF-Tol and CR patients and healthy individuals. Representative dot plots of differentially expressed molecules between the CD25⁺CD4⁺ (left panel) and CD25⁻CD4⁺ (right panel) T cell subsets in DF-Tol recipients are shown with the corresponding mean percentage.

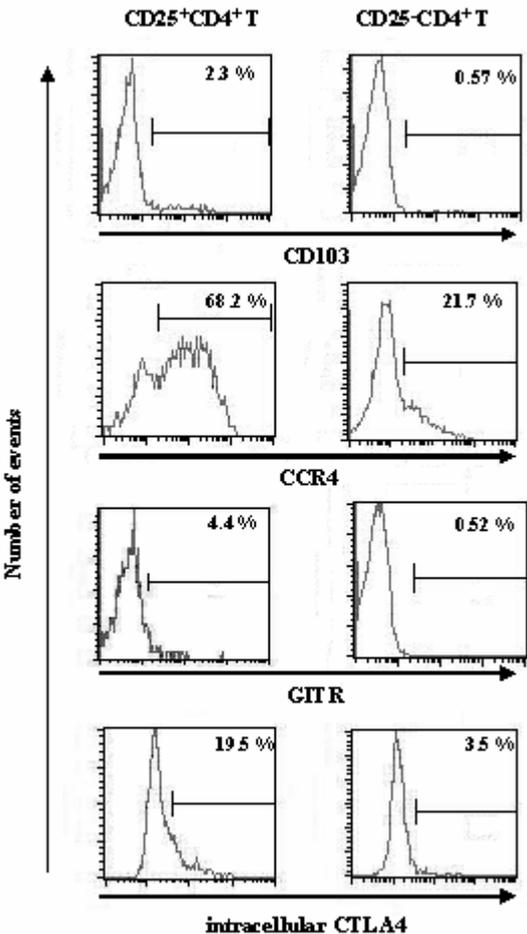


Figure 5

Figure 6: Comparison of the expression of cytotoxic molecules in the CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺T cell subsets between DF-Tol and CR recipients. The results are expressed as the percentage of positive cells amongst the gated CD25⁺CD4⁺ and CD25⁻CD4⁺T cells of the DF-Tol (n=4) and CR (n=4) patients. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$.

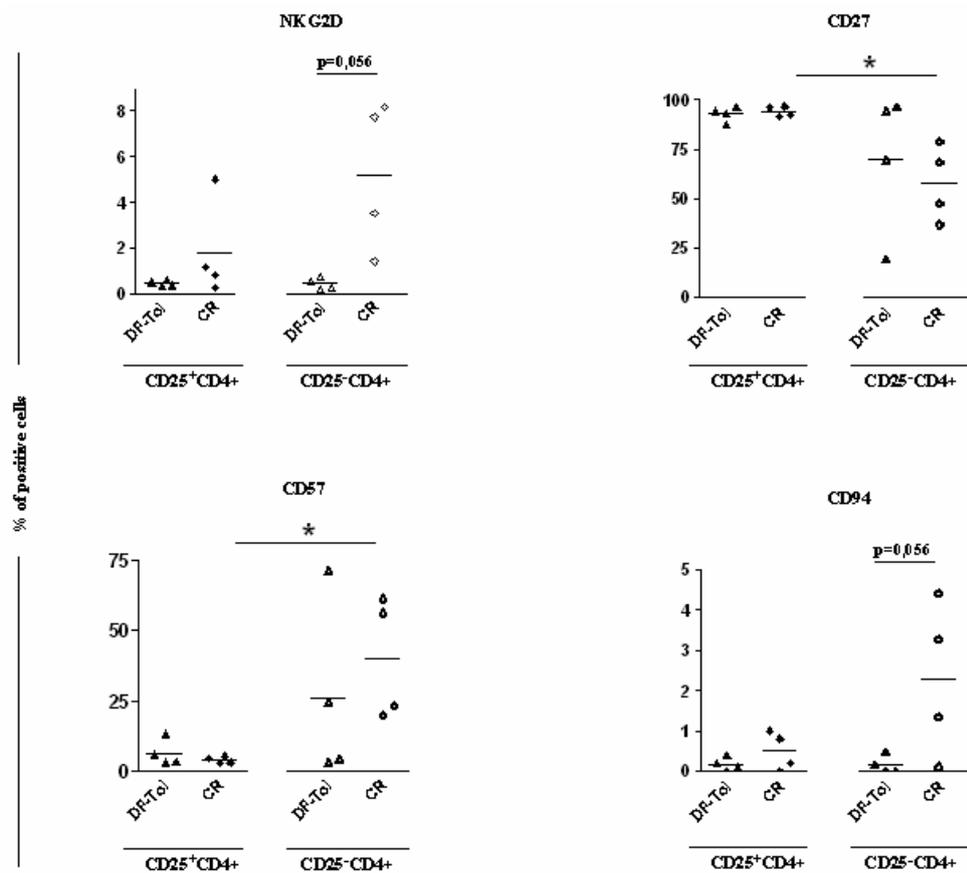


Figure 6

Figure 7: B cells, CD25^{hi}CD4⁺ T cells and CD25⁺CD4⁺T cells in DF-Tol and MIS recipients. Blood cell populations found differentially expressed between DF-Tol and CR recipients were compared between DF-Tol (n=5) and MIS (n=11) patients. The results are expressed in cell number per μ l of blood (upper panel) and in percentage of positive cells (lower panel).

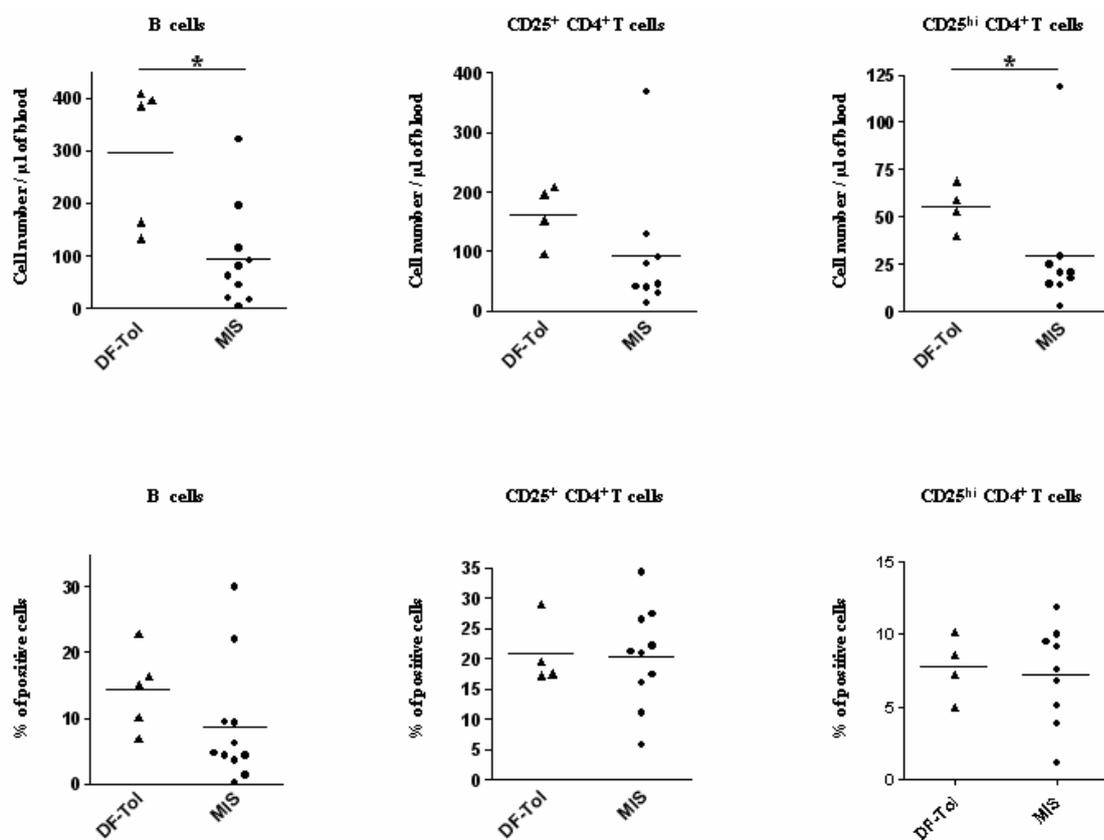


Figure 7

Legend of supplementary table

Table 1: Phenotype of the peripheral blood cells of the DF-Tol, MIS, CR, Sta and N^L groups. Values for the DF-Tol (n=5), MIS (n=11), CR (n=10), Sta (n=12) and N^L (n=9) groups are compared. Significant differences are defined as $p < 0.05$ versus groups indicated in brackets (NS, not significant). Analysis of activation molecules, potentially regulatory cells, TCR $\alpha\beta$ /TCR $\gamma\delta$, CD28, CD160, naive and effector/central memory T cells were performed. Values are expressed as mean +/- SD of cell number per microliter of blood.

Table 1
(online)

	DF-Tol	MIS	CR	Sta	N ^L	p value of DF-Tol versus groups in brackets	p value of MIS versus DF-Tol	p value of MIS versus groups in brackets
Lymphocytes								
CD3 ⁺ T cells	1548.2 +/- 456.6	794.4 +/- 547.6	1690.3 +/- 1003.2	1355.8 +/- 771.5	1478 +/- 448.5	NS	p<0.05	p<0.05 (vs. NL, CR, Sta)
NK cells	249.2 +/- 164	222.4 +/- 127.1	347.8 +/- 328.8	165.4 +/- 196.1	307.9 +/- 125.5	NS	NS	NS
B cells	297.5 +/- 136.3	95.1 +/- 97.3	149.4 +/- 113.5	76.1 +/- 77.9	240.6 +/- 142.6	p<0.05 (vs. Sta, CR)	p<0.05	p<0.05 (vs. NL)
T lymphocytes								
CD4 ⁺ T cells	789.3 +/- 216.3	363.6 +/- 362.4	829.2 +/- 269	803.7 +/- 393.8	928 +/- 281.8	NS	p<0.05	p<0.05 (vs. NL, CR, Sta)
CD8 ⁺ T cells	521.2 +/- 142.7	341.1 +/- 189.8	610.2 +/- 520.1	446.6 +/- 391.8	487 +/- 211.8	NS	NS	NS
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells	50.8 +/- 14.4	56.4 +/- 63.2	67.8 +/- 51.1	69.7 +/- 109.5	64.5 +/- 39.8	NS	NS	NS
CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells	15.6 +/- 9	6.8 +/- 8.2	68.8 +/- 117.2	32.3 +/- 64	27.8 +/- 28	NS	NS	NS
Activation molecules								
HLA DR ⁺ CD3 ⁺ T cells	236 +/- 59.9	171 +/- 168.6	396.6 +/- 535.5	122.3 +/- 78.1	153.9 +/- 96.7	p<0.05 (vs. Sta)	NS	NS
HLA DR ⁺ CD4 ⁺ T cells	74.1 +/- 7.7	55 +/- 63.8	138.7 +/- 21.4	49.9 +/- 30.5	58.8 +/- 27.5	p<0.05 (vs. Sta, NL)	p<0.05	NS
CD25 ⁺ CD3 ⁺ T cells	81.5 +/- 73.7	64.6 +/- 84.1	67.7 +/- 58.1	140.8 +/- 98.4	175.6 +/- 97.1	NS	NS	p<0.05 (vs. NL, Sta)
"Potentially regulatory" cells								
CD25 ⁺ CD4 ⁺ T cells	184.7 +/- 45.8	93 +/- 109.2	138 +/- 108	166.4 +/- 94	172.1 +/- 92.2	NS	p<0.05	NS
CD25 ^{hi} CD4 ⁺ T cells	55.2 +/- 12.2	29.2 +/- 34.4	27.5 +/- 18.9	45.4 +/- 26.3	47.7 +/- 30.9	p<0.05 (vs. CR)	NS	NS
CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	160.8 +/- 55.1	165.2 +/- 144.4	423.9 +/- 626.5	260.9 +/- 364.5	154.2 +/- 128.5	NS	NS	NS
V α 14 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells	0.8 +/- 0.7	0.3 +/- 0.6	0.2 +/- 0.3	0.9 +/- 1.8	0.6 +/- 0.5	NS	NS	NS
TCR $\alpha\beta$ /CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells	15.4 +/- 9	16.6 +/- 13	18.2 +/- 14.8	24.3 +/- 37.3	18.7 +/- 12.5	NS	NS	NS
TCR$\alpha\beta$ and TCR$\gamma\delta$								
TCR $\gamma\delta$ /CD4 ⁺ CD8 ⁺ T cells	33.9 +/- 7.2	39.1 +/- 51	53.4 +/- 52.8	43.4 +/- 63.6	43.1 +/- 31.5	NS	NS	NS
TCR $\alpha\beta$ /CD4 ⁺ T cells	1345.2 +/- 356.3	705 +/- 493.8	1489.4 +/- 839.3	1267.8 +/- 677.8	1424.9 +/- 425.3	NS	p<0.05	p<0.05 (vs. NL, CR, Sta)
TCR $\gamma\delta$ /CD4 ⁺ T cells	52.6 +/- 42.4	58 +/- 78.1	79.9 +/- 103.8	83.1 +/- 185	49.9 +/- 26.4	NS	NS	NS
CD28 expression								
CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	44.1 +/- 18.2	60.9 +/- 109.9	188.2 +/- 285.2	66.1 +/- 127.2	72.1 +/- 79.8	NS	NS	NS
CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	362 +/- 192.1	170.4 +/- 107.1	246.8 +/- 184.1	205.2 +/- 125.9	285.8 +/- 137	p<0.05 (vs. Sta)	p<0.05	NS
CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	81.6 +/- 273.4	399.5 +/- 395.3	736.2 +/- 265.9	609.8 +/- 363.4	844.8 +/- 308.1	NS	p<0.05	p<0.05 (vs. NL, CR, Sta)
CD160 expression								
CD160 ⁺ CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	118.7 +/- 45.4	106 +/- 96.7	231 +/- 389.8	220.6 +/- 307.2	133.5 +/- 96.3	NS	NS	NS
CD160 ⁺ CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	338.7 +/- 189.9	153 +/- 107.2	154.8 +/- 85.5	188.7 +/- 118	286.6 +/- 107.7	p<0.05 (vs. CR, Sta)	p<0.05	p<0.05 (vs. NL)
CD160 ⁺ CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	40.8 +/- 28.4	66.8 +/- 79.8	247 +/- 301.5	43.9 +/- 61	35.4 +/- 53.8	NS	NS	NS
CD160 ⁺ CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells	31.4 +/- 12.4	21.7 +/- 20.4	36.1 +/- 20.1	26.1 +/- 26.5	35.3 +/- 29.1	NS	NS	NS
Naive T cells								
CD62L ⁺ CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T cells	198.5 +/- 67.3	92.7 +/- 57.6	299.9 +/- 276.8	160 +/- 141.8	224.2 +/- 136.2	NS	p<0.05	p<0.05 (vs NL)
CD62L ⁺ CD45RA ⁺ CD4 ⁺ T cells	205.8 +/- 73	62.8 +/- 99.8	215 +/- 129.4	305.3 +/- 270.7	385.9 +/- 99.1	NS	p<0.05	p<0.05 (vs NL, Sta)
Effector memory T cells								
CD62L ⁻ CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T cells	45.1 +/- 31.2	62.4 +/- 96.3	191.2 +/- 239.7	159.5 +/- 309.6	73.2 +/- 49.6	NS	NS	NS
CD62L ⁻ CD45RA ⁺ CD4 ⁺ T cells	6.8 +/- 7.8	6.7 +/- 8.8	63.6 +/- 110.2	41.5 +/- 120.6	36.3 +/- 54.6	NS	NS	p<0.05 (vs. CR)
CD62L ⁻ CD45RA ⁺ CD8 ⁺ T cells	128.5 +/- 40.9	93.3 +/- 81.3	179.2 +/- 182.4	86.6 +/- 67.8	114.3 +/- 66.4	NS	NS	NS
CD62L ⁻ CD45RA ⁺ CD4 ⁺ T cells	151.5 +/- 46.8	85 +/- 59.5	240 +/- 171.3	136.5 +/- 106.9	134.3 +/- 101.9	NS	p<0.05	p<0.05 (vs CR)
Central memory T cells								
CD62L ⁺ CD45RA ⁻ CD8 ⁺ T cells	158.1 +/- 84.9	78.9 +/- 76.1	100.8 +/- 73.8	72.4 +/- 73.1	80 +/- 47.2	p<0.05 (vs. Sta)	NS	NS
CD62L ⁺ CD45RA ⁻ CD4 ⁺ T cells	424.1 +/- 138	225.9 +/- 226.4	326.5 +/- 125.4	349.7 +/- 192.4	375.6 +/- 220.9	NS	p<0.05	NS

References

1. Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
2. Opelz G. Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine and steroids on chronic allograft failure. The Collaborative Transplant Study. *Kidney Int Suppl* 1995; 52: S89-92.
3. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999; 397: 530-534.
4. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanche G, Dreno B, Soulillou JP. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998; 351: 623-628.
5. Soulillou JP, Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001; 72: S89-93.
6. Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000; 69: 1549-1554.
7. Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Bentelejewski C, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Fung JJ, Jankowska-Gan E, Burlingham WJ, Heeger PS, Zeevi A. Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation* 2001; 72: S13-22.
8. Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant* 2005; 5: 314-322.
9. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
10. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002; 168: 5058-5069.
11. Jiang S, Lechler RI. Regulatory T cells in the control of transplantation tolerance and autoimmunity. *Am J Transplant* 2003; 3: 516-524.
12. Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, Klatzmann D. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; 103: 3428-3430.
13. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 606-612.
14. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of Functional Suppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199: 971-979.
15. Salama AD, Najafian N, Clarkson MR, Harmon WE, Sayegh MH. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1643-1651.
16. Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003; 33: 215-223.
17. Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, Begum G, Mahendra P, Craddock C, Moss P, Chakraverty R. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004; 103: 2410-2416.
18. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 2118-2125.
19. Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, Degauque N, Moizant F, Pallier A, Ruiz C, Guillet M, Laplaud D, Soulillou JP. Operationally Tolerant and Minimally

- Immunosuppressed Kidney Recipients Display Strongly Altered Blood T-Cell Clonal Regulation. *Am J Transplant* 2005; 5: 330-340.
20. Ciubotariu R, Vasilescu R, Ho E, Cinti P, Cancedda C, Poli L, Late M, Liu Z, Berloco P, Cortesini R, Suci-Foca Cortesini N. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum Immunol* 2001; 62: 15-20.
 21. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000; 6: 782-789.
 22. Tarazona R, DelaRosa O, Alonso C, Ostos B, Espejo J, Pena J, Solana R. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mech Ageing Dev* 2000; 121: 77-88.
 23. Shoenfeld Y, Gurewich Y, Gallant LA, Pinkhas J. Prednisone-induced leukocytosis. Influence of dosage, method and duration of administration on the degree of leukocytosis. *Am J Med* 1981; 71: 773-778.
 24. Oertel M, Sack U, Kohlhaw K, Lehmann I, Emmrich F, Berr F, Hauss J, Schwarz R. Induction therapy including antithymocyte globulin induces marked alterations in T lymphocyte subpopulations after liver transplantation: results of a long-term study. *Transpl Int* 2002; 15: 463-471.
 25. Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001; 14: 399-406.
 26. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 423-449.
 27. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1303-1310.
 28. Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 2001; 193: 1295-1302.
 29. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 2002; 196: 379-387.
 30. 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: 1247-1254.
 31. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772.
 32. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-2761.
 33. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective Suppressor Function of Human CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in Autoimmune Polyglandular Syndrome Type II. *J Exp Med* 2004; 199: 1285-1291.
 34. Putheti P, Soderstrom M, Link H, Huang YM. Effect of glatiramer acetate (Copaxone) on CD4+CD25high T regulatory cells and their IL-10 production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 144: 125-131.
 35. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. Cd4(+)cd25(high) regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245-1253.
 36. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG. Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196: 1335-1346.
 37. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors ccr4 and ccr8 by cd4(+)cd25(+) regulatory t cells. *J Exp Med* 2001; 194: 847-854.
 38. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13031-13036.

39. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, Mazzucchelli I, Ciardelli L, Oggioni T, Fietta AM, Pozzi E, Vigano M. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004; 77: 762-766.
40. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-1061.
41. Walker RM, Kasrowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 1437-1443.
42. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui EC, Matsui WH, Arai S, Fuchs EJ, Vogelsang GB, Jones RJ, Hess AD. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004.
43. Balandina A, Lecart S, Darteville P, Saoudi A, Berrih-Aknin S. Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune Myasthenia Gravis. *Blood* 2004.
44. Cortesini R, Renna-Molajoni E, Cinti P, Pretagostini R, Ho E, Rossi P, Suci-Foca Cortesini N. Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. *Hum Immunol* 2002; 63: 1010-1018.
45. Cortesini R, Suci-Foca N. The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol* 2004; 13: 101-104.
46. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997; 186: 1407-1418.
47. Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* 2004; 103: 3065-3072.
48. Ito A, Minagawa M, Tomiyama K, Ito M, Kawai K. Cytotoxic pathways in the skin allograft rejection by CD4+ T cells. *Transplantation* 1999; 68: 97-100.
49. Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A. T cells primed by *Leishmania* major infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* 2002; 169: 3686-3693.

C. Les patients greffés rénaux en rejet chronique présentent une augmentation de lymphocytes T CD8+ « cytotoxiques » par rapport aux patients « opérationnellement tolérants »

En révision, J Am Soc Nephrol



Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients

Dominique Baeten^{1,2}, Stéphanie Louis¹, Christophe Braud¹, Cécile Braudeau¹, Annaik Pallier¹, Magali Giral¹, Sophie Brouard^{1*}, Jean-Paul Soulillou^{1*}

¹Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 643: “Immunointervention dans les Allo- et Xénotransplantations” and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), Nantes, France. ²Department of Rheumatology, Ghent University Hospital, Belgium. * Both last authors contributed equally.

Corresponding author: Prof. Dr. Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail : jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

Subject : Transplantation. Word count: 3636

Key words: transplantation, drug-free tolerance, chronic rejection, CD8+ lymphocytes, cytotoxicity

Abstract

A substantial proportion of kidney graft recipients with stable renal function in absence of immunosuppressive therapy are characterized by a skewed TCR Vbeta chain usage, essentially in the CD8+ subset, which may be involved in the maintenance of the tolerant state. Therefore, the present study analyzes in more detail phenotypical and functional alterations of CD8+ lymphocytes in drug-free tolerant patients (DF-Tol) compared to recipients with chronic rejection (CR). Phenotyping revealed a significant increase of CD45RA-CCR7+ central memory and a decrease of CD45RA+CCR7-effector CD8+ lymphocytes in DF-Tol versus CR. The expression of CD28+ and CD27+ on effector and effector memory (CD45RA-CCR7-) CD8+ lymphocytes was also significantly decreased in CR. These profiles were stable over time and independent of treatment. CD8+ CD28- cells were characterized by high levels of cytotoxicity-associated molecules such as perforin, granzyme A, and CD57, especially in CR. The CD8+ CD28- lymphocytes expressed lower levels of Fas and were less sensitive to apoptosis than their CD8+ CD28+ counterparts in all disease groups. CD8+ cells from healthy individuals displayed the same profile as DF-Tol, indicating an increase of CD8+ CD28- effector lymphocytes in CR rather than a decrease in DF-Tol. CD8+ lymphocytes from stable kidney function under conventional maintenance immunosuppression displayed a mixed profile. Taken collectively, our data show a strong cytotoxicity-associated CD8+ CD28- signature which differentiates CR from DF-Tol and suggests a suppression of pathological cytotoxicity in DF-Tol. In this respect, CD8+ phenotypes may help to identify patients at risk for CR when immunosuppression is tapered.

Introduction

Drug-free tolerance, defined as long term maintenance of graft integrity and function without immunosuppression, is a rare event in human kidney transplantation since interruption of immunosuppressive treatment usually leads to acute or chronic graft rejection. Nevertheless, this phenomenon is of unique interest to study the physiological basis of graft tolerance in humans. On the one hand, long term drug-free tolerant patients (DF-Tol) represent a unique model to study in how far mechanisms of tolerance defined experimentally, such as active suppression by regulatory lymphocytes, ignorance of alloantigens, chimerism, homeostatic regulation or clonal deletion, are relevant to this human situation (1-4). Most of the studies in rodent models analyzed the induction rather than maintenance phase of tolerance and discrepancies with the human situation may exist, as exemplified by the role of alloreactive CD8⁺ central memory cells in rejection and tolerance induction (5,6). On the other hand, the characterization of peculiar immunological profiles in DF-Tol may be clinically important to identify biological signatures associated with graft tolerance. Considering the major medical and economic burden of chronic immunosuppression and the fact that operational tolerance may be more common than expected but could be masked in long-term immunosuppressed patients, the identification of specific biological signatures of tolerance could open new perspectives for rational rather than empiric minimizing of immunosuppressive drugs in well-selected patients (6-10).

As a proof of concept of the validity and relevance of the DF-Tol model to study human tolerance, we described recently a number of specific immunological features in these patients. Firstly, DF-Tol patients were characterized by a decrease of CD45RA⁺ CD62L⁻ CD4⁺ effector cells and a maintenance of CD25^{high} CD4⁺ lymphocytes expressing regulation-associated molecules such as GITR, CCR4, and CD103, in comparison with patients with chronic rejection of their allograft (CR) (*Louis S et al, submitted*). This was associated with maintenance of a normal level of the regulation-related transcription factor FoxP3 mRNA in peripheral blood lymphocytes of DF-Tol and a decrease in CR. Secondly, peripheral blood T cells of a substantial proportion of DF-Tol and CR displayed a skewed TCR Vbeta chain usage, which was mainly observed in the CD8⁺ subset (11). When analyzed immediately after sorting and without in vitro restimulation, the T cells with skewed Vβ profiles from DF-Tol patients were characterized by a decrease of cytokine transcripts (IL2, IL13, IFNγ) compared to CR, suggesting a state of hyporesponsiveness or anergy (11).

Based on the data of this latter study, we performed here a systematic analysis of CD8 phenotypes in DF-Tol versus CR patients and compared this to healthy individuals (HI) and

kidney graft recipients with stable graft function under standard maintenance immunosuppressive therapy (StA). Our data show that a population of CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes was dramatically increased in CR. This population was further characterized with regard to cytotoxic markers, apoptosis, and proliferation.

Materials and methods

Patients

A total number of 38 individuals were included in the study. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. All patients signed a written informed consent before inclusion.

The study included 6 DF-Tol patients. Operational tolerance was clinically defined as stable graft function and absence of clinical or biological signs of chronic rejection (blood creatinemia < 150 mmol/L, proteinuria < 1.5g/24h) for at least 2 years (median 8 years, range 2-12 years) after complete interruption of all immunosuppressive therapy. Immunosuppressive treatment was stopped due to lymphoma in 2 patients and non-compliance in the 4 others (11). These normally functioning kidneys were not biopsied for ethical reasons. The CR group included 14 kidney graft recipients with a degradation of the renal function (blood creatinemia > 150 mmol/L) and histologically proven chronic rejection lesions. As control groups, we included 6 healthy individuals (HI) and 12 kidney graft recipients with stable renal function under classical immunosuppressive maintenance treatment (Sta). Further demographic and clinical data are shown in Table 1.

Phenotypic characterisation by flow cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and incubated for 30min with the following fluochrome-labelled mAb for phenotypic characterisation: anti-CD45RA-FITC, anti-CD57-FITC, anti-KIR-NKAT2-FITC, anti-CD94-FITC, anti-CD28-PE or anti-CD28-APC, anti-CD27-PE, anti-CD69-PE, anti-CCR7-PE-Cy7, anti-CD3-Cy-Chrome or CD3-PC7, anti-CD8-PE-Cy5.5 or anti-CD8-APC, anti-CD95-APC, and anti-NKG2D-APC (all mAb from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). The labelled PBMC were washed, fixed in PBS/formaldehyde 1%, and analysed by 4-colour flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Diego, USA) using Cellquest software (Becton Dickinson). T lymphocytes were identified using a forward and side scatter gate for lymphocytes in combination with a gate on CD3⁺ cells. Non-specific

staining and autofluorescence were determined by isotype matched control mAb. Results are expressed as mean percentage positive cells or as mean fluorescence intensity.

Intracellular flow cytometry

For the assessment of intracellular proteins, PBMC were stained for the phenotypic cell surface markers with fluorochrome labelled antibodies as indicated before. Subsequently, the cells were permeabilized with saponine 1% for 15 minutes and intracellular perforin and granzymeA were stained with PE-labelled monoclonal antibodies (BD Biosciences Pharmingen). After washing, the cells were analysed by 4-colour cytometry as indicated.

Detection of apoptosis

For in vitro induction of apoptosis, PBMC were cultured for 18 hours at 37°C in serum-free RPMI 1640 medium (Sigma, St Louis, MO, USA). As negative controls, PBMC were cultured in RPMI with 10% heat-inactivated fetal calf serum. After 18 hours, PBMC were washed, incubated with fluorochrome-labelled antibodies for phenotypic markers as described, and labelled with annexin V-APC (BD Biosciences Pharmingen). The percentage of annexin V-positive cells was subsequently measured by 4-colour flow cytometry after exclusion of dead cells by propidium iodide labelling.

CFSE proliferation assay

PBMC were stained with 1µM of CFSE for 3 minutes, intensively washed twice with PBS and adjusted to $5 \cdot 10^5$ cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% of heat inactivated FCS. CFSE-labelled PBMC were stimulated with 1µg/ml of coated anti-CD3 antibody (Orthoclone OKT3®, Janssen-Cilag, Germany) with or without 100UI/ml of IL2 (Proleukin®, Chiron Corporation, Emeryville, CA). After 72h at 37°C in 5% CO₂, cells were washed and stained for 15 min with anti-CD8-PE-Cy5.5 and anti-CD28-APC antibodies. Proliferation was analysed by measuring the CFSE signal on gated CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ cells by four color flow cytometry.

Statistics

The Mann-Whitney U test (for unpaired samples) and the Wilcoxon test (for paired samples) were used to assess differences between groups. Correlations were calculated with the Spearman's rho rank correlation test. A p-value <0,05 was considered as statistically

significant. Classification of StA according to their CD8⁺ phenotype was performed by Predictive Analysis of Microarray data (PAM) software (12).

Results

Increase of effector CD8⁺ lymphocytes in patients with CR

Peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes from DF-Tol (n=6) and age-matched CR (n=14) were analysed for the surface expression of CD45RA and CCR7 in order to distinguish naive (CD45RA⁺ CCR7⁺), effector (CD45RA⁺ CCR7⁻), central memory (CD45RA⁻ CCR7⁺), and effector memory (CD45RA⁻ CCR7⁻) CD8⁺ lymphocytes (13,14). As shown in Table 2, there was a significant increase in CD45RA⁻ CCR7⁺ central memory (19.6% versus 11.7%; p=0.032) and a significant decrease in CD45RA⁺ CCR7⁻ effector (21.4% versus 32.7%; p=0.048) CD8⁺ lymphocytes in DF-Tol versus CR. Of interest, the percentage of CD45RA⁺ CCR7⁻ effector CD8⁺ lymphocytes in age-matched HC (24.8%) was similar to DF-Tol but significantly lower than in CR (p=0.048), indicating that these differences correspond to an increase of CD8⁺ effectors in CR rather than a decrease in DF-Tol. As to the percentage of CD45RA⁻ CCR7⁺ central memory cells, HI were not significantly different from either DF-Tol or CR. There were no differences for the CD8⁺ naive and effector memory subsets.

Decrease of CD28 and CD27 expression on effector and effector memory CD8⁺ lymphocytes in patients with CR

Since effector as well as effector memory CD8⁺ cells can be further subdivided according to the loss of surface expression of CD28 and CD27 during terminal differentiation (13), we next assessed the surface expression of these two markers on CD8⁺ cells from DF-Tol and CR. As shown in Table 2, the percentage of CD28⁺ (30.8% versus 10.9%; p=0.040) and CD27⁺ (44.0% versus 17.6%; p=0.018) CD8⁺ effector lymphocytes was significantly higher in DF-Tol than in CR. A similar difference in CD28 (78.3% versus 23.6%; p=0.002) and CD27 (77.1% versus 31.8%; p=0.002) expression was observed in the effector memory subset. This was also reflected by a significantly higher expression of both CD28 (p=0.001) and CD27 (p=0.006) on the global CD8⁺ population, with a high correlation between both markers (r=0.91, p<0.001)(Fig1). Analysis of age-matched HI revealed that the expression of CD28 and CD27 on the different CD8⁺ lymphocyte subsets was similar in DF-Tol and HC but significantly decreased in CR (Table 2). Taken together, these data indicate an increase of

CD8⁺ CD28⁻ effector lymphocytes in CR whereas DF-Tol exhibited a pattern close to that of HI.

Increase of effector CD8⁺CD28⁻ lymphocytes in CR is stable over time and independent of treatment

In order to investigate if the increase of CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes was a stable phenomenon directly related to CR, we first assessed the phenotypic profiles in 5 CR patients in which PBMC were obtained at two different timepoints with an interval of 7.4 (2-16) months. As shown in Figure 2, there was no significant variation of the percentage of CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ effector cells ($35.5 \pm 8.5\%$ versus $29.4 \pm 7.3\%$) or of the expression of CD28 ($19.2 \pm 10.7\%$ versus $17.5 \pm 10.7\%$) and CD27 ($32.3 \pm 13.8\%$ versus $34.4 \pm 19.7\%$), indicating that the observed CD8 profile was stable over time in these patients.

We next analysed the potential effect of treatment on these profiles since, in contrast with DF-Tol and HC, a fraction of CR were treated with corticosteroids, calcineurin inhibitors (CNI), or mycophenolate mofetil (Table 1). Comparison of CR patients treated or not with corticosteroids, CNI, or mycophenolate mofetil, did not show a significant difference for the percentage of CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ effector cells ($37.4 \pm 12.6\%$ versus $29.2 \pm 9.4\%$, $30.4 \pm 11.3\%$ versus $41.1 \pm 6.8\%$, and $37.1 \pm 10.9\%$ versus $29.4 \pm 11.0\%$, respectively), CD28 expression ($15.1 \pm 9.7\%$ versus $24.0 \pm 14.3\%$, $21.5 \pm 14.0\%$ versus $15.4 \pm 13.1\%$, and $18.4 \pm 10.9\%$ versus $21.5 \pm 15.9\%$, respectively), or CD27 expression ($26.8 \pm 13.1\%$ versus $36.2 \pm 18.4\%$, $32.6 \pm 16.8\%$ versus $26.7 \pm 14.4\%$, and $27.5 \pm 12.9\%$ versus $33.1 \pm 17.7\%$, respectively). Accordingly, after exclusion of corticosteroid-, CNI-, or mycophenolate mofetil-treated CR patients, there was still a significant decrease of CD28 expression ($p=0.001$, $p<0.001$, and $p=0.001$, respectively) and of CD27 expression ($p=0.032$, $p<0.001$, and $p=0.012$, respectively) in CR versus DF-Tol patients with a similar, but statistically non-significant, trend towards increase of CD45RA⁺ CCR7⁻ CD8⁺ effector lymphocytes.

CD8⁺CD28⁻ lymphocytes exhibit markers of differentiated cytotoxic cells

Considering the pronounced increase of CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes in CR, we next analyzed the presence of several markers which have been associated with cytotoxic CD8⁺ cells. There was a highly significant increase of the number of CD8⁺ lymphocytes positive for intracellular perforin ($85.6 \pm 16.8\%$ versus $30.1 \pm 5.3\%$, $p<0.001$) and for granzyme A ($32.7 \pm 15.7\%$ versus $6.8 \pm 8.4\%$, $p=0.010$) in CR versus DF-Tol (Fig1 and data not shown).

However, there was no difference for perforin or granzyme A between HI ($30.1 \pm 10.1\%$ and $5.3 \pm 7.2\%$, respectively) and DF-Tol. Finally, there was a strong correlation between perforin and granzyme A ($r=0.723$ $p=0.009$) and both markers correlated inversely with CD28 expression ($r=-0.947$ $p<0.001$ and $r=-0.745$ $p=0.007$, respectively). Paired comparison of the CD28- versus the CD28+ CD8+ subset in CR showed that not only the intracellular expression of cytotoxic mediators such as granzyme A ($25.4 \pm 15.5\%$ versus $14.0 \pm 15.1\%$, $p=0.031$) but also the surface expression of CD57 was significantly higher for the CD28- subset ($67.0 \pm 20.4\%$ versus $22.2 \pm 10.6\%$, $p=0.031$). Whereas a similar difference in CD57 expression was found between CD28- and CD28+ CD8+ lymphocytes in DF-Tol ($70.9 \pm 12.7\%$ versus $26.2 \pm 16.5\%$, $p=0.046$), there was no difference for the expression of these cytotoxicity associated markers on the CD28- CD8+ lymphocyte subset between CR and DF-Tol, indicating that the number of these cells rather than their cytotoxicity-associated profile differentiated both situations (Fig 3). Finally, the analysis of the expression NK-cell receptors (KIR-NKAT2, CD94, and NKG2D) on CD8+ lymphocytes showed no difference between DF-Tol and CR nor between the CD28- and CD28+ CD8+ subsets in both situations (Fig 3).

Alterations of apoptosis but not proliferation of CD8+ CD28- lymphocytes

We further investigated the sensitivity to apoptosis and proliferative capacities of CD8+ CD28- lymphocytes in our patients. There was no significant difference in Fas expression on the CD8+ CD28- lymphocytes in DF-Tol versus CR (data not shown). However, albeit nearly all CD8+ CD28- cells expressed Fas (percentage of positive cells), the expression levels (mean fluorescence intensity) were significantly lower than on their paired CD8+ CD28+ counterparts (63.3 ± 9.0 versus 103.3 ± 34.2 , $p=0.002$). Accordingly, the CD8+ CD28- subset was less sensitive to apoptosis induced by serum-deprivation than the paired CD8+ CD28+ cells ($15.5 \pm 5.2\%$ versus $31.1 \pm 10.0\%$, $p=0.002$).

As to the proliferative capacity, there was no significant difference between the CD8+ CD28- and CD8+ CD28+ T subsets with regard to the percentage of cells that proliferated upon anti-CD3 stimulation ($46.1 \pm 17.8\%$ and $52.1 \pm 23.5\%$, respectively)(Fig 4). Addition of IL-2 did not further increase the proliferation of either subset. Also, the degree of proliferation assessed by the number of divisions per cell was not different between both subsets (Fig4). Finally, no significant difference was observed in proliferative capacity between DF-Tol and CR recipients for these two populations (data not shown).

Sta recipients display a mixed CD8+ lymphocyte profile

To further assess if the described CD8+ lymphocyte profile associated to the chronic rejection process could also be observed in immunosuppressed kidney graft recipients without clinical or biological signs of rejection, we analyzed CD45RA+ CCR7+ CD8+ cells, cell surface CD28 and CD27 expression, and intracellular granzyme A in 12 Sta patients. As shown in Figure 5 (panel A-D), the CD8+ lymphocytes of 5 patients showed a similar CD28, CD27, and granzyme A expression as DF-Tol, whereas 2 had an intermediate profile and 5 had similar expression levels as CR. As to the percentage of effector CD45RA+ CCR7- CD8+ cells, 7 Sta recipients had similar numbers as CR patients, whereas 5 had low numbers such as in DF-Tol recipients. In order to analyse the StA profiles in more detail, we set up a model using PAM software based on the CD8+ lymphocyte phenotypes in DF-Tol versus CR. Cross-validation of this model using the DF-Tol and CR profiles classified correctly 13 out of the 14 CR samples and 5 out of the 6 DF-Tol samples (Fig5, panel E). Applying this model to the StA patient cohort, the CD8+ lymphocyte phenotype of 7 patients resembled CR whereas the others had an intermediate profile (Fig5, panel F).

Discussion

Considering the major burden of immunosuppression in organ transplantation and the discrepancies between tolerance in rodents and humans, spontaneous drug-free tolerance in humans is a rare but unique model to study clinically relevant immune phenomena related to graft integrity and survival. In this context, the present study analyzed alterations of the CD8+ lymphocytes in kidney graft recipients tolerating their graft for several years without any immunosuppressive or corticosteroid treatment. The main finding is the reduced numbers of circulating CD8+ CD28- effector lymphocytes compared with patients with chronic graft rejection. However, the DF-Tol patients had a similar number of CD8+ CD28- effector lymphocytes as healthy controls, indicating an abnormal increase of this cell population in CR rather than a primary alteration in DF-Tol. Since the expression of CD28 on CD8+ cells decreases with age (15) it is important to notice that the study groups were roughly age-matched. A bias due to immunosuppressive therapy is also unlikely since we found no effect of the different treatment regimens on the CD8+ lymphocyte profiles in CR. Finally, the increase in CD8+ CD28- effector cells was stable over time in CR.

Whereas the expression of CD45RA without CCR7 identifies this population of CD8 cells unambiguously as effector cells (13,14), the exact mechanism and functional correlate of the loss of CD28 and CD27 expression remain a matter of debate. During aging, effector CD8⁺ lymphocytes can lose the surface expression of CD28 by replicative senescence due to extensive homeostatic proliferation (14,15). A distinct mechanism is observed after TCR-mediated activation, which is mostly associated with an increased susceptibility to undergo apoptosis (16). In this respect, CD8⁺ CD28⁻ cell populations can appear as a consequence of extensive rounds of antigen-induced division such as in chronic infections or malignancies (17-19). The latter cells appear to be differentiated effector cells rather than senescent cells since the loss of CD28 and CD27, which are largely coexpressed on CD8⁺ cells (13), is not associated with functional anergy but in contrast with an increase of cytotoxic markers and cytolytic activity (20-22). Accordingly, in the present study we evidenced high levels of perforin, granzyme A, and CD57. Of interest, however, we found no differences for these markers in CD8⁺ CD28⁻ effector lymphocytes between DF-Tol and CR, indicating a quantitative rather than qualitative difference between both situations.

In order to provide further evidence for effector differentiation rather than senescence, we also investigated the sensitivity to apoptosis and the proliferative capacity of the CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes. Consistent with previous *in vitro* studies, the loss of CD28 was associated with a decreased susceptibility to apoptosis, which relates both to the Fas-mediated pathway and the sensitivity to growth factor withdrawal (23-25). However, in contrast with replicative senescence which is characterized by an irreversible non-dividing state (23,26,27), the CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes found in the peripheral circulation of CR patients proliferated at a similar level as their CD28⁺ counterparts upon CD3 stimulation. Since CD28 is required for IL-2 production and subsequent sustained proliferation, it is likely that both in our assay and *in vivo* IL-2 could be provided in a paracrine manner by CD28⁺ lymphocytes rather than in an autocrine fashion by the CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes themselves (28). The impaired sensitivity to apoptosis and the maintained proliferative potential of the CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes may influence the balance between clonal expansion and contraction and thereby contribute to the increase of this cell population in CR.

An important question raised by the high numbers of CD8⁺ CD28⁻ effector lymphocytes characterized by cytotoxicity-associated markers in CR compared with DF-Tol is the target of these cells and the potential functional consequences for the graft. Based on reports in animal models (29-32), it would be tempting to speculate that these cells are induced by processing of donor alloantigens. Although beyond the scope of this study, further research using donor

cells or surrogate targets (peptides or donor HLA-matched cells) is required to assess if the described CD8⁺ CD28⁻ lymphocyte subset is indeed committed to donor determinants. An alternative hypothesis would be that pre-existing cytotoxic CD8⁺ lymphocytes directed against viruses and pathogens cross-react with the graft, as suggested by the fact that heterologous immune memory is a barrier to transplantation tolerance (5,6,33,34). Independently of the precise primary target of the CD8⁺ CD28⁻ effector cells in CR, the normal expression level of the activating cytotoxic receptor, NKG2D, which is not counterbalanced by an increase of MHC class I-binding inhibitory receptors such as CD94/NKG2A and KIR-NKAT2, is compatible with functional cytotoxicity of these cells (35-38). In this context, it is interesting to note that cell-mediated allo-immunity has been demonstrated to contribute to chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients (39). Moreover, Li et al indicated recently that operational tolerance in liver transplantation was associated with a decrease of NK cells (40), a distinct cytotoxic lymphocyte population which was not investigated in the present study.

A second question raised by our observations is how these CD8⁺ CD28⁻ effector cells relate to the recently described CD8⁺ CD28⁻ suppressor lymphocytes (41,42). These cells, induced *in vitro* by multiple rounds of stimulation, were FOXP3 positive and suppressed CD4 responses by tolerization of antigen presenting cells through an upregulation of the inhibitory molecules ILT3 and ILT4 (43,44). Whereas animal models support an *in vivo* function for these suppressor lymphocytes (45), their natural presence and exact phenotype in humans is less clear (46). Phenotypic comparison between heart transplant recipients and healthy controls indicated an increase of CD8⁺ CD28⁻ lymphocytes expressing CD45RO, CD62L, and CD27, which corresponds to a central memory phenotype rather than an effector profile, in the graft recipients but no data linked this phenotype to suppression *in vitro* or tolerance *in vivo* (47). This study also reported an increase of perforin positive CD8⁺ cells in the stable transplant recipients, a feature which was not observed in our DF-Tol patients (47).

A third important issue is raised by the fact that some of the patients with stable graft function analyzed in the present study display a similar CD8⁺ lymphocyte phenotype as CR, whereas others had an intermediate profile. This indicates that the described CD8 profile is strongly but not exclusively associated with active chronic rejection. However, whereas the occurrence in stable kidney graft recipients of a CR-associated CD8 profile is insufficient to assume that this could predict subsequent rejection, it is intriguing to note that an increase of granzymes and perforin was also reported to precede allograft rejection in rodents as well as humans (48-50). Only longer follow-up of these stable patients will allow to test the hypothesis that the

reported phenotype may be linked to a poor clinical outcome when observed in apparently stable patients. Together with our recent report of a distinct activation level of T cells with skewed TCR profiles in DF-Tol (11) and the findings in operational tolerance in liver transplantation (40), these data warrant further prospective and longitudinal studies of kidney graft recipients to assess if distinct peripheral blood lymphocyte profiles can contribute to the identification of patients at risk for chronic graft rejection or, in contrast, patients who might benefit from tapering of the immunosuppressive therapy.

Acknowledgements

Dominique Baeten is a Senior Clinical Investigator of the Fund for Scientific Research-Flanders (FWO-Vlaanderen).

References

- Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunological self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562, 2004.
- Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, Inoue Y: Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6:686-688, 2000.
- Cosimi AB, Sachs DH: Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 77:943-946, 2004.
- Miller J, Mathew JM, Esquenazi V: Toward tolerance to human organ transplants: a few additional corollaries and questions. *Transplantation* 77:940-942, 2004.
- Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, et al: Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 111:1887-1895, 2003.
- Adams AB, Pearson TC, Larsen CP: Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* 196:147-160, 2003.
- Heeger PS, Hricik D: Immune monitoring in kidney transplant recipients revisited. *J Am Soc Nephrol* 13:288-290, 2002.
- Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, et al: Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 361:1502-1510, 2003.
- Hricik DE, Heeger PS: Minimization of immunosuppression in kidney transplantation. The need for immunomonitoring. *Transplantation* 72:S32-35, 2001.
- Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg AD, Bentelejewski C, Zahorchak AF, et al: Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation* 72:S13-22, 2001.
- Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, et al: Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T cell clonal regulation. *Am J Transplant* 5:330-340, 2005.
- Tibshirani RJ, Hastie TJ, Narasimhan B, Chu G: Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6567-6572, 2002.
- Hamann D, Roos MTL, van Lier RAW: Faces and phases of human CD8⁺ T-cell development. *Immunol Today* 20:177-180, 1999.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763, 2004.

Merino J, Martinez-Gonzalez MA, Rubio M, Inoges S, Sanchez-Ibarrola, Subira ML: Progressive decrease in CD8^{high} CD28⁺ CD57⁻ cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 112:48-54, 1998.

Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ: Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol* 162:6572-6579, 1999.

Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, van Lier R: Evidence that human CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* 11:1027-1033, 1999.

Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJG, Carmichael AJ: Identification of naive or antigen-experienced human CD8⁺ T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 168:5455-5464, 2002.

Sze DMY, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, et al: Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8⁺CD57⁺CD28⁻ compartment. *Blood* 98:2817-2827, 2001.

Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, et al: Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinctive replicative history and partial effector functions. *Blood* 102:1779-1787, 2003.

Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A: Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 199:925-936, 2004.

Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JG: Human CD28-CD8⁺ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol* 162:7569-7577, 1999.

Spaulding C, Guo W, Effros RB: Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 34:633-644, 1999.

Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ: Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4⁺CD28⁻ T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 161:1018-1025, 1998.

Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ: Clonality and longevity of CD4⁺CD8^{null} T cells are associated with defects in the apoptotic pathways. *J Immunol* 165:6301-6307, 2000.

Brenchley JM, Karandir NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al: Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 101:2711-2720, 2003.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F: Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101:4260-4266, 2003.

Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD: Restoration of CD28 expression in CD28⁻ CD8⁺ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med* 198:947-955, 2003.

Fischbein MP, Yun J, Laks H, Irie Y, Fishbein MC, Bonavida B, Ardehali A: Role of CD8⁺ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123:803-809, 2002.

Yang J, Jaramillo A, Liu W, Olack B, Yoshimura Y, Joyce S, et al: Chronic rejection of murine cardiac allografts discordant at the H13 minor histocompatibility antigen correlates

with the generation of the H13-specific CD8⁺ cytotoxic T cells. *Transplantation* 76:84-91, 2003.

Choy JC, Kerjner A, Wong BW, McManus BM, Granville DJ: Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 165:127-133, 2004.

Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, et al: Mouse vascular endothelium activates CD8⁺ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* 169:6154-6161, 2002.

Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al: Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163:2267-2275, 1999.

Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A: T cells primed by *Leishmania major* infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* 169:3686-3693, 2002.

Raulet DH: Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Rev Immunol* 3:781-790, 2003.

Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, Beavis A, et al: TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17:487-499, 2002.

Leibson PJ: The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 16:328-336, 2004.

Vivier E, Anfossi N: Inhibitory NK-cell receptors on T cells : witness of the past, actors of the future. *Nature Rev Immunol* 4:190-198, 2004.

Poggio ED, Clemente M, Riley J, Roddy M, Greenspan NS, DeJelo C, et al: Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:1952-1960, 2004.

Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, et al: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor transplantation. *Am J Transplant* 4:2118-2125, 2004.

Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suci-Foca N: Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC-class I restricted CD8⁺ CD28⁻ T cells. *Int Immunol* 10:775-783, 1998.

Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, Berlocco P, et al: Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells. *J Immunol* 161:5193-5202, 1998.

Manavalan JS, Kim-Schultze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al: Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻FOXP3 T suppressor cells induce ILT3+ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16:1055-1068, 2004.

Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al : Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3:237-243, 2002.

Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, et al: Regulatory functions of CD8⁺CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112:1037-1048, 2003.

Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, et al: Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and antigen specific CD4⁺CD25⁺ and CD8⁺CD28⁻ T suppressor cells. *Hum Immunol* 65:1297-1306, 2004.

Colovai AI, Mirza M, Vlad G, Wang S, Ho E, Cortesini R, Suci-Foca N: Regulatory CD8⁺CD28⁻ T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64:31-37, 2003.

Chen RH, Ivens KW, Alpert S, Billingham ME, Fathman CG, Flavin TF, et al: The use of granzyme A as a marker of heart transplant rejection in cyclosporine or anti-CD4 monoclonal antibody-treated rats. *Transplantation* 55:146-153,1993.

Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, et al: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 344:1006-1007, 2001.

Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C: Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 3:1121-1127, 2003.

Table 1: Summary of the demographic (gender and age) and clinical (time interval between kidney transplantation and analysis; current treatment) data of the patient cohorts including: kidney graft recipients who were operationally tolerant after interruption of immunosuppressive therapy (drug-free tolerant or DF-Tol), patients with chronic graft rejection despite immunosuppressive treatment (CR), healthy individuals (HI), and kidney recipients with stable renal function while treated with standard immunosuppressive maintenance regimen (Sta). Calcineurin inhibitors comprise cyclosporin A and tacrolimus. Age and time between transplantation and analysis are given in years (median and range). NA = not applicable.

	DF-Tol (n=6)	CR (n=14)	HI (n=6)	Sta (n=12)
Gender (male/female)	5/1	7/7	4/2	8/4
Age (years)	57 (37-73)	53 (35-72)	53 (33-62)	53 (30-76)
Years after transplantation	14 (5-30)	7 (2-6)	NA	12 (4-24)
Corticosteroids	0/6	6/14	0/6	6/12
Azathioprine	0/6	1/14	0/6	6/12
Calcineurin inhibitor	0/6	11/14	0/6	5/12
Mycophenolate mofetil	0/6	6/14	0/6	5/12

Table 2: Phenotypic analysis of CD8+ T lymphocytes in drug-free tolerant patients (DF-Tol), patients with chronic rejection of their kidney graft (CR), and age-matched healthy individuals (HI). The percentage of naive (CD45RA+ CCR7+), central memory (CD45RA- CCR7+), effector memory (CD45RA- CCR7-), and effector (CD45RA+ CCR7-) cells was analysed, as well as the expression of CD28 and CD27 on the effector and effector memory subsets. Results are expressed as mean \pm standard deviation percentage positive cells. * p<0.05 between DF-Tol and CR. # p<0.05 between CR and HI. There were no significant differences between DF-Tol and HI.

		DF-Tol (n=6)	CR (n=14)	HI (n=6)
CD8+	CD45RA+ CCR7+	33.9 \pm 19.5%	24.4 \pm 11.7%	26.0 \pm 14.1%
	CD45RA- CCR7+	19.6 \pm 7.6.%*	11.7 \pm 5.7%*	13.6 \pm 6.4%
	CD45RA- CCR7-	25.1 \pm 13.9%	31.3 \pm 11.4%	35.9 \pm 13.8%
	CD45RA+ CCR7-	21.4 \pm 9.6%*	32.7 \pm 11.3%*#	24.8 \pm 3.8%#
CD8+ CD45RA- CCR7-	CD27	77.1 \pm 14.7%*	31.8 \pm 16.9%*#	82.5 \pm 14.1%#
	CD28	78.3 \pm 3.4%*	23.6 \pm 15.7%*#	77.1 \pm 14.4%#
CD8+ CD45RA+ CCR7-	CD27	44.0 \pm 15.0%*	17.6 \pm 14.1*#	45.7 \pm 3.8%#
	CD28	30.8 \pm 3.7%*	10.9 \pm 12.6%*#	29.3 \pm 4.5%#

Figure 1: Analysis of the expression of CD28 on the cell surface and of intracellular perforin in peripheral blood CD8+ lymphocytes in drug-free tolerant kidney graft recipients (DF-Tol) and in patients with chronic rejection of the graft (CR). Representative histograms show the increased expression of CD28 and the decrease of intracellular perforin in DF-Tol versus CR.

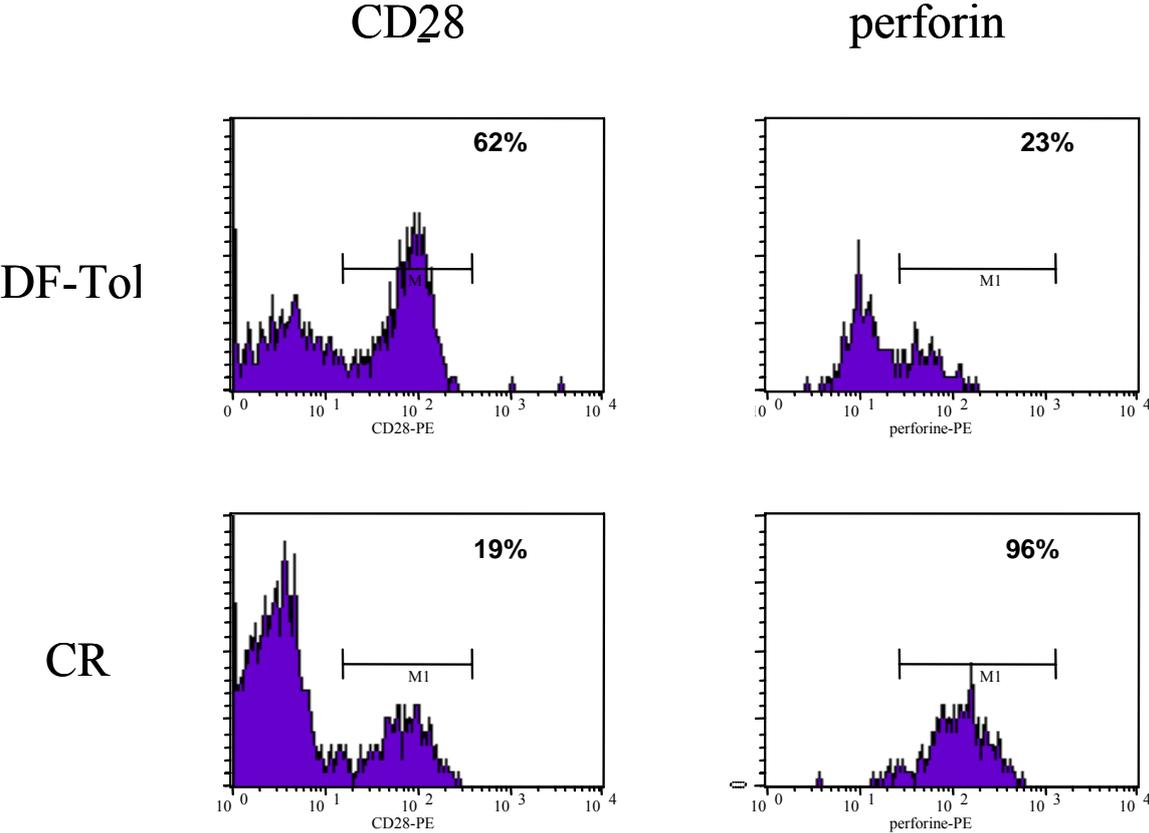


Figure 2 : Stability of the effector CD8+ CD28- CD27- lymphocyte population in patients with chronic rejection of their kidney graft. Peripheral blood CD8+ lymphocytes were analysed by flow cytometry for the percentage of CD45RA+ CCR7- effector (EFF) cells, CD28+ cells, and CD27+ cells. Comparison were performed between two different time points in 5 patients. In addition, patients with (n=6) and without (n=8) corticosteroid treatment, between patients with (n=11) and without (n=3) calcineurin inhibitor treatment, and between patients with (n=6) and without (n=8) mycophenolate mofetil treatment were compared. None of the comparisons was statistically significant.

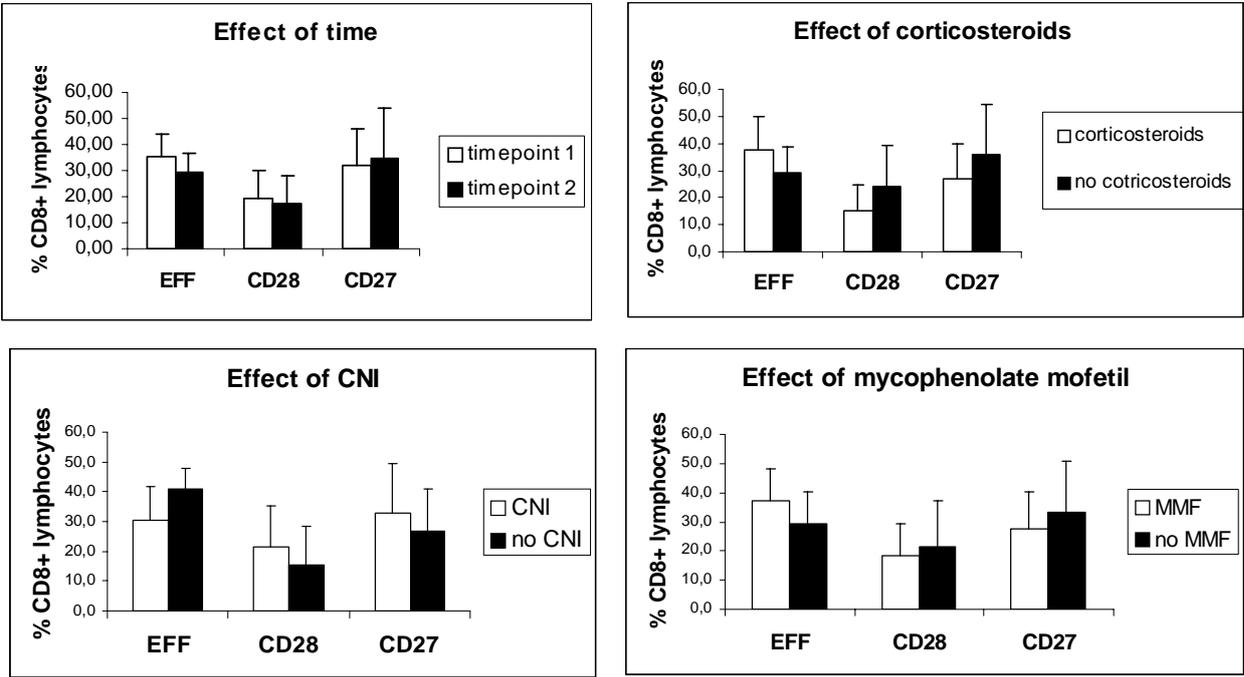


Figure 3: Flow cytometric assessment of the expression of markers associated with cytotoxicity and NK-cell receptors on the cell surface of peripheral blood CD8+ lymphocytes in kidney graft recipients with chronic rejection and in drug-free tolerant patients. The CD8+ CD28- subset was compared with the CD8+ CD28+ subset. * p<0.05.

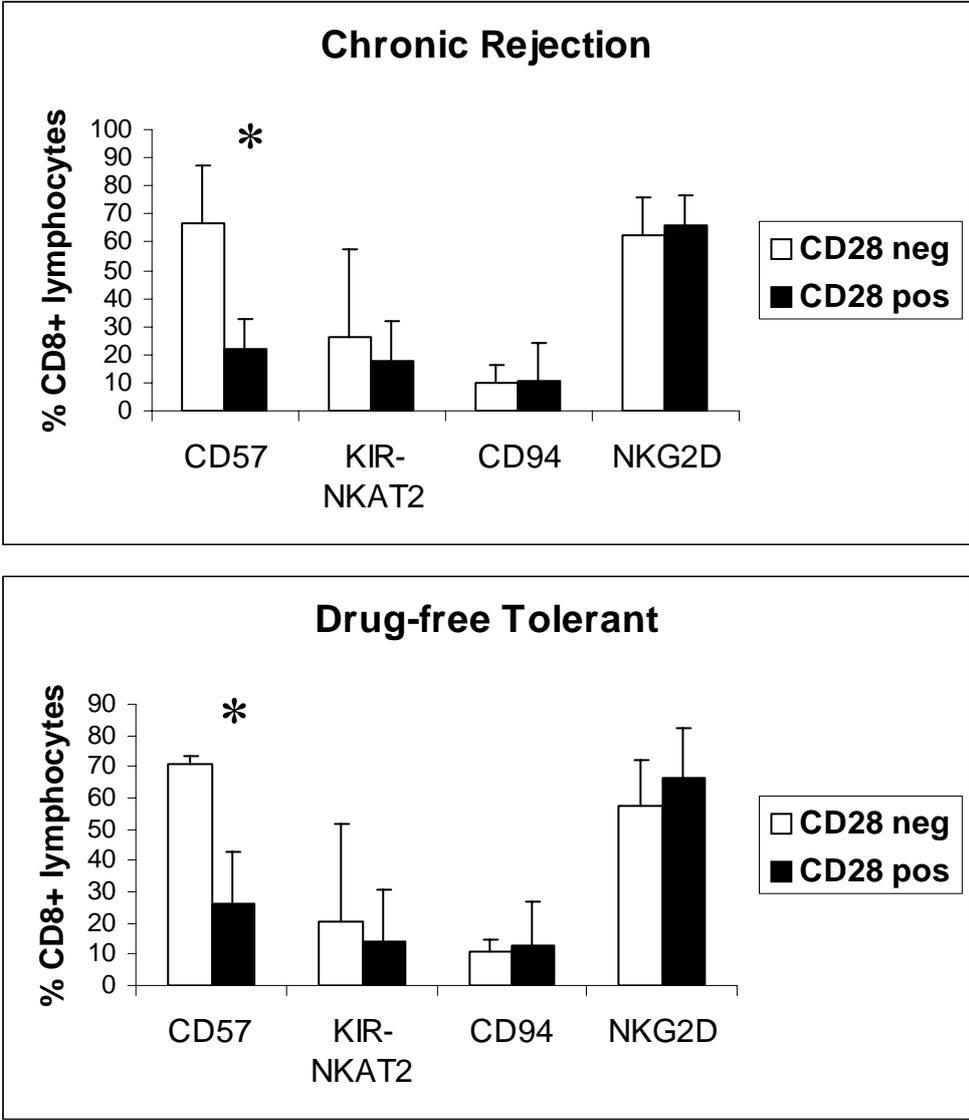


Figure 4: Analysis of the proliferative capacity of CD8+ CD28- and CD8+ CD28+ peripheral blood lymphocytes upon stimulation with anti-CD3. The number of cell divisions was assessed by CFSE-based flow cytometry. There were no significant differences for the total number of cells that proliferated nor for the number of divisions per cell.

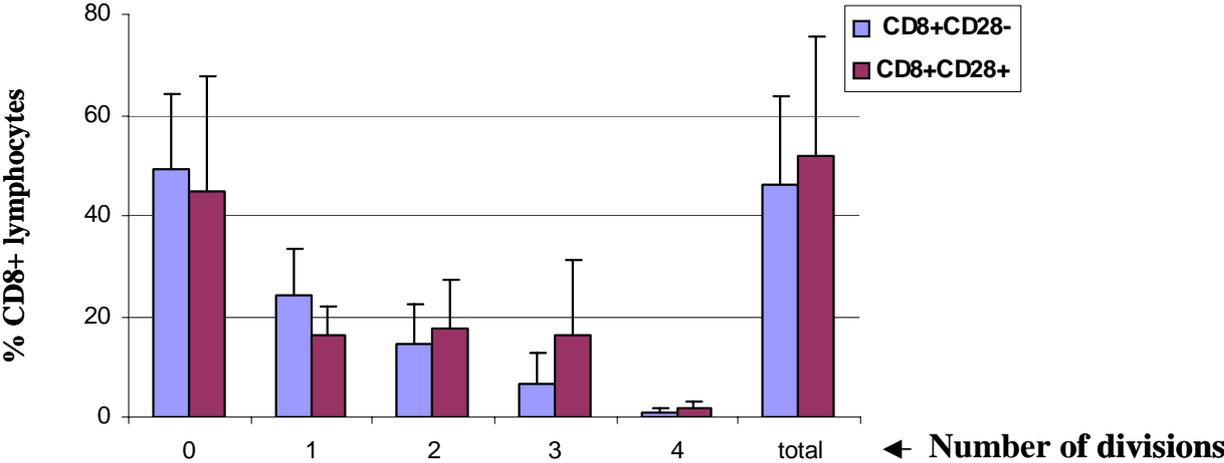
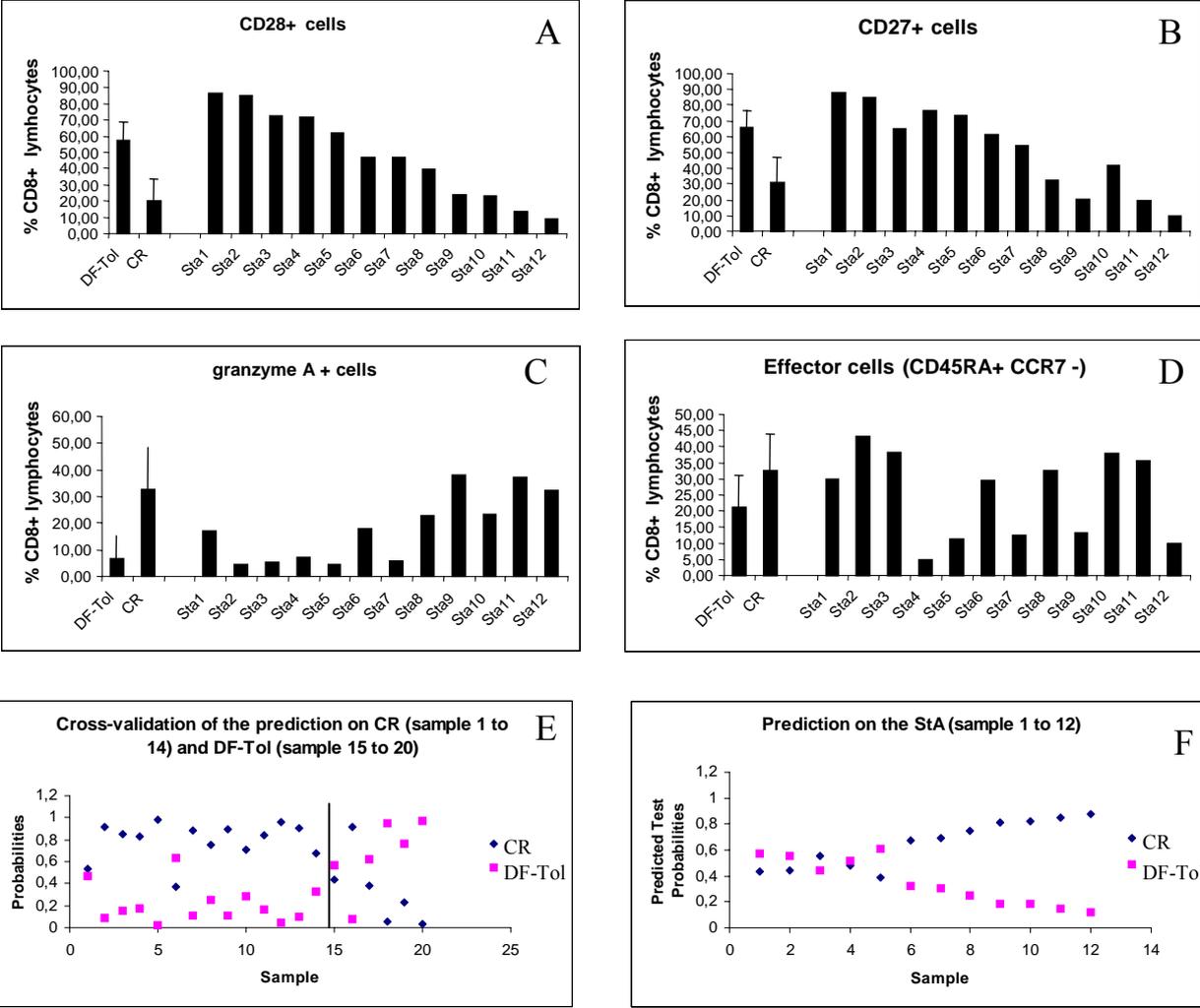


Figure 5: CD8+ lymphocyte profiles as assessed by flow cytometry on peripheral blood lymphocytes of 12 kidney graft recipients with stable renal function under immunosuppressive therapy (Sta). The percentage of CD8+ lymphocytes expressing CD28 (panel A), CD27 (panel B), and intracellular granzyme A (panel C), and the number of effector CD45RA+ CCR7- CD8+ lymphocytes (panel D) are shown. For comparison, the mean \pm standard deviation is depicted for drug-free tolerant patients (DF-Tol, n=6) and patients with chronic rejection (CR, n=14). Using the CD8+ lymphocyte phenotypes from CR and DF-Tol, a model was set up for classification of individual samples. Cross-validation indicated that 13 out of 14 CR and 5 out of 6 DF-Tol were classified correctly (panel E). When applied to samples of StA patients, the model classified the CD8+ lymphocyte profiles of 7 out of 12 as CR whereas 5 showed an intermediate profile (panel F).



IV. Discussion et perspectives

La « tolérance opérationnelle » est définie comme l'acceptation d'un greffon sans immunosuppression et sans signe clinique de rejet chronique. Grâce aux modèles expérimentaux, plusieurs mécanismes pouvant jouer un rôle dans l'induction d'une tolérance ont été mis en évidence : la délétion (Tomita et al., 1994; Webb et al., 1990), la régulation (Wood and Sakaguchi, 2003) et l'anergie (Schwartz, 1990). Divers protocoles d'induction de tolérance chez le primate et en clinique ont ainsi été mis en place (cf chapitre II). Mais, l'état de « tolérance opérationnelle » et ces mécanismes ont été très peu étudié chez l'homme, notamment en transplantation rénale (Burlingham et al., 1995; Christensen et al., 1998; Fischer et al., 1996; Strober et al., 2000). La plupart des études sont effectuées à partir du sang des patients « opérationnellement tolérants », la biopsie étant une technique invasive et représentant un risque pour un greffon dont la fonction est normale. Cependant, si de telles études peuvent permettre l'identification de marqueurs de la tolérance, il convient d'être prudent si l'on veut comprendre les mécanismes de la tolérance par une analyse du sang. Les observations faites à partir du sang peuvent soit refléter exactement les événements qui se déroulent dans le greffon, soit traduire l'inverse, c'est-à-dire qu'une baisse du nombre de cellules dans le sang correspondrait à une accumulation de celles-ci dans le greffon et vice-versa.

L'identification, dans le sang, de critères de la « tolérance opérationnelle » a donc été réalisée en comparant quelques rares patients greffés rénaux spontanément tolérants à une situation hautement contrastée : le rejet vasculaire chronique. Dans un premier temps, les analyses transcriptionnelles du répertoire des lymphocytes T n'ont montré aucune délétion particulière chez ces patients « opérationnellement tolérants ». Par contre, elles nous ont révélé que ces patients, comme les patients en rejet chronique, présentaient des altérations de la distribution des longueurs de CDR3 dans le compartiment CD8. Une forte accumulation de certains transcrits V β chez les patients « opérationnellement tolérants » a aussi été observée. Des altérations similaires peuvent apparaître avec l'âge (Colombatti et al., 1998; Schwab et al., 1997), probable conséquence de la réduction thymique qui n'assure plus le renouvellement complet du pool de lymphocytes naïfs (Aspinall and

Andrew, 2000). Mais l'âge des patients « opérationnellement tolérants » n'est pas corrélé à l'apparition de ces familles V β présentant des altérations de la distribution des longueurs de CDR3, puisque certains patients tolérants moins âgés présentent aussi de telles perturbations. La spécificité de ces cellules peut être multiple. D'une part, elles pourraient être dirigées contre des virus. Toutefois, aucune corrélation chez nos patients n'a pu être mise en évidence entre la présence de ces cellules et des infections virales par EBV, CMV ou HCV. D'autre part, elles peuvent correspondre à des clones spécifiques des antigènes du donneur. Enfin, contrairement à celles des patients en rejet chronique, les familles présentant des altérations de la distribution des longueurs de CDR3 chez les patients « opérationnellement tolérants » ne possèdent que peu ou pas de transcrits de cytokines Th1 et Th2 (IL13, IL10, IL2, IFN γ), suggérant une anergie.

Les altérations de la distribution des longueurs de CDR3 étant présentes majoritairement dans le compartiment CD8, une étude plus approfondie des cellules T CD8⁺ a été menée. Nous avons ainsi montré une augmentation des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients « opérationnellement tolérants » et aux individus sains. Ces cellules T CD8⁺CD28⁻ peuvent correspondre à des cellules sénescents (Spaulding et al., 1999). En effet, avec l'âge, les lymphocytes T CD8⁺ perdent, à cause d'une intense prolifération homéostatique, l'expression du CD28 par « sénescence répllicative ». Elles sont anergiques et peu susceptibles à l'apoptose (Spaulding et al., 1999). La perte du CD28 peut aussi survenir après une activation par le TCR, ce qui augmente la susceptibilité à l'apoptose. De telles cellules, appelées effectrices, sont capables de proliférer et possèdent des fonctions cytotoxiques (Sze et al., 2001; Weekes et al., 1999). Chez les patients en rejet chronique, les cellules T CD8⁺CD28⁻ sont CD27⁻CD57⁺ et expriment plus de molécules associées à une cytotoxicité (perforine et granzyme A) que celles des patients « opérationnellement tolérants ». De même, elles sont sensibles à l'apoptose et prolifèrent en réponse à une stimulation polyclonale. L'ensemble de ces résultats suggère donc des cellules effectrices cytotoxiques plutôt que des cellules sénescents. A un moindre degré, des marqueurs associés à des cellules cytotoxiques (CD57, CD94, NKG2D) ont été aussi observés sur les

lymphocytes T CD4⁺ des patients en rejet chronique. Mais la cible des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ reste encore à déterminer. Une des hypothèses est qu'elles soient spécifiques des antigènes du donneur. Puisque nous ne disposons pas des cellules du donneur, des cellules d'une tierce personne dont les molécules HLA de classe I sont identiques à celles du donneur seront utilisées pour les remplacer. Ainsi, la cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ des patients en rejet chronique sera analysée en les incubant avec les cellules « remplaçantes » du donneur et en regardant leur capacité à dégranuler grâce à l'expression en surface des molécules CD107a et CD107b (Betts et al., 2003). Toutefois, des cellules T CD8⁺CD28⁻ ont aussi été décrits dans la littérature comme des cellules suppressives qui agissent par tolérogénéisation des CPA (Liu et al., 1998) (cf chapitre IV). L'hypothèse de cellules T CD8⁺CD28⁻ suppressives chez les patients « opérationnellement tolérants » ne peut être écartée, puisque nous avons montré, chez ces patients, la présence de transcrits FOXP3 dans les cellules T CD8⁺. Des tests fonctionnels pourront être réalisés en cultivant des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ et des lymphocytes T CD4⁺ du patient avec des cellules « remplaçantes » du donneur (CPA) et en analysant l'expression des molécules CD80 et CD86 sur les CPA (Liu et al., 1998).

De plus, nous avons trouvé que le nombre des cellules T CD4⁺CD25^{hi} est réduit chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients « opérationnellement tolérants » et aux individus sains. Les analyses phénotypiques (CTLA4, GITR, CD103, CCR4) et transcriptionnelles (FOXP3) suggèrent que ces lymphocytes T CD4⁺CD25^{hi}, quelque soit le groupe de patients, pourraient être des cellules régulatrices comme celles décrites dans la littérature (Baecher-Allan et al., 2001; Levings et al., 2001b). Afin de tester leur propriété suppressive, les lymphocytes T CD4⁺CD25^{hi} des patients « opérationnellement tolérants », en rejet chronique et des individus sains peuvent être ajoutés à des cellules T CD4⁺CD25⁻ autologues stimulées soit par les CPA du donneur, soit par des CPA autologues et un anticorps anti-CD3 (coculture). N'ayant pas la possibilité d'avoir les cellules du donneur, le choix se portera donc vers une stimulation par des CPA autologues et un anticorps anti-CD3. Plusieurs possibilités pourraient être envisagées. Premièrement, les cellules T CD4⁺CD25^{hi} des patients en rejet chronique ont des propriétés régulatrices,

mais sont en nombre insuffisant. Plusieurs études ont déjà associé une pathologie à un défaut du nombre (et non de la fonction) des cellules T CD4+CD25hi régulatrices (Wolf et al., 2003; Woo et al., 2001). Ainsi, comme l'ont proposé Zheng et coll (Zheng et al., 2003), de l'équilibre entre cellules alloréactives et cellules régulatrices dépendrait l'état de tolérance ou le rejet. Dans notre cas, les cellules T CD4+CD25hi seraient en quantité insuffisante, chez les patients en rejet chronique, pour contrôler les cellules alloréactives et/ou cytotoxiques (ex : T CD8+CD28-, familles V β présentant une distribution altérée des longueurs de CDR3). Au contraire, chez les patients « opérationnellement tolérants », elles inhiberaient la fonction des cellules dirigées contre le greffon (inhibition de cytokines dans les familles V β présentant une distribution altérée des longueurs de CDR3). Alternativement, les cellules T CD4+CD25hi des patients en rejet chronique peuvent avoir perdu leur capacité suppressive comme cela déjà été décrit dans d'autres maladies (Balandina et al., 2004; Ehrenstein et al., 2004). Ainsi, non seulement les cellules T CD4+CD25hi seraient en nombre insuffisant pour contrôler les cellules alloréactives, mais elles présenteraient aussi un défaut de fonctionnement des mécanismes de suppression. Enfin, même si le nombre de lymphocytes T CD4+CD25hi chez les patients « opérationnellement tolérants » est semblable à celui trouvé chez les individus sains, leur capacité suppressive pourrait être augmentée.

Le phénotypage des lymphocytes T CD4+CD25hi chez les patients greffés et les individus sains a révélé une similitude dans l'expression de nombreux récepteurs de chimiokines (CCR4, CCR5, CCR7...) ou molécules d'activation (CD69, CD40L, CD62L...). Néanmoins, nous avons récemment observé que les cellules T CD4+CD25hi des patients greffés (patients « opérationnellement tolérants » ou en rejet chronique) expriment moins de CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL7) que celles des individus sains (respectivement 15-20% et 80%) (*données non publiées*). L'IL7, produite principalement dans les tissus lymphoïdes, est un facteur de survie important pour les lymphocytes T naïfs, effectrices et mémoires (Maraskovsky et al., 1996; Seddon et al., 2003). Mais leur susceptibilité à l'IL7 varie d'un type cellulaire à l'autre. En effet, si les cellules au repos telles que les lymphocytes T naïfs et mémoires sont CD127hi, les cellules CD127lo correspondent plutôt

à un stade effecteur tardif (Kaech et al., 2003; Powell et al., 2005). D'où, la perte du marqueur CD127 suggèrerait une activation cellulaire. Ainsi, les cellules T CD4+CD25hi des patients greffés (« opérationnellement tolérants » et en rejet chronique) pourraient correspondre à des cellules régulatrices « induites » par l'antigène (de type Tr1 ou Th3) et celles des individus sains aux cellules dites « naturelles ». Les patients en rejet chronique auraient donc un faible nombre de cellules régulatrices « induites » par rapport aux patients « opérationnellement tolérants ». Afin de différencier les cellules régulatrices « induites » des cellules régulatrices « naturelles », nous testerons leur mode d'action. Les premières agissant par la sécrétion de cytokines telles que IL10 et/ou TGFβ (Groux et al., 1997; Kitani et al., 2000), nous analyserons l'effet d'anticorps neutralisants anti-IL10 et/ou anti-TGFβ ajoutés dans la coculture décrite précédemment. Au contraire, la fonction régulatrice des cellules T CD4+CD25hi « naturelles » nécessite un contact avec la cellule T CD4+CD25- (Baecher-Allan et al., 2001). La coculture sera donc réalisée en séparant par une membrane semi-perméable les lymphocytes T CD4+CD25hi (des patients « opérationnellement tolérants », en rejet chronique et des individus sains) des cellules T CD4+CD25-.

Le faible nombre de cellules régulatrices « induites » chez les patients en rejet chronique pourrait alors s'expliquer par une déficience des mécanismes d'induction de ces cellules en périphérie. Plusieurs explications non exclusives peuvent être données. Premièrement, Jonuleit et coll ont démontré que les cellules T CD4+CD25hi « naturelles » pouvaient induire des lymphocytes Tr1 et Th3 (Jonuleit et al., 2002). Il pourrait alors s'agir soit d'un défaut dans le processus de transition vers les cellules Tr1 et Th3, soit d'un défaut du nombre de cellules T CD4+CD25hi « naturelles ». Dans ce dernier cas, cela peut s'expliquer par un renouvellement limité des cellules T CD4+CD25hi d'origine thymique (Darrasse-Jeze et al., 2005), dû au déclin du thymus avec l'âge (Aspinall and Andrew, 2000). Deuxièmement, les CPA tolérogènes, induites, par exemple, par des cellules T CD8+CD28- suppressives (Manavalan et al., 2003) ou par la dexaméthasone (de Jong et al., 1999), sont capables d'induire des cellules T CD4+ régulatrices. Les patients en rejet chronique pourraient présenter une absence de CPA tolérogènes. Ces dernières seront

donc recherchée en analysant notamment l'expression des molécules ILT3 et ILT4 qui semblent caractéristiques de nombreuses CPA tolérogènes (Manavalan et al., 2003). Le ratio cellules dendritiques plasmacytoïdes/cellules dendritiques myéloïdes sera de même étudié (Mazariegos et al., 2005). A l'opposé, les patients « opérationnellement tolérants » auraient la capacité d'induire des cellules T CD4⁺CD25^{hi} par un ou plusieurs de ces mécanismes.

Déterminer un profil caractéristique de la tolérance permettrait ensuite d'identifier parmi des patients greffés actuellement sous immunosuppression ceux qui pourraient être « opérationnellement tolérants » et d'envisager une réduction de leur traitement. Certes ces résultats ne permettent pas d'aider à un tel diagnostic, mais ils ouvrent le chemin vers une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance chez l'Homme.

Résultats 2: Protocole de minimisation des corticostéroïdes en transplantation rénale: le protocole FRANCIA

I. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude était de comparer deux stratégies de minimisation des corticostéroïdes (« avoidance » et « withdrawal ») en transplantation rénale chez des patients ayant reçu une induction par SAL sans traitement initial par la ciclosporine. L'hypothèse était que l'absence de corticostéroïdes et de ciclosporine A au moment de la reconnaissance du greffon par le système immunitaire, en présence de sérum anti-lymphocytaire, pouvait être propice à l'induction d'une tolérance et contribuant à la diminution d'incidence du rejet chronique.

II. Description des patients

Dans ce but, une étude clinique randomisée appelée protocole FRANCIA (Fresenius Atg, No Corticosteroids, In Allo-transplantation) a débuté fin 2001, a inclut 200 patients. Elle regroupe cinq centres hospitaliers (Nantes, Toulouse, Besançon, Montpellier, Strasbourg) et les principaux investigateurs sont Diégo Cantarovich et Jean-Paul Soullillou.

Les critères d'inclusion étaient :

- ✓ Première transplantation rénale avec un greffon d'origine cadavérique
- ✓ Risque immunologique normal (PRA <20%)
- ✓ Age du receveur et du donneur: entre 18 et 65 ans

Les critères d'exclusion étaient :

- ✓ Durée de l'ischémie/reperfusion >36h
- ✓ Femmes enceintes
- ✓ Patients allergiques aux protéines de lapin, au tacrolimus ou au MMF
- ✓ Patients sous immunosuppression avant la greffe
- ✓ Patients en attente d'une autre transplantation que celle d'un rein

- ✓ Patients avec un cancer
- ✓ Nombre de leucocytes $<2000/\text{mm}^3$ et/ou nombre de plaquettes $<50000/\text{mm}^3$

III. Résultats

A. Monitoring phénotypique et transcriptionnel des leucocytes circulants chez des patients greffés rénaux recevant une induction par sérum anti-lymphocytaire avec ou sans corticostéroïdes

Soumis

Phenotypical and transcriptional monitoring of peripheral blood leucocytes in recipients having received an antithymoglobulin induction with and without steroids following a kidney transplantation

Stéphanie Louis¹, Marie Audrain², Sophie Brouard¹, Barbara Schaffrath³, Uwe Janssen³, Dominique Baeten¹, Diégo Cantarovich¹, Jean-Paul Soulillou¹.

¹ Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Nantes University (UMR 643: “Immunointervention dans les Allo- et Xénotransplantations”) and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), University Hospital of Nantes, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

² CHU Hotel-Dieu, Immunology Laboratory, Nantes, France.

³ Memorec Biotec GmbH, a Miltenyi Biotec company, Cologne, Germany.

This work was supported by a “Programme Hospitalier de Recherche Clinique” (FRANCIA n°BRD/00/6-G) and the Fresenius Medical Care Company.

Corresponding author: Jean-Paul Soulillou, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France, Tel: +33.2.40.08.74.10, Fax: +33.2.40.08.74.11, e-mail: Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr

Abstract

Because of several side-effects, corticosteroids must be as possible minimised in transplantation. However, despite several advantages, their withdrawal has been associated with an increase in acute rejection episodes. To counter-balance this effect, induction treatment using antithymoglobulin (ATG) may be used as suggested in simultaneous pancreas-kidney transplantation. In this work, we report on a serial analysis of blood mononucleated cell phenotype and gene profiling in a randomised kidney recipients who received ATG induction following a first kidney transplantation with or without steroids. Methods: Kidney recipients received ATG, MMF and CsA without (non steroid group, n=22) (avoidance) or with (steroid group, n=28) steroids during 6 months (withdrawal). Graft function (creatinemia, proteinuria), detailed phenotypical analysis and gene profiling of peripheral blood cells were serially performed after transplantation. Results: The mean creatinemia values, daily proteinuria and rejection incidence did not differ between the two groups. Similarly, no difference was observed for the phenotypic pattern of blood lymphocytes between the two groups. In all recipients, ATG quickly and massively depleted all the T cell subsets (between 60% and 90% of depletion) and NK cells (approximately 90%), but not B cells. Interestingly, the lymphopenia-driven homeostatic proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells strongly differed with low CD4 regeneration. CD25^{hi}CD4⁺ T cells, described as regulatory cells, were also strongly depleted by ATG with a long-lasting effect. In addition, effector memory CD8⁺ T cells (CD45RA^{+/-} CD28⁻) reappeared the CD8 compartment of recipient blood. Finally, Immunology Microarray analysis of one year post-grafting blood leucocyte transcripts from patients having received steroids showed 19 genes overexpressed from that of steroid-free patients. Conclusion: Corticosteroid avoidance or withdrawal in such an immunosuppressive regimen have no influence on phenotype and low effect on transcriptional pattern of peripheral blood cells. In contrast, ATG therapy induces a strong depletion of T cell subsets with contrasted homeostatic regulation of CD4⁺ (including CD25^{hi}CD4⁺ T cells) and CD8⁺ T cells.

Introduction

For five decades, corticosteroids are routinely used to treat transplant recipients. They are given either punctually at large dose for the treatment of acute rejection episodes or at low dose as a component of maintenance immunosuppression [1]. By interfering with numerous intracellular signalisation pathways [2-4], corticosteroids target T lymphocytes [5, 6], monocytes [7], dendritic cells [8] and endothelial cells [9], all important donor or recipient cell targets or effectors in transplantation. Nevertheless, given both in short- or long-term, corticosteroids are directly or indirectly responsible for numerous side-effects. Corticosteroid-related side effects were reported as disturbance of lipid metabolisms [10], diabetes appearance [11], viral or bacterial infections [12], cataracts [13] and bone related problems [14]. Moreover, corticosteroids have been shown in experimental models to interfere with the development of a tolerance to liver [15, 16], intestine [17] and cardiac [18] transplants.

The commercialisation of new and more potent immunosuppressive drugs (ie Mycophenolate Mofetil, tacrolimus) allowed to reconsider the need of corticosteroids in transplantation [19]. In a first strategy, “steroid withdrawal”, corticosteroid doses are progressively reduced after transplantation until a definitive interruption (possible in a majority of the patients), usually within 6 months. Despite a decrease in steroid-related side effects, an increase in the incidence of acute rejection in such protocols has been reported [20-23]. The second strategy is the “steroid avoidance” consisting in a steroid-free immunosuppressive therapy since transplantation. We and others contributed to show that anti-thymoglobulins (ATG) induction therapy may help to avoid corticosteroids following kidney or combined kidney/pancreas transplantation [24-26].

ATG preparations consist of polyclonal mixtures of IgG raised in rabbits or horses against human T cells or thymocytes [27, 28]. They contain a large diversity of antibodies directed against molecules involved in activation, adhesion, chemotaxis [29, 30]. They induce apoptosis of cell targets using several mechanisms as Fas-dependant, complement-dependant and cathepsin B-dependant pathways [31], inhibit the cell proliferation [32], modulate the expression of cell surface molecules [33] and lyse dendritic cells [34]. Muller et al reported that the administration of ATG in kidney transplant recipients induced a persistant depletion of peripheral CD4⁺ T cells with, in parallel, an increase in CD57⁺CD8⁺ T cells [35]. Similar results were obtained in liver transplantation [36].

The present prospective study, which is a part of a randomised study (*D. Cantarovich et al, in preparation*), aimed to evaluate, on peripheral blood cells, the effect of corticosteroid avoidance in kidney recipients who received an induction treatment by ATG. Peripheral blood

mononucleated cells were monitored during two years after the transplantation. Here, we reported that corticosteroid avoidance in such an immunosuppressive regimen did not significantly affect the phenotypic pattern of analysed blood lymphocytes. We showed that ATG therapy is associated with a massive depletion of T cell subsets and NK cells. CD4⁺ T cells, including regulatory-associated CD25^{hi}CD4⁺ T cells, exhibit a profound altered homeostasis (not influenced by steroid). In addition, blood gene expression profiles of recipients with or without corticosteroids showed 19 genes significantly up-regulated at 1 year post-graft in the steroid group.

Patients

Between January 2001 and July 2004, 50 end-stage renal failure patients, candidates for a primary and cadaveric kidney transplantation, were locally enrolled in a multicentric study comprising 200 randomised recipients (Cantarovich et al, *in preparation*) and were submitted to this spin-off study. All the patients signed an informed consent of the protocol previously accepted by the University IRB. A first infusion of rabbit ATG (Fresenius®) (9mg/kg) was given at day 0, after surgery, and four additional doses (3mg/kg) at 1, 3, 5 and 7 days. This ATG (Fresenius®) was prepared from rabbit immunisations with Jurkat T cell line [37]. Cyclosporine (Neoral®, Novartis, Rueil-Malmaison, France) was introduced on day 5 after surgery at 8mg/kg/day and subsequent doses were adjusted to 150-250mg/ml. Patients also received CellCept® (Hoffman La Roche, Neuilly-sur-Seine, France) at 1g/b.i.d from the day of transplantation. A bolus of prednisone (Cortancyl®, Laboratoires Roussel, Paris, France) (500mg) was given before the first ATG infusion to all recipients. Then, according to the randomisation schedule, prednisone was either not prescribed (*no steroid group*) or administered at 1mg/kg during 5 days and slowly tapered, until interruption on day 180 (*steroid group*).

Materiel and methods

Antibodies: Antibodies used for this study were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France) (anti-CD45 FITC, anti-CD3 PC5, anti-CD4 APC, anti-CD8 APC, anti-CD16 PE, anti-CD56 PE, anti-CD19 PE and APC, anti-CD28 FITC, anti-CD160 PE, anti-CD45RA FITC, anti-CD62L PE, anti-TCR V α 24 PE, anti-TCR $\gamma\delta$ FITC, anti-TCR $\alpha\beta$ PE) and from BD Biosciences (Mountain View, CA) (anti-HLADR PE, anti-CD25 PE). Antibody clusters and corresponding cell populations were indicated in the table 1.

FACS analysis: Blood were collected in EDTA tubes before transplantation and at different timepoints after transplantation (7, 15, 30, 60, 90, 365 and 730 days). Fifty microliters of blood were incubated at room temperature for 10 min with a combination of four appropriate antibodies (see table 1). Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). Red cells were then lysed using a Coulter Whole Blood Lysing Reagent Kit (Beckman Coulter France). White cells were washed in PBS and fixed with PBS 1% formaldehyde. The four-color staining was analysed using a FACS Calibur with Cellquest Pro software (BD Biosciences, Mountain View, CA). As a blood formula was systematically assessed, results were expressed in number of cells per microliter of blood. The Mann-Whitney non-parametric test was performed to compare steroid versus non-steroid groups. The Kruskal-Wallis test was used to compare post-graft values (7, 15, 30, 60, 90, 365 and 730 days) with those in pre-graft and the Spearman rank correlation test. Differences were defined as statistically significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

RNA preparation and cDNA microarray hybridizations: A topic-defined PIQOR™ Immunology Microarray (Memorec Biotec GmbH, Cologne, Germany) with 1076 immune related human target genes was used for analysis. Microarray production was done as previously described [38]. Blood was collected in heparinized tubes before transplantation (D0), at 5 days (D5) and 365 days post-transplantation (D365). Leucocytes (isolated with an ammonium chloride solution) were frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for RNA extraction, according to the manufacturer's instructions. 2 µg of total RNA were subjected to T7-based linear amplification following the procedure described in the PIQOR™ Instruction Manual (Miltenyi Biotec GmbH, Germany). Quantity and quality of amplified RNA were checked by the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Fluorescent labeling of the probes were performed as previously described [38]. RNA from a common reference pool was labeled with Cy3-dCTP and RNA from ischemic blood patient samples was labeled with Cy5-dCTP. Cy3- and Cy5-labeled samples were then combined and cleaned up using QIAquick™ and protocol (Qiagen GmbH, Germany). Hybridization was performed according to manufacturer's guidelines of PIQOR™ Instruction Manual (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) using a GeneTAC hybridisation station (Perkin Elmer, Langen, Germany).

Data analysis of microarrays: Image capture and signal quantification of hybridized PIQOR™ cDNA microarrays were done with the ScanArrayLite (Packard Biosciences) and ImaGene software version 4.1 (BioDiscovery, Los Angeles, CA). For each spot, the local signal was measured inside a fixed circle of 350 µm diameter, and the background was measured outside the circle within specified rings 40 µm distant to the signal and 40 µm wide. Signal and background were taken to be the average of pixels between defined low and high percentages of maximum intensity with percentage parameter settings for low/high being 2/97% for signal and 0/80% for background. Local background was subtracted from the signal to obtain the net signal intensity and the ratio of Cy5/Cy3. The ratios were normalized to the median of all ratios by using only those spots for which the fluorescent intensity in one of the two channels was two times the negative control. Subsequently, the mean of the ratios of four corresponding spots representing the same cDNA was computed. Only genes displaying a net signal intensity 2-fold higher in the control or treatment sample than the average of the background signal intensities of all unflagged features were used for further analysis. For linear scaling, ratios with values less than 1 were treated in the following way: $(1/\text{ratio}) \times -1$. Therefore, -1 and +1 values are considered equal. A first supervised analysis of differential expression of genes between steroid and no steroid groups was performed using Significance Analysis of Microarray [39], with a false discovery rate threshold of $q < 5\%$. Only genes expressed in at least 50 % of the samples were considered for statistical analysis. Two-dimensional unsupervised hierarchical clustering of experiments based on relative ratios (D5/D0 and D365/D0) was performed using the Cluster- and Treeview software [40]. Only genes detected in at least 65% of the samples and 2-fold differentially expressed in at least one experiment were considered for the clustering analysis.

Results

Patients

28 kidney recipients were randomised in the steroid group and 22 in the no steroid group. The groups were age-matched (respectively 49.9 ± 13.5 years (range: 19-73) and 50.4 ± 9.7 years (range: 22-64)) and the number of HLA-A-B-DR incompatibilities between donor and recipient was equivalent (table 2). Creatinemia and proteinuria of these patients was followed at different timepoints after transplantation (90, 180, 365 days). A lower creatinemia was observed at 90 days in steroid group than in the no steroid group (respectively $127.7 \mu\text{mol/L} \pm 8.2$ vs $159.5 \mu\text{mol/L} \pm 11.7$) ($p < 0.05$). No significant difference was found at 180 and 365

days. In addition, no significant difference was found for the proteinuria between the two groups at all the timepoints (*data not shown*). Some recipients enrolled in the no steroid group received corticosteroids either in a 6-day course to treat an acute rejection episode (n=1) or because of CellCept® intolerance (n=5). Removing of these patients from the statistical analysis did not alter the conclusion.

In the no steroid group, one patient experienced an acute rejection (confirmed by biopsy) during the first month post-transplantation (table 2). One patient of the steroid group returned in dialysis because of rejection with documented non compliance to medication. The numbers of CMV infections, Herpes, zona and acute pyelonephritis were not significantly different between the two groups (table 2).

ATG induction depletes T lymphocytes and NK cells, but not B cells

To evaluate the effects of 7-day ATG induction on peripheral lymphocyte subsets, we analysed by flow cytometry the blood of all the recipients (n=50) who received ATG in induction therapy at 7, 15, 30, 60, 90, 365 and 730 days post-transplantation. ATG induced a rapid and massive depletion of T lymphocytes (90.6% at 7 days, $p<0.001$; figure 2). This depletion was persistent, with numbers of T lymphocytes reduced to 44.8% at 365 days ($p<0.05$). Then, the number of T cells progressively increased to roughly revert pre-transplantation levels at two years. CD4⁺ and CD8⁺ T cells were both uniformly and profoundly depleted by ATG (respectively 92.4% and 87.2% at 7 days, $p<0.001$; figure 2). However, the number of CD4⁺ T cells remained significantly low at 365 days (depletion of 65.8%, $p<0.001$), whereas CD8⁺ T cells increased more rapidly during the first months after transplantation, reverting pregraft values at 1 year, showing a clear-cut difference of post-ATG homeostasis between these two populations. The number of NK cells also quickly decreased after ATG (90.6% at 7 days, $p<0.001$; figure 2). But this reduction was more transient (although still significant at 28 days; $p<0.05$) than that observed for T lymphocytes. At 365 and 720 days, the number of NK cells was similar to the pre-graft values. Finally, no significant difference was observed for B cells after the ATG treatment and during the 2-year post-transplantation (figure 2).

ATG depletes circulating naive, effector and memory T cells

To test the effects of ATG on different T cell subsets, we analysed the same patients for naive (CD45RA⁺CD62L⁺), effector memory (CD45RA⁺CD62L⁻) and central memory (CD45RA⁻CD62L⁺) cell subsets in CD4⁺ and CD8⁺ T cells [41] (see table 1). As total CD8⁺ T cells,

naive and central memory CD8⁺ T cells were depleted by ATG until 3 months post-grafting. However, central memory CD8⁺ T cells were less sensible than naive T cells (respectively 38.5%, p<0.01 and 60.1%, p<0.001; figure 3). At 365 and 720 days, T subset count values were equivalent to pre-graft ones. In contrast, after an early depletion (respectively 74.5% and 61% at 15 days), the number of effector memory CD8⁺ T cells increased and reverted to pre-graft values at 90 days. As total CD4⁺ T cells, naive and central memory CD4⁺ T cells were also uniformly depleted by ATG until 2 years post-grafting (respectively 89.7%, p<0.001 and 79,6%, p<0.001; figure 3). In contrast, effector memory CD4⁺ T cells which were also significantly depleted by ATG at 15 and 90 days, displayed pre-graft values at 1 and 2 years. Taken together, these data show that both naive and memory T cells are depleted by ATG, but that the homeostasis of CD45RA^{+/-} effector memory populations was more rapid than that of naive and central memory cells.

ATG induces a prolonged depletion of T cell subsets with regulatory cell associated phenotype

As regulatory T cells may be involved in the experimental models of tolerance [42], we also analysed three T cell subsets (CD25^{hi}CD4⁺ T, CD8⁺CD28⁻ T, V α 24⁺ T), which have been associated with different type of T regulatory cell in the litterature [43-45]. The ATG treatment strongly decreased the absolute number of CD25^{hi}CD4⁺ T cells (75%). This low level persisted during at least two years after the treatment (p<0.001) (figure 4). Nevertheless, the percentage of CD25^{hi}CD4⁺ among CD4⁺ T cells remained constant suggesting that ATG did not deplete selectively the CD25^{hi}CD4⁺ T cells (*data not shown*). Similarly, the number of V α 24⁺ T cells, which contain NKT cells, was persistantly and significantly reduced until 2 years after the ATG treatment (71% at 15 days and 32% at 720 days; p<0.001) (figure 4). Finally, the CD8⁺CD28⁻ T cells were also highly depleted at 15 days (62%). Then, their number increased quickly to revert initial value after one year (figure 4). Interestingly, this population was correlated with CD45RA⁺CD62L⁻CD8⁺ T cells (r=0.67, p<0.0001).

The avoidance of corticosteroids did not modify the post-ATG phenotypic patterns

To check the effects of corticosteroids on ATG consequences, the previously described cell subsets were compared between recipients receiving or not corticosteroids. No significant difference was observed at any of the test times between the two groups (figures 2, 3 and 4), indicating that a 6-month course of corticosteroids do not interfere on tested cell subset depletion or homeostasis. However, all patients in the no steroid group were not strickly

speaking steroid-free, because a single infusion of corticosteroids was given at transplantation time. In addition, steroid boluses were administered in 1 patient who exhibited an acute rejection and in 5 other patients in whom steroids were reintroduced for CellCept® intolerance (leucopenia). No significant difference was found when these 6 patients were excluded of the statistical analysis (*data not shown*).

Gene expression profiling in steroid and no steroid groups at 6 months after withdrawal

To determine if ATG administered in the context of two strategies (steroid avoidance and withdrawal) generated different gene expression profiles in the long term (1 year), microarrays were performed on leucocytes from 12 recipients randomised in the steroid group and 11 in the no steroid group. Samples were collected before the transplantation, at 5 days post-grafting (during the ATG treatment and the corticotherapy) and at 365 days post-grafting (6 months following steroid withdrawal). Each gene value at 5 days and at 365 days was normalised with the pre-graft value (D0). A first supervised statistical analysis (SAM) was performed to compare the gene expression between the steroid and no steroid groups. Selection criteria were defined in the materials and methods. At day 5, no gene was found significantly different between steroid and no steroid groups (*data not shown*). In contrast, at one year, the steroid group displayed 19 genes significantly up-regulated ($q < 5\%$) in comparison with the no steroid group (table 3). However, these genes were weakly differentially expressed between the steroid and no steroid groups as shown by the low fold expression (< 1) for each gene. This gene cluster mainly involved molecules related to TCR-dependant signaling (ZAP70, CD3zeta, Fra1, PI3K), apoptosis control (P73, Bcl-X), B cell activation (CD72) and cell trafficking (Rantes, ChemR23, CCR10). Nevertheless, among them, no gene specifically related to tolerance or regulatory cell function was found up-regulated in recipients who received ATG without corticosteroids.

A second two-dimensional unsupervised hierarchical clustering of genes was thus performed to determine a group of genes which would allow to distinguish patients between the two strategies. Two first clustering of genes detected in 80% of experiments with or without at least 2-fold differentially expression was performed at day-365 samples (*data not shown*). Using these stringency criteria, no specific gene cluster was found to differentiate recipients who received ATG induction without early CsA and steroid treatment. Similar conclusion were obtained if selection criteria were broadened with genes detected in 65% of experiments and at least 2-fold differentially expression (figure 4).

Discussion

Because of major side effects of corticosteroids, recurrent attempts to minimise their use have been done. In some trials, corticosteroids were only given during a brief period after the transplantation and stopped [20, 46, 47]. In other studies, as our group, corticosteroids were avoided [48, 49]. However, despite advantages, these strategies usually induced a moderate increase in acute rejection episodes after the withdrawal and may be associated with higher creatinemia at one year [26]. To avoid increase in acute rejection in steroid-free protocol, ATG, which have been associated to a significant reduction of early acute rejection, including in fully mismatched simultaneous pancreas-kidney recipients [48], has been proposed in corticosteroid-minimising immunosuppressive therapy [26]. Both steroid avoidance or withdrawal (3 months) protocols with ATG induction seemed safe and effective therapies in a recent randomised study in pancreas-kidney transplantation [26].

In this report, we performed a prospective monitoring and gene profiling analysis of peripheral blood cells in patients receiving ATG in the context of two different strategies. We showed that, whereas ATG induced long-lasting changes, corticosteroid avoidance or withdrawal in such an immunosuppressive regimen do not affect the phenotype. In addition, only discrete changes in transcriptional pattern of blood cells at one year were observed.

ATG therapy induced a rapid depletion of T cells, both the CD4⁺ and CD8⁺ T subsets. Nevertheless, the homeostasis of CD8⁺ T cells was more rapid than that of CD4⁺ T cells. This suggests different homeostatic mechanisms between these two populations, with a more thymus-dependant renewal of CD4⁺ T cells compared to CD8⁺ T cells [50]. Thymic involution in adult [51] may contribute to post-ATG persistent CD4⁺ lymphopenia with a more rapid CD8⁺ regeneration. This is also suggested by the normal reconstitution of CD4⁺ T cell compartment in pediatric kidney recipients [52]. Moreover, in contrast to Muller et al [35], we reported here that ATG therapy induced a profound depletion of NK cells. However, this decrease was transient and, at 2 months, the count of NK cells reverted normal values.

Our results showed ATG induced depletion of both naive and memory CD4⁺/CD8⁺ T cells. However, the homeostasis of naive and central memory T cells were more rapid than that of CD45RA^{+/−} effector memory T cells (mainly in the CD8⁺ compartment). Several explanation may be considered. Firstly, it may be due to different homeostatic regulations. Indeed, whereas naive T cell homeostasis needs MHC molecules and is IL7-dependant [53, 54], the homeostasis-driven proliferation of memory T cells is more MHC-independant and usually involve IL15 [53, 54]. Secondly, the increase in effector memory CD8⁺ T cells may reflect an increase in the pool of virus-committed CD8⁺ T cells and particularly CMV infections [55,

56]. Interestingly, we also found a positive correlation between this population and CD28⁻CD8⁺ T cells, a phenotype which may have been associated to cytotoxic cells [57]. Muller et al showed, after the same type of ATG Fresenius® administration, an increase in CD8⁺CD57⁺ T cells, also associated to cytotoxic cells [35]. Thirdly, this CD28⁻CD45RA^{+/+}CD8⁺ T cell subset may correspond to homeostasis-driven naïve T cell proliferation. Indeed, numerous studies demonstrated that naïve T cells undergoing homeostatic proliferation, acquired a “pseudo-memory” phenotype [58]. Finally, we can not exclude the possibility of suppressive CD28⁻CD8⁺ T cells. In fact, two suppressive CD28⁻CD8⁺ T cells were described in transplanted patients [59] or in patients with systemic lupus erythematosus [44]. The first one may induce the “tolerogenesis” of APC [59], whereas the second act by producing soluble factors (IFN γ and IL6) [44]. Taken together and based on comparison of phenotype monitoring in studies which used different types of antithymoglobulins [33, 36, 37, 60, 61], our data also do not support that the ATG formulation we have used (Fresenius®) markedly differ from the effect of the other antithymoglobulins (Thymoglobulin®). Both the initial depletion and long-term effects are of the same order of magnitude [60].

CD25^{hi}CD4⁺ T cells were described in the literature as potentially regulatory T cells [43, 62, 63]. They do not proliferate to a polyclonal or allogeneic stimulation and have the capacity to inhibit the function of several immune cells (CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, NK cells) including alloresponses [42, 43, 62, 63]. In our work, ATG depleted CD25^{hi}CD4⁺ T cells with but a constant CD25^{hi}CD4⁺/CD4⁺ ratio. Thus if ATG did not induce the selective depletion of CD25^{hi}CD4⁺ T cells, the main effect was a strong decrease in the absolute number of CD25^{hi}CD4⁺ T cells. Similarly to naïve CD4⁺ T cells, CD25^{hi}CD4⁺ T cell homeostasis was slow. Gavin et al showed that regulatory CD25^{hi}CD4⁺ T cells were able to undergo lymphopenia-driven homeostatic proliferation, which increased their suppressive capacities [64]. Our data on long-lasting depletion of CD25^{hi}CD4⁺ T cells may be partially explained by their anergic state with a low IL2 availability in the presence of calcineurine inhibitors [65, 66]. In this context, it is interesting to note that, despite severe long-lasting (at least 2 years) depletion of CD25^{hi}CD4⁺ T cells, only one patient exhibited an acute rejection with no indication of increase in early chronic rejection (based on creatinemia and proteinuria at 1 and 2 years). Thus our data do not support that the level of CD25^{hi}CD4⁺ T cells (at least within the study survey) is crucial for the graft outcome.

Previous *in vitro* studies showed that glucocorticoids, in combination with an analog of vitamin D3, may induce regulatory CD4⁺ T cells by tolerogenesis of dendritic cells [67-69]. These cells produced large amounts of IL10, corresponding to Tr1 regulatory T cells [70].

Corticosteroids may also increase the expression of FOXP3 [71], molecule recently associated with regulatory cells [72]. In our study, no difference was observed during the corticotherapy or at 6-month withdrawal for three phenotype which have been classically associated with “regulatory” T cells (CD25^{hi}CD4⁺, CD28⁻CD8⁺, NKT) between recipients treated with ATG and who received (or not) steroids. Similarly, microarray analysis performed after the steroid withdrawal did not reveal long-lasting difference of expression of molecules classically associated with regulatory cells, such as FOXP3, TGFβ, IL10, GITR, CTLA4 (*data not shown*).

Immunology microarrays of 1076 genes comprising most of the genes known to be potentially modified in various immunologically driven contexts, including transplant rejection and tolerance, were used to analyse if the two induction strategies could generate transcriptional differences. Part of the rationale of this study lies in the possibility that the ATG effects could be antagonized by an initial and concomitant usage of corticosteroid and CsA [31]. There are several evidences that corticosteroids or calcineurin inhibitors can antagonize agents blocking second signals [73, 74]. Interestingly, ATG have been shown to contain specificities against second signal molecules [75]. Our microarray analysis showed only a weak fingerprint of the ATG treatment without initial corticotherapy at 1 year post-transplantation. Blood gene profiling pattern of the patients who received ATG treatment without corticosteroids displayed a low down-regulation of 19 genes in comparison with steroid recipients. Interestingly, among these genes, four are involved in the TCR signaling, ZAP70, CD3 zeta, PI3K and Fra1. However, in general, corticosteroids can inhibit the T cell activation and proliferation by repressing the early events of TCR signaling (such as the ZAP70 and CD3 zeta phosphorylations) [76]. Nevertheless, the genes which remained differentially expressed at 1 year of the transplantation and of ATG administration with or without steroids may represent changes induced by the initial strategy rather than being directly influenced by the steroid treatment which were stopped 6 months before testing. Although no significant difference in creatinemia and proteinuria were found between the two strategies, different transcriptional profiles at one year warrant a long clinical follow-up in this subgroup of patients and in the whole 200 patient cohort.

References

1. Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR: The Reversal of Rejection in Human Renal Homografts with Subsequent Development of Homograft Tolerance. *Surg Gynecol Obstet* 117:385, 1963.
2. Almawi WY, Melemedjian OK: Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28(2):69, 2002.
3. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin M: Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62(6):1205, 1990.
4. Bianchi M, Meng C, Ivashkiv LB: Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(17):9573, 2000.
5. Planey SL, Litwack G: Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279(2):307, 2000.
6. Almawi WY, Hess DA, Assi JW, Chudzik DM, Rieder MJ: Pretreatment with glucocorticoids enhances T-cell effector function: possible implication for immune rebound accompanying glucocorticoid withdrawal. *Cell Transplant* 8(6):637, 1999.
7. Santini G, Patrignani P, Sciulli MG, Seta F, Tacconelli S, Panara MR, Ricciotti E, Capone ML, Patrono C: The human pharmacology of monocyte cyclooxygenase 2 inhibition by cortisol and synthetic glucocorticoids. *Clin Pharmacol Ther* 70(5):475, 2001.
8. Pan J, Ju D, Wang Q, Zhang M, Xia D, Zhang L, Yu H, Cao X: Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett* 76(3):153, 2001.
9. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G: A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):9991, 1992.
10. Fellstrom B: Impact and management of hyperlipidemia posttransplantation. *Transplantation* 70(11 Suppl):SS51, 2000.
11. O'Byrne S, Feely J: Effects of drugs on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetics (Part I). *Drugs* 40(1):6, 1990.
12. Klein NC, Go CH, Cunha BA: Infections associated with steroid use. *Infect Dis Clin North Am* 15(2):423, 2001.
13. Pai RP, Mitchell P, Chow VC, Chapman JR, O'Connell PJ, Allen RD, Nankivell BJ: Posttransplant cataract: lessons from kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 69(6):1108, 2000.
14. Rodino MA, Shane E: Osteoporosis after organ transplantation. *Am J Med* 104(5):459, 1998.
15. Qian S, Lu L, Fu F, Li Y, Li W, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW: Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 158(10):4654, 1997.
16. Wang C, Sun J, Sheil AG, McCaughan GW, Bishop GA: A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Transplantation* 72(1):44, 2001.
17. Koshiba T, Van Damme B, Ji P, Lu Y, Yan Y, Sefrioui H, Rutgeerts O, Overbergh L, Tanaka K, Mathieu C, Waer M, Pirenne J: Intestinal allografts delay rejection and prolong survival of combined donor-specific and third party solid organ transplants. *Transplant Proc* 33(1-2):1550, 2001.

18. Levy AE, Alexander JW: The significance of timing of additional short-term immunosuppression in the donor-specific transfusion/cyclosporine-treated rat. *Transplantation* 62(2):262, 1996.
19. Citterio F: Steroid side effects and their impact on transplantation outcome. *Transplantation* 72(12 Suppl):S75, 2001.
20. Chakrabarti P, Wong HY, Scantlebury VP, Jordan ML, Vivas C, Ellis D, Lombardozi-Lane S, Hakala TR, Fung JJ, Simmons RL, Starzl TE, Shapiro R: Outcome after steroid withdrawal in pediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 70(5):760, 2000.
21. Schulak JA, Mayes JT, Moritz CE, Hricik DE: A prospective randomized trial of prednisone versus no prednisone maintenance therapy in cyclosporine-treated and azathioprine-treated renal transplant patients. *Transplantation* 49(2):327, 1990.
22. Cronin DC, 2nd, Bruce DS, Newell KA, Josephson MA, Millis JM, Piper JB, Ruebe M, Kirby M, Thistlethwaite JR, Jr., Woodle ES: Tacrolimus therapy for refractory renal allograft rejection: experience with steroid withdrawal. *Transplant Proc* 29(1-2):307, 1997.
23. Grinyo JM, Gil-Vernet S, Seron D, Cruzado JM, Moreso F, Fulladosa X, Castela AM, Torras J, Hooftman L, Alsina J: Steroid withdrawal in mycophenolate mofetil-treated renal allograft recipients. *Transplantation* 63(11):1688, 1997.
24. Cantarovich D, Giral-Classe M, Hourmant M, Dantal J, Blanco G, Karam G, Soullillou JP: Low incidence of kidney rejection after simultaneous kidney-pancreas transplantation after antithymocyte globulin induction and in the absence of corticosteroids: results of a prospective pilot study in 28 consecutive cases. *Transplantation* 69(7):1505, 2000.
25. Birkeland SA: Steroid-free immunosuppression after kidney transplantation with antithymocyte globulin induction and cyclosporine and mycophenolate mofetil maintenance therapy. *Transplantation* 66(9):1207, 1998.
26. Cantarovich D, Karam G, Hourmant M, Dantal J, Blanco G, Giral M, Soullillou JP: Steroid avoidance versus steroid withdrawal after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Am J Transplant*, in press.
27. Bonneville M, Carcagne J, Vie H, Moreau JF, Chevalier S, Latour M, Carosella E, Soullillou JP: Polyclonal rabbit gamma globulins against a human cytotoxic CD4+ T cell clone. I. Clone characteristics and antilymphocyte globulin preparation. *Transplantation* 48(2):253, 1989.
28. Traeger J, Touraine JL, Archimbaud JP, Malik MC, Dubernard JM: Thoracic duct drainage and antilymphocyte globulin for renal transplantation in man. *Kidney Int Suppl* (8):S103, 1978.
29. Michallet MC, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard JP: Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 75(5):657, 2003.
30. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM: A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 57(5):685, 1994.
31. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N: Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91(7):2360, 1998.
32. Merion RM, Howell T, Bromberg JS: Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation* 65(11):1481, 1998.
33. Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP: Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 71(3):460, 2001.

34. Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N: Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* 79(3):369, 2005.
35. Muller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, Lange H: Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 64(10):1432, 1997.
36. Oertel M, Sack U, Kohlhaw K, Lehmann I, Emmrich F, Berr F, Hauss J, Schwarz R: Induction therapy including antithymocyte globulin induces marked alterations in T lymphocyte subpopulations after liver transplantation: results of a long-term study. *Transpl Int* 15(9-10):463, 2002.
37. Bourdage JS, Hamlin DM: Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 59(8):1194, 1995.
38. Bosio A, Knorr C, Janssen U, Gebel S, Haussmann HJ, Muller T: Kinetics of gene expression profiling in Swiss 3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Carcinogenesis* 23(5):741, 2002.
39. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9):5116, 2001.
40. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25):14863, 1998.
41. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745, 2004.
42. Wood KJ, Sakaguchi S: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3(3):199, 2003.
43. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167(3):1245, 2001.
44. Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, Monetti M, Contini P, Ghio M, Setti M, Puppo F, Indiveri F: Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166(10):6452, 2001.
45. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L: Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6(7):782, 2000.
46. Opelz G: Effect of the maintenance immunosuppressive drug regimen on kidney transplant outcome. *Transplantation* 58(4):443, 1994.
47. Shapiro R, Scantlebury VP, Jordan ML, Vivas C, Gritsch HA, Ellis D, Gilboa N, Lombardozzi-Lane S, Irish W, Fung JJ, Hakala TR, Simmons RL, Starzl TE: Tacrolimus in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 62(12):1752, 1996.
48. Cantarovich D, Karam G, Giral-Classe M, Hourmant M, Dantal J, Blancho G, Le Normand L, Soulillou JP: Randomized comparison of triple therapy and antithymocyte globulin induction treatment after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Kidney Int* 54(4):1351, 1998.
49. Birkeland SA: Steroid-free immunosuppression in renal transplantation: a long-term follow-up of 100 consecutive patients. *Transplantation* 71(8):1089, 2001.
50. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Magrath IT, Wexler LH, Dimitrov DS, Gress RE: Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89(10):3700, 1997.
51. Aspinall R, Andrew D: Thymic involution in aging. *J Clin Immunol* 20(4):250, 2000.

52. Klaus G, Mostert K, Reckzeh B, Mueller TF: Phenotypic changes in lymphocyte subpopulations in pediatric renal-transplant patients after T-cell depletion. *Transplantation* 76(12):1719, 2003.
53. Ge Q, Hu H, Eisen HN, Chen J: Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2989, 2002.
54. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, LeRoy E, Sprent J, Surh CD: Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med* 195(12):1523, 2002.
55. Fiche M, Souillou JP, Bignon JD, Billaudel S, Guenel J: T lymphocyte monitoring in kidney transplant recipients undergoing cytomegalovirus infection or rejection episodes. *Transplantation* 37(4):421, 1984.
56. Kern F, Khatamzas E, Surel I, Frommel C, Reinke P, Waldrop SL, Picker LJ, Volk HD: Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8^{pos}. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol* 29(9):2908, 1999.
57. Sze DM, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter AG, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua DE: Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8(+)CD57(+)CD28(-) compartment. *Blood* 98(9):2817, 2001.
58. Goldrath AW, Bogatzki LY, Bevan MJ: Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192(4):557, 2000.
59. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciuc-Foca N: Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺CD28⁻ T cells. *Int Immunol* 10(6):775, 1998.
60. Djamali A, Turc-Baron C, Portales P, Levenson G, Chong G, Clot J, Mourad G: Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 69(5):799, 2000.
61. Krasinskas AM, Kreisel D, Acker MA, Bavaria JE, Pochettino A, Kotloff RM, Arcasoy S, Blumenthal N, Kamoun M, Moore JS, Rosengard BR: CD3 monitoring of antithymocyte globulin therapy in thoracic organ transplantation. *Transplantation* 73(8):1339, 2002.
62. Camara NO, Sebille F, Lechler RI: Human CD4⁺CD25⁺ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8⁺ T cell activation. *Eur J Immunol* 33(12):3473, 2003.
63. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B: Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9(2):606, 2003.
64. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A: Homeostasis and anergy of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3(1):33, 2002.
65. Metcalfe S, Alexander D, Turner J: FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal. *Cell Immunol* 158(1):46, 1994.
66. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S: Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ CD4⁽⁺⁾ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201(5):723, 2005.
67. Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH: Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunol Lett* 91(1):63, 2004.
68. O'Garra A, Barrat FJ: In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4⁺ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 85(2):135, 2003.

69. Dong X, Bachman LA, Kumar R, Griffin MD: Generation of antigen-specific, interleukin-10-producing T-cells using dendritic cell stimulation and steroid hormone conditioning. *Transpl Immunol* 11(3-4):323, 2003.
70. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG: A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737, 1997.
71. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB: Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114(6):1425, 2004.
72. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF: Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* 112(9):1437, 2003.
73. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, Hong X, Thomas D, Fechner JH, Jr., Knechtle SJ: CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16):8789, 1997.
74. Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, Cho HR, Aruffo A, Hollenbaugh D, Linsley PS, Winn KJ, Pearson TC: Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 381(6581):434, 1996.
75. Pistillo MP, Tazzari PL, Bonifazi F, Bandini G, Kato T, Matsui T, Nishioka K, Conte R, Ferrara GB: Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* 73(8):1295, 2002.
76. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, Kioussis D, Leo O: Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193(7):803, 2001.

Legends

Table 1: Combinaisons of four antibodies used in this study and corresponding lymphocyte populations.

Table 1

CD45FITC/CD3PC5/CD4APC/CD8PE	T cells (CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cells)
CD45FITC/CD3PC5/CD19APC/CD56PE +CD16PE	B cells, NK cells
CD45FITC/CD3PC5/CD4APC/HLA-DRPE	Activated HLA-DR ⁺ T cells
CD45FITC/CD3PC5/CD4APC/CD25PE	« regulatory » CD25 ^{hi} CD4 ⁺ T cells (Baecher-Allan et al, 2001)
CD3PC5/CD8APC/CD160PE/CD28FITC	« suppressor » (Liu et al, 1998) or cytotoxic (Kern et al, 1999) CD28 ⁺ CD8 ⁺ T cells
CD3PC5/CD4APC + CD8APC/TCR $\alpha\beta$ PE/TCR $\gamma\delta$ FITC	TCR $\alpha\beta$ ⁺ T cells, TCR $\gamma\delta$ ⁺ T cells
CD3PC5/ CD4APC + CD8APC/V α 24PE/TCR $\gamma\delta$ FITC	V α 24 ⁺ T cells (enriched-NKT population) (van der Vliet et al., 2002)
CD3PC5/CD8APC/CD62LPE/CD45RAFITC	Naive CD45RA ⁺ CD62L ⁺ / central memory CD45RA ⁻ CD62L ⁺ / effector CD45RA ⁺⁺ CD62L ⁻ CD8 ⁺ T cells (Sallusto et al, 2004)
CD3PC5/CD4APC/CD62LPE/CD45RAFITC	Naive CD45RA ⁺ CD62L ⁺ / central memory CD45RA ⁻ CD62L ⁺ / effector CD45RA ⁺⁺ CD62L ⁻ CD4 ⁺ T cells (Sallusto et al, 2004)

Table 2: Clinical data of studied kidney recipients receiving (steroid group) or not (no steroid group) corticosteroids. Are indicated the number of patients, age, gender, HLA incompatibilities, acute rejection episodes and viral infections.

Table 2

Groups	Steroid	Non steroid
Number of patients	28	22
Age (years)	49.9 ± 13.5	50.4 ± 9.7
Gender (M/F)	17/11	20/2
HLA class I and II incompatibilities	4	3,5
Acute Rejection (%)	0/28	1/22
Viral infections (%)	CMV: 13.8% (4/28) HSV: 3.5% (1/28) PNA: 3.5% (1/28) Zona: 3.5% (1/28)	CMV: 13.6% (3/22) HSV: 0% (0/22) PNA: 9.1% (2/22) Zona: 0% (0/22)

Table 3: Genes differentially expressed between steroid and no steroid groups at 365 days after transplantation (D365/D0). Selection criteria were defined as a q value inferior to 5% and genes expressed in at least 50% of patients in each group (steroid and no steroid). The fold change was indicated as the ratio steroid versus no steroid.

Gene	Definition	Fold steroid vs no steroid
ZAP36	TYROSINE-PROTEIN KINASE ZAP-70	0.31
CD36L2	LYSOSOME MEMBRANE PROTEIN II	0.27
P73_1	TUMOR PROTEIN P73	0.37
CMKLR1	CHEMOKINE RECEPTOR-LIKE 1	0.52
ACVR1	ACTIVIN RECEPTOR TYPE I	0.35
FRA1	FOS-RELATED ANTIGEN 1.	0.43
AP1G2	ADAPTER-RELATED PROTEIN COMPLEX 1 GAMMA 2 SUBUNIT	0.38
ITGB1	INTEGRIN BETA 1	0.54
CD6	T-CELL DIFFERENTIATION ANTIGEN CD6	0.32
SPARC	SECRETED PROTEIN ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE	0.51
CCL5	C-C CHEMOKINE LIGAND TYPE 5 (RANTES)	0.57
CD3Z-CD3H	T-CELL SURFACE GLYCOPROTEIN CD3 ZETA CHAIN	0.51
CD72	B-CELL DIFFERENTIATION ANTIGEN CD72	0.44
PIK3C2A	PHOSPHO INOSITIDE 3-KINASE.	0.51
BCL2L1	APOPTOSIS REGULATOR BCL-X.	0.54
CCR10	C-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 10	0.40
PTCH2	PATCHED PROTEIN HOMOLOG 2	0.46
KLRC4	NKG2-D ACTIVATING NK RECEPTOR	0.36
MATK	NTK MEGAKARYOCYTE-ASSOCIATED TYROSINE-PROTEIN KINASE	0.53

Table 3

Figure 1: Longitudinal and comparative analysis of T cells (CD4⁺ and CD8⁺), NK cells and B cells in kidney recipients receiving or not corticosteroids. Analysis were performed at 7, 15, 30, 60, 90, 365 and 730 days after transplantation. Results, expressed in cell number per microliter of blood, were shown for patients in the no steroid (open square) and the steroid (black triangle) groups. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

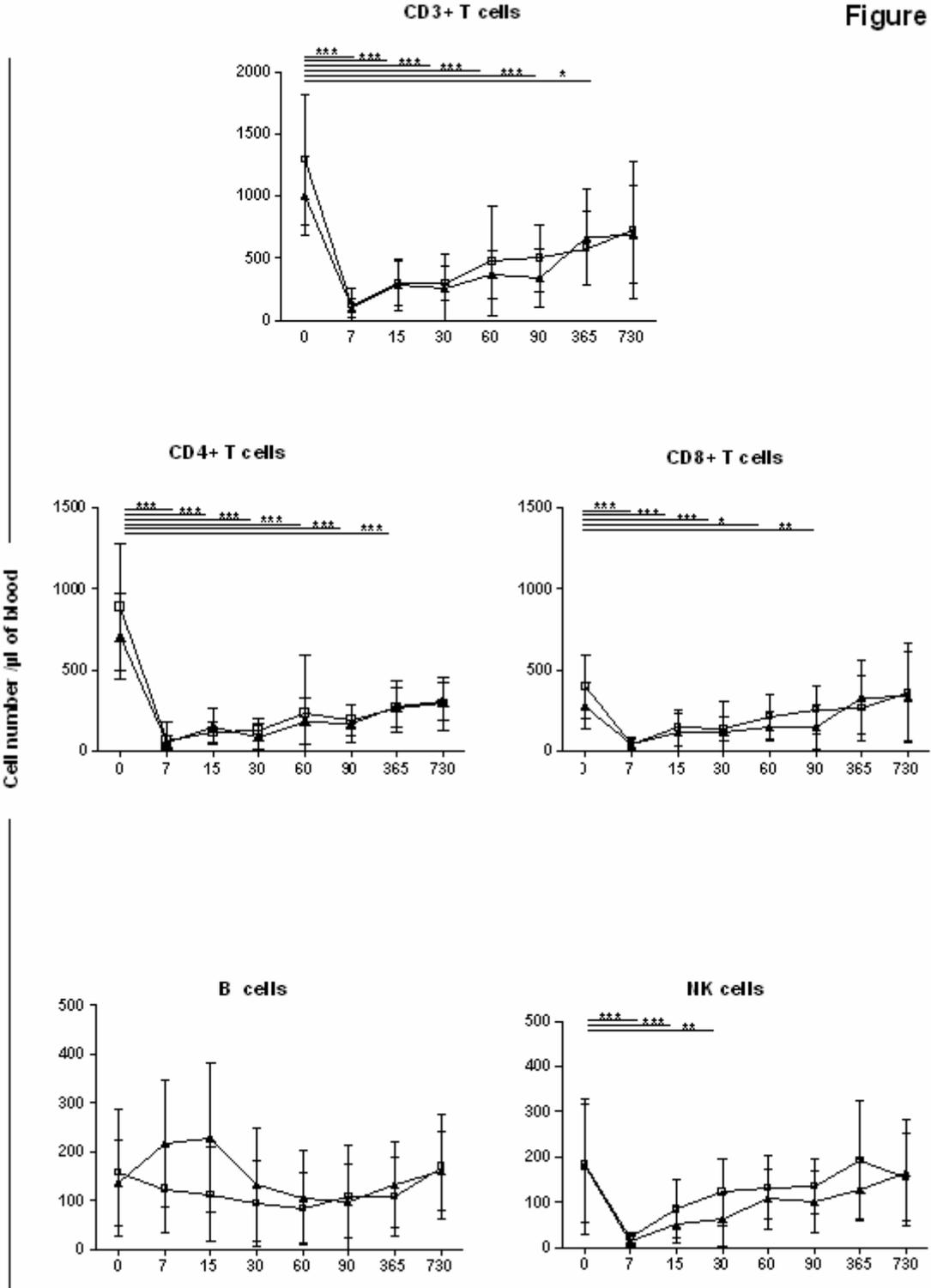


Figure 2: Longitudinal and comparative analysis of naive ($CD45RA^+CD62L^+$), central memory ($CD45RA^-CD62L^+$) and effector memory ($CD45RA^{+/-}CD62L^-$) $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in kidney recipients receiving or not corticosteroids. Analysis were performed at 15, 90, 365 and 730 days after transplantation. Results, expressed in cell number per microliter of blood, were shown for patients in the no steroid (open square) and the steroid (black triangle) groups. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

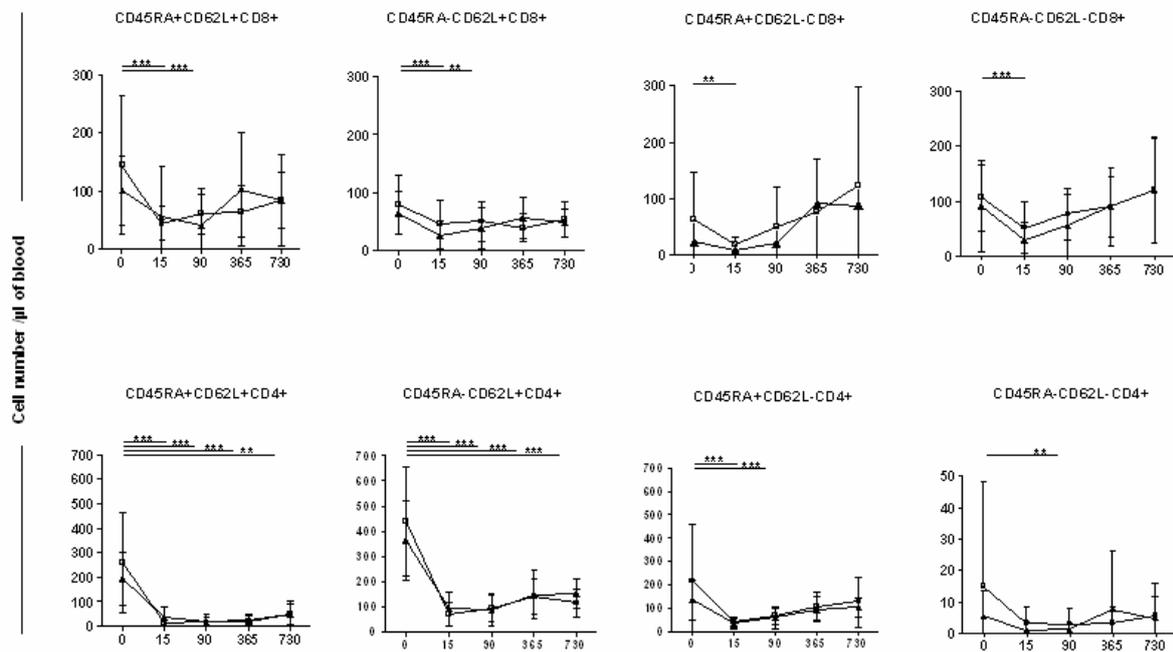


Figure 2

Figure 3: Longitudinal and comparative analysis of regulatory associated T cells (CD25^{hi}CD4⁺ T cells, CD28⁻CD8⁺ T cells, V α 24⁺ T cells) in kidney recipients receiving or not corticosteroids. Analysis were performed at at 15, 90, 365 and 730 days after transplantation. Results, expressed in cell number per microliter of blood, were shown for patients in the no steroid (open square) and the steroid (black triangle) groups. Significant differences are indicated by the * symbol for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

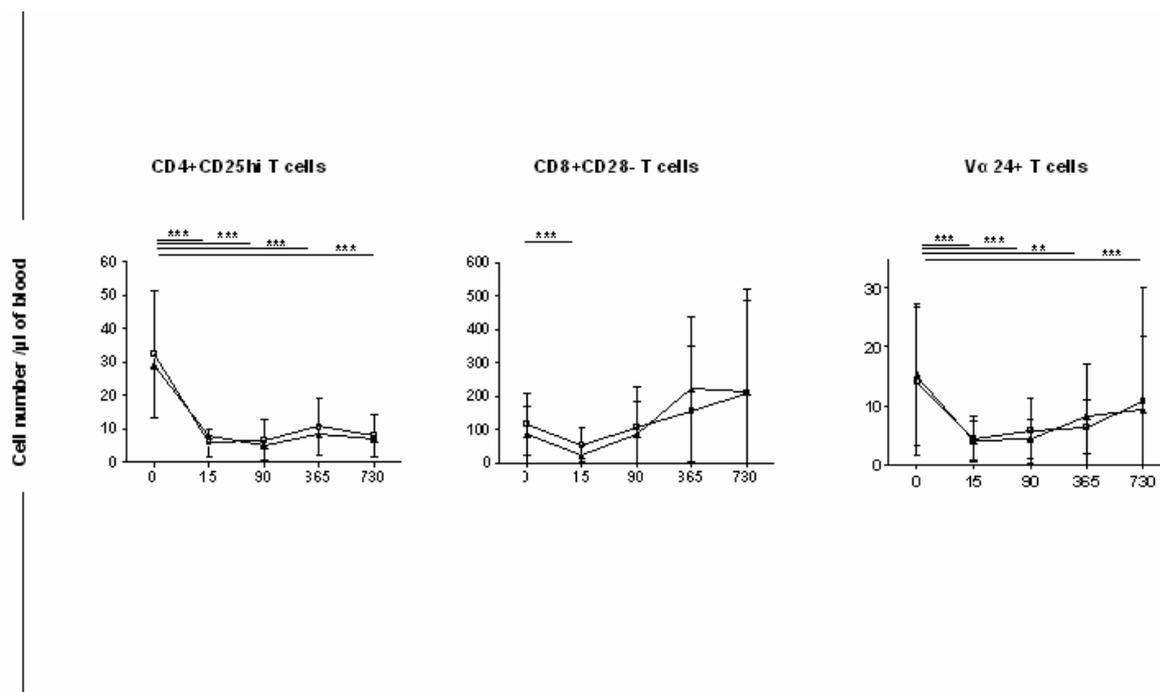
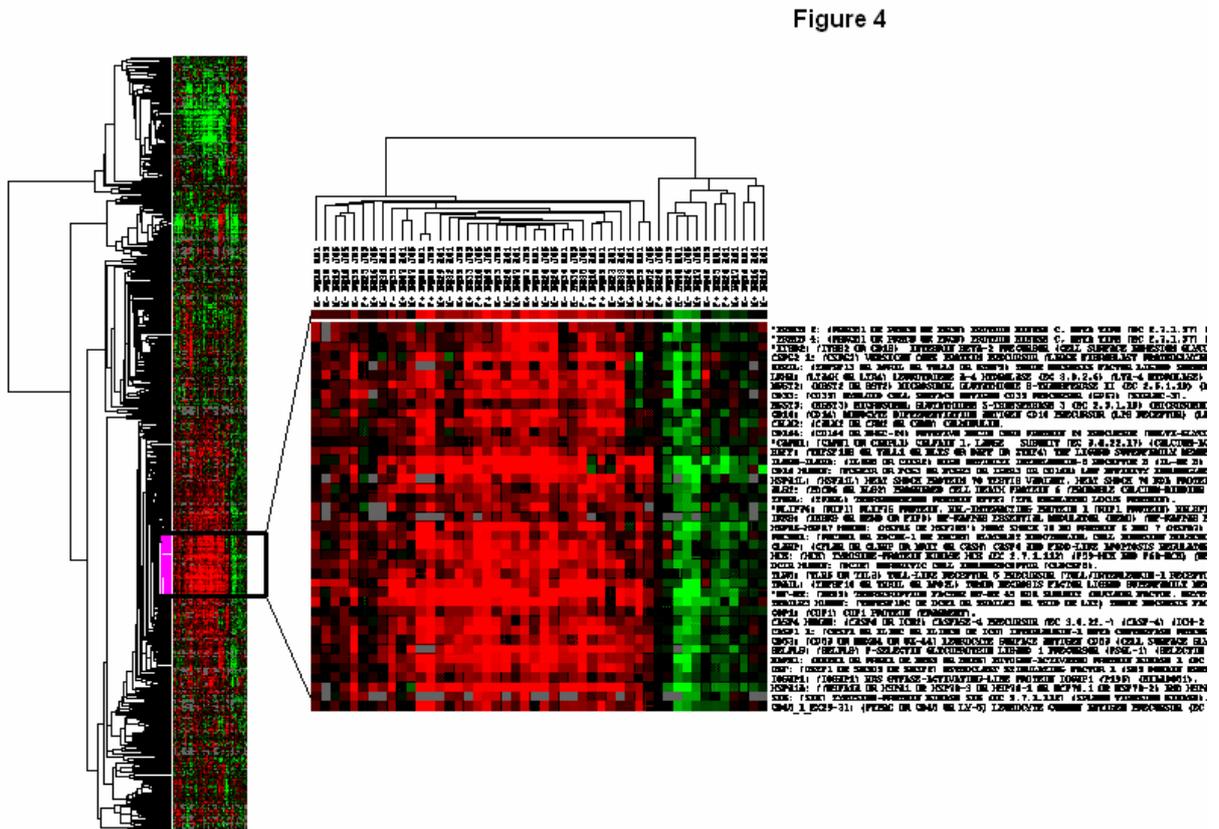


Figure 3

Figure 4: Clustering of genes that are at least 2-fold differentially expressed and which are detected in minimum 65 % of experiments (M/F= male/female; +/- = steroid/no steroid).



IV. Discussion et perspectives

Malgré une grande efficacité en transplantation, les glucocorticoïdes induisent aussi de nombreux effets secondaires (Citterio, 2001). Des protocoles de minimisation ont donc été initiés soit en réduisant progressivement les doses de corticostéroïdes après la transplantation, soit en bannissant totalement leur utilisation (Birkeland, 2001; Cantarovich et al., 2000b; Cantarovich et al., in press; Chakrabarti et al., 2000; Shapiro et al., 1996). Malgré une nette diminution des effets secondaires, les premières tentatives ont mis en évidence une augmentation de l'incidence des rejets aigus. A Nantes, le sérum anti-lymphocytaire (SAL) qui a montré sa capacité à réduire les rejets (Cantarovich et al., 1998), a été utilisé avec succès dans plusieurs protocoles de minimisation des stéroïdes (Cantarovich et al., 2000b; Cantarovich et al., in press). Dans cette étude, un monitoring immunologique des leucocytes sanguins (phénotypage, profil d'expression transcriptionnelle) a été réalisé dans une cohorte restreinte de patients greffés rénaux inclus localement dans un protocole randomisé multicentrique de minimisation des corticostéroïdes sous effet d'un SAL et sans traitement initial par la ciclosporine.

Comme d'autres SAL (Djamali et al., 2000; Oertel et al., 2002; Preville et al., 2001), le SAL (Frésenius®) induit une forte et rapide déplétion des lymphocytes T, que ce soit CD4+ et CD8+. L'homéostasie des lymphocytes T CD4+ est plus lente que celle des lymphocytes T CD8+, ce qui se traduit par une inversion persistante du ratio CD4+/CD8+ non influencée par les corticostéroïdes, et qui peut s'expliquer par des mécanismes de régulation homéostatique distincts entre ces deux populations. En effet, il a été montré que la régénération des lymphocytes T CD4+ nécessitait plus la présence du thymus que celle des lymphocytes T CD8+ (Mackall et al., 1997). La taille du thymus se réduisant chez l'adulte (Aspinall and Andrew, 2000), l'homéostasie des cellules T CD4+ est plus lente. Cette hypothèse est confortée par l'étude de Klaus et coll qui montre une régénération plus rapide des cellules T CD4+ chez des patients greffés pédiatriques que chez des adultes (Klaus et al., 2003). Dans notre étude, une corrélation entre la régénération des lymphocytes T CD4+ et l'âge des patients sera recherchée.

Muller et coll ont montré, chez des patients greffés rénaux, que 6 mois après un traitement d'induction avec le SAL (Frésenius®), le nombre des cellules NK ne variait pas (Muller et al., 1997). Au contraire, nous montrons dans cette étude qu'un tel traitement induit une profonde déplétion des cellules NK après la greffe, mais qu'elle est transitoire. Quant aux lymphocytes B, le SAL (Frésenius®) qui contient peu d'anticorps spécifiques des cellules B (Bourdage and Hamlin, 1995), ne modifie pas leur nombre contrairement à d'autres SAL de lapin comme la Thymoglobuline® (Preville et al., 2001).

De même, nous avons observé qu'après un traitement par le SAL (Frésenius®), les lymphocytes T CD45RA[±] effecteurs sont plus rapidement régénérés (principalement dans le compartiment T CD8⁺) que les lymphocytes T naïfs et de la mémoire centrale. Quatre hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, il y a des mécanismes de régulation homéostatique distincts, puisque le contact avec les molécules de CMH et l'IL7 sont essentielles aux lymphocytes T naïfs alors que les cellules T mémoires ont surtout besoin d'IL15 (Tan et al., 2002). Deuxièmement, cette augmentation de lymphocytes T CD8⁺ effecteurs peut refléter une infection virale chronique comme le CMV (Fiche et al., 1984). De manière intéressante, nous avons trouvé une corrélation positive entre les populations T CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻ et T CD8⁺CD28⁻, qui peuvent correspondre, d'après la littérature, à des lymphocytes T « cytotoxiques » (Sze et al., 2001). Un lien éventuel entre ce phénotype et des infections virales sera recherché chez ces patients. De même, des analyses statistiques multivariées des profils d'expression transcriptionnelle seront réalisées pour voir si des molécules de cytotoxicité (telles perforine, granzyme) sont associées aux infections virales. Troisièmement, cette population cellulaire pourrait refléter la prolifération homéostatique des lymphocytes T naïfs qui acquièrent un phénotype « pseudo mémoire » (Goldrath et al., 2000). Enfin, des cellules T CD8⁺CD45RA[±]CD28⁻ ont été aussi décrites dans la littérature, en transplantation et dans des maladies autoimmunes, comme des cellules ayant des capacités suppressives (Filaci et al., 2001; Liu et al., 1998). L'une de ces populations suppressives agit par contact cellulaire en tolérogénisant les CPA (qui acquièrent un phénotype tolérogène ILT3⁺ILT4⁺CD80⁻CD86⁻) (Manavalan et al., 2003), alors que l'activité suppressive de

l'autre population dépend de la sécrétion de cytokines telles que IL6 et IFN γ (Filaci et al., 2001). L'analyse transcriptionnelle par puces à ADN des leucocytes des patients à 1 an après le traitement par ATG n'a montré ni augmentation de l'IL6 ou de l'IFN γ , ni diminution des molécules CD80 et CD86 par rapport aux leucocytes prélevés avant la transplantation (*données non montrées*). Toutefois, un dosage de ces 2 cytokines dans le sérum des patients ainsi qu'une analyse transcriptionnelle des molécules ILT3 et ILT4 sur les leucocytes circulants pourront être effectués avant et à différents temps après le traitement par SAL.

Dans cette étude, nous avons aussi montré que le SAL (Frésenius®) induisait, pendant au moins 2 ans, une profonde déplétion des lymphocytes T CD4+CD25^{hi}, décrites chez l'Homme comme des cellules régulatrices (Baecher-Allan et al., 2001). Plusieurs explications non exclusives peuvent être envisagées. D'une part, ces cellules T CD4+CD25^{hi}, issues du thymus (Fehervari and Sakaguchi, 2004), peuvent avoir une homéostasie très lente comme les lymphocytes T CD4+ à cause de l'involution thymique observée chez l'adulte (Aspinall and Andrew, 2000). D'autre part, du fait de leur anergie vis-à-vis d'une stimulation polyclonale ou antigénique (Baecher-Allan et al., 2001), les lymphocytes T CD4+CD25^{hi} peuvent être incapables de subir une prolifération homéostatique. Toutefois, divers travaux ont montré que les cellules T CD4+CD25+ régulatrices pouvaient proliférer et gardaient leur capacité suppressive dans un environnement lymphopénique (Gavin et al., 2002; Wu et al., 2004). Enfin, les inhibiteurs de calcineurine peuvent bloquer la synthèse d'IL2 (Metcalf et al., 1994), cytokine indispensable à leur prolifération (Setoguchi et al., 2005). Contrairement à certaines études *in vitro* (Dong et al., 2001; Karagiannidis et al., 2004), aucune influence des corticostéroïdes (pendant le traitement ou après l'arrêt) sur l'homéostasie des lymphocytes T CD4+CD25^{hi} ou sur l'expression de gènes associés aux cellules régulatrices (FOXP3, GITR, CTLA4, TGF β , IL10...) n'a été observée chez les patients greffés rénaux. Malgré cette profonde déplétion des lymphocytes T CD4+CD25^{hi} chez tous les patients, un seul rejet aigu n'a été observé, suggérant que le nombre de cellules T CD4+CD25^{hi} ne semble pas critique pour la survie du greffon.

Si les profils d'expression transcriptionnelle n'ont pas permis de trouver des gènes associés à la tolérance augmentés chez les patients dépourvus de stéroïdes, 19 gènes sont, néanmoins, significativement sous-exprimés chez ces patients. Parmi eux, quatre font partie de la voie de signalisation intracellulaire dépendante du TCR : ZAP70, CD3 ζ , Fra1 and PI3K, suggérant une activation lymphocytaire T moins importante chez les patients qui n'ont pas reçu de corticostéroïdes. Toutefois, cette signature faible, de même que les analyses prédictives, ne permettent pas de différencier entre les deux stratégies de minimisation des stéroïdes. Afin de connaître l'implication d'autres critères comme l'âge des receveurs, leur sexe ou encore les infections virales, une analyse multiparamétrique sera réalisée.

En conclusion, bien que les deux stratégies (« avoidance » et « withdrawal ») n'influencent pas la survie du greffon (créatinémie, protéinurie) et l'homéostasie des différentes populations lymphocytaires (au moins jusqu'à deux ans après la transplantation), les différents profils d'expression transcriptionnelle à 1 an encouragent à un suivi clinique plus long de ces patients (et de tous ceux inclus dans l'étude) pour déceler d'éventuels signes de rejet chronique tardif.

Bibliographie

Abouna, G. M., al-Abdullah, I. H., Kelly-Sullivan, D., Kumar, M. S., Loose, J., Phillips, K., Yost, S., and Seirka, D. (1995). Randomized clinical trial of antithymocyte globulin induction in renal transplantation comparing a fixed daily dose with dose adjustment according to T cell monitoring. *Transplantation* 59, 1564-1568.

Accapezzato, D., Francavilla, V., Paroli, M., Casciaro, M., Chircu, L. V., Cividini, A., Abrignani, S., Mondelli, M. U., and Barnaba, V. (2004). Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 113, 963-972.

Adams, A. B., Shirasugi, N., Durham, M. M., Strobert, E., Anderson, D., Rees, P., Cowan, S., Xu, H., Blinder, Y., Cheung, M., et al. (2002). Calcineurin inhibitor-free CD28 blockade-based protocol protects allogeneic islets in nonhuman primates. *Diabetes* 51, 265-270.

Adams, A. B., Shirasugi, N., Jones, T. R., Durham, M. M., Strobert, E. A., Cowan, S., Rees, P., Hendrix, R., Price, K., Kenyon, N. S., et al. (2005). Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *J Immunol* 174, 542-550.

Aglas, F., Rainer, F., Lipp, R. W., Schnedl, W. J., Horn, S., and Egger, G. (1997). Effect of steroid treatment on the migration behaviour of neutrophils in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 17, 137-140.

Almawi, W. Y., Hess, D. A., Assi, J. W., Chudzik, D. M., and Rieder, M. J. (1999). Pretreatment with glucocorticoids enhances T-cell effector function: possible implication for immune rebound accompanying glucocorticoid withdrawal. *Cell Transplant* 8, 637-647.

Almawi, W. Y., and Melemedjian, O. K. (2002). Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 28, 69-78.

Anasetti, C., Tan, P., Hansen, J. A., and Martin, P. J. (1990). Induction of specific nonresponsiveness in unprimed human T cells by anti-CD3 antibody and alloantigen. *J Exp Med* 172, 1691-1700.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., and Romagnani, S. (2002). Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 196, 379-387.

Araki, M., Kondo, T., Gumperz, J. E., Brenner, M. B., Miyake, S., and Yamamura, T. (2003). Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 15, 279-288.

Ashwell, J. D., Lu, F. W., and Vacchio, M. S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol* 18, 309-345.

Aspinall, R., and Andrew, D. (2000). Thymic involution in aging. *J Clin Immunol* 20, 250-256.

Auchincloss, H., Jr., Lee, R., Shea, S., Markowitz, J. S., Grusby, M. J., and Glimcher, L. H. (1993). The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from

major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3373-3377.

Aukrust, P., Damas, J. K., and Solum, N. O. (2004). Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol* 43, 2326-2328.

Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270, 286-290.

Ayrolidi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., and Riccardi, C. (2001). Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98, 743-753.

Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., and Hirai, H. (2003). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 63, 4516-4520.

Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J. L., Parkman, R., Tovo, P. A., Abrams, J., de Waal Malefyt, R., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1994). High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 179, 493-502.

Bacchetta, R., Sartirana, C., Levings, M. K., Bordignon, C., Narula, S., and Roncarolo, M. G. (2002). Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 32, 2237-2245.

Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167, 1245-1253.

Balandina, A., Lecart, S., Darteville, P., Saoudi, A., and Berrih-Aknin, S. (2004). Functional defect of regulatory CD4+CD25+ T cells in the thymus of patients with autoimmune Myasthenia Gravis. *Blood*.

Balashov, K. E., Khoury, S. J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1995). Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 95, 2711-2719.

Barber, W. H., Mankin, J. A., Laskow, D. A., Deierhoi, M. H., Julian, B. A., Curtis, J. J., and Diethelm, A. G. (1991). Long-term results of a controlled prospective study with transfusion of donor-specific bone marrow in 57 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 51, 70-75.

Barrat, F. J., Cua, D. J., Boonstra, A., Richards, D. F., Crain, C., Savelkoul, H. F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R. L., Hawrylowicz, C. M., and O'Garra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195, 603-616.

Batuman, O. A., Ferrero, A., Cupp, C., Jimenez, S. A., and Khalili, K. (1995). Differential regulation of transforming growth factor beta-1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *J Immunol* 155, 4397-4405.

Batuman, O. A., Ferrero, A. P., Diaz, A., Berger, B., and Pomerantz, R. J. (1994). Glucocorticoid-mediated inhibition of interleukin-2 receptor alpha and -beta subunit expression by human T cells. *Immunopharmacology* 27, 43-55.

Baus, E., Andris, F., Dubois, P. M., Urbain, J., and Leo, O. (1996). Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signaling in activated T lymphocytes. *J Immunol* 156, 4555-4561.

Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851-857.

Benichou, G. (1999). Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 4, D476-480.

Ben-Nun, A., Wekerle, H., and Cohen, I. R. (1981). The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 11, 195-199.

Bentley, A. M., Hamid, Q., Robinson, D. S., Schotman, E., Meng, Q., Assoufi, B., Kay, A. B., and Durham, S. R. (1996). Prednisolone treatment in asthma. Reduction in the numbers of eosinophils, T cells, tryptase-only positive mast cells, and modulation of IL-4, IL-5, and interferon-gamma cytokine gene expression within the bronchial mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 551-556.

Besse, T., Malaise, J., Mourad, M., Pirson, Y., Hope, J., Awwad, M., White-Scharf, M., and Squifflet, J. P. (1997). Prevention of rejection with BTI-322 after renal transplantation (results at 9 months). *Transplant Proc* 29, 2425-2426.

Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M., and Koup, R. A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281, 65-78.

Bianchi, M., Meng, C., and Ivashkiv, L. B. (2000). Inhibition of IL-2-induced Jak-STAT signaling by glucocorticoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9573-9578.

Birkeland, S. A. (1975). A controlled clinical trial of treatment with ALG in established rejection of renal allografts. *Acta Med Scand* 198, 489-496.

Birkeland, S. A. (2001). Steroid-free immunosuppression in renal transplantation: a long-term follow-up of 100 consecutive patients. *Transplantation* 71, 1089-1090.

Birkeland, S. A., Bendtzen, K., Moller, B., Hamilton-Dutoit, S., and Andersen, H. K. (1999). Interleukin-10 and posttransplant lymphoproliferative disorder after kidney transplantation. *Transplantation* 67, 876-881.

Birkeland, S. A., and Munk-Andersen, G. (1975). Antibodies against equine ALG during treatment of rejection crisis after renal allotransplantation. *Scand J Immunol* 4, 369-372.

Bischof, F., and Melms, A. (1998). Glucocorticoids inhibit CD40 ligand expression of peripheral CD4+ lymphocytes. *Cell Immunol* 187, 38-44.

Bonnefoy-Berard, N., Genestier, L., Flacher, M., Rouault, J. P., Lizard, G., Mutin, M., and Revillard, J. P. (1994). Apoptosis induced by polyclonal antilymphocyte globulins in human B-cell lines. *Blood* 83, 1051-1059.

Bonnefoy-Berard, N., Verrier, B., Vincent, C., and Revillard, J. P. (1992). Inhibition of CD25 (IL-2R alpha) expression and T-cell proliferation by polyclonal anti-thymocyte globulins. *Immunology* 77, 61-67.

Bonnefoy-Berard, N., Vincent, C., and Revillard, J. P. (1991). Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 51, 669-673.

Bonneville, M., Carcagne, J., Vie, H., Moreau, J. F., Chevalier, S., Latour, M., Carosella, E., and Souillou, J. P. (1989). Polyclonal rabbit gamma globulins against a human cytotoxic CD4+ T cell clone. I. Clone characteristics and antiblast globulin preparation. *Transplantation* 48, 253-260.

Boulday, G., Ashton-Chess, J., Bernard, P., Karam, G., Vie, H., Moreau, A., Minault, D., Lorre, K., Souillou, J. P., and Blancho, G. (2004). Association of rapamycin and co-stimulation blockade using anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Nephrol Dial Transplant* 19, 1752-1760.

Boumpas, D. T., Anastassiou, E. D., Older, S. A., Tsokos, G. C., Nelson, D. L., and Balow, J. E. (1991). Dexamethasone inhibits human interleukin 2 but not interleukin 2 receptor gene expression in vitro at the level of nuclear transcription. *J Clin Invest* 87, 1739-1747.

Bourdage, J. S., and Hamlin, D. M. (1995). Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 59, 1194-1200.

Brennan, D. C., Flavin, K., Lowell, J. A., Howard, T. K., Shenoy, S., Burgess, S., Dolan, S., Kano, J. M., Mahon, M., Schnitzler, M. A., et al. (1999). A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. *Transplantation* 67, 1011-1018.

Brokaw, J. J., White, G. W., Baluk, P., Anderson, G. P., Umemoto, E. Y., and McDonald, D. M. (1998). Glucocorticoid-induced apoptosis of dendritic cells in the rat tracheal mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 598-605.

Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19, 375-396.

Brown, M. D., Wick, T. M., and Eckman, J. R. (2001). Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatr Pathol Mol Med* 20, 47-72.

Bugeon, L., Cuturi, M. C., Hallet, M. M., Paineau, J., Chabannes, D., and Souillou, J. P. (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, 219-225.

Bugeon, L., Cuturi, M. C., Paineau, J., Anegon, I., and Souillou, J. P. (1993). Similar levels of granzyme A and perforin mRNA expression in rejected and tolerated heart allografts in donor-specific tolerance in rats. *Transplantation* 56, 405-408.

Burlingham, W. J., Grailer, A. P., Fechner, J. H., Jr., Kusaka, S., Trucco, M., Kocova, M., Belzer, F. O., and Sollinger, H. W. (1995). Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 59, 1147-1155.

Calne, R., Friend, P., Moffatt, S., Bradley, A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K., and Waldmann, H. (1998). Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* 351, 1701-1702.

Calne, R. Y., Sells, R. A., Pena, J. R., Davis, D. R., Millard, P. R., Herbertson, B. M., Binns, R. M., and Davies, D. A. (1969). Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472-476.

Camara, N. O., Sebille, F., and Lechler, R. I. (2003). Human CD4⁺CD25⁺ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8⁺ T cell activation. *Eur J Immunol* 33, 3473-3483.

Campos-Martin, Y., Gomez del Moral, M., Gozalbo-Lopez, B., Suela, J., and Martinez-Naves, E. (2004). Expression of human CD1d molecules protects target cells from NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 172, 7297-7305.

Cantarovich, D., Giral-Classe, M., Hourmant, M., Dantal, J., Blancho, G., Karam, G., and Soulillou, J. P. (2000a). Low incidence of kidney rejection after simultaneous kidney-pancreas transplantation after antithymocyte globulin induction and in the absence of corticosteroids: results of a prospective pilot study in 28 consecutive cases. *Transplantation* 69, 1505-1508.

Cantarovich, D., Giral-Classe, M., Hourmant, M., Dantal, J., Blancho, G., Lerat, L., Moreau, A., and Soulillou, J. P. (2000b). Prevention of acute rejection with antithymocyte globulin, avoiding corticosteroids, and delaying cyclosporin after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 15, 1673-1676.

Cantarovich, D., Hourmant, M., Dantal, J., Giral, M., Paineau, J., Karam, G., and Soulillou, J. P. (1994). OKT3 first-line treatment of acute rejection episodes following combined pancreas and kidney transplantation. *Transplant Proc* 26, 549.

Cantarovich, D., Karam, G., Giral-Classe, M., Hourmant, M., Dantal, J., Blancho, G., Le Normand, L., and Soulillou, J. P. (1998). Randomized comparison of triple therapy and antithymocyte globulin induction treatment after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Kidney Int* 54, 1351-1356.

Cantarovich, D., Karam, G., Hourmant, M., Dantal, J., Blancho, G., Giral, M., and Soulillou, J. P. (in press). Steroid avoidance versus steroid withdrawal after simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Am J Transplant*.

Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., and Bendelac, A. (1999). Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 163, 4647-4650.

Cavani, A., Nasorri, F., Ottaviani, C., Sebastiani, S., De Pita, O., and Girolomoni, G. (2003). Human CD25⁺ regulatory T cells maintain immune tolerance to nickel in healthy, nonallergic individuals. *J Immunol* 171, 5760-5768.

Cavani, A., Nasorri, F., Prezzi, C., Sebastiani, S., Albanesi, C., and Girolomoni, G. (2000). Human CD4⁺ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* 114, 295-302.

Celada, A., and Maki, R. A. (1991). IFN-gamma induces the expression of the genes for MHC class II I-A beta and tumor necrosis factor through a protein kinase C-independent pathway. *J Immunol* 146, 114-120.

Chakrabarti, P., Wong, H. Y., Scantlebury, V. P., Jordan, M. L., Vivas, C., Ellis, D., Lombardo-Lane, S., Hakala, T. R., Fung, J. J., Simmons, R. L., et al. (2000). Outcome after steroid withdrawal in pediatric renal transplant patients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 70, 760-764.

Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., and Suci-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3, 237-243.

Chavin, K. D., Qin, L., Lin, J., Yagita, H., and Bromberg, J. S. (1993). Combined anti-CD2 and anti-CD3 receptor monoclonal antibodies induce donor-specific tolerance in a cardiac transplant model. *J Immunol* 151, 7249-7259.

Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J. J., and Howard, O. M. (2004). Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 34, 859-869.

Chiffolleau, E., Beriou, G., Dutartre, P., Usal, C., Soulillou, J. P., and Cuturi, M. C. (2002). Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2, 745-757.

Cho, S. I., Bradley, J. W., Carpenter, C. B., Cosimi, A. B., and Monaco, A. P. (1983). Antithymocyte globulin, pretransplant blood transfusion, and tissue typing in cadaver kidney transplantation. *Am J Surg* 145, 464-471.

Choi, B. M., Pae, H. O., Jeong, Y. R., Kim, Y. M., and Chung, H. T. (2005). Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 1066-1071.

Christensen, L. L., Grunnet, N., Rudiger, N., Moller, B., and Birkeland, S. A. (1998). Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 51, 637-644.

Citterio, F. (2001). Steroid side effects and their impact on transplantation outcome. *Transplantation* 72, S75-80.

Ciubotariu, R., Colovai, A. I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998a). Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells. *J Immunol* 161, 5193-5202.

Ciubotariu, R., Liu, Z., Colovai, A. I., Ho, E., Itescu, S., Ravalli, S., Hardy, M. A., Cortesini, R., Rose, E. A., and Suci-Foca, N. (1998b). Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection of organ allografts. *J Clin Invest* 101, 398-405.

Cohen, I. R., Quintana, F. J., and Mimran, A. (2004). Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation. *J Clin Invest* 114, 1227-1232.

Colombatti, A., Doliana, R., Schiappacassi, M., Argentini, C., Tonutti, E., Feruglio, C., and Sala, P. (1998). Age-related persistent clonal expansions of CD28⁻ cells: phenotypic and molecular TCR analysis reveals both CD4⁺ and CD4⁺CD8⁺ cells with identical CDR3 sequences. *Clin Immunol Immunopathol* 89, 61-70.

Colovai, A. I., Mirza, M., Vlad, G., Wang, S., Ho, E., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2003). Regulatory CD8⁺CD28⁻ T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64, 31-37.

Contreras, J. L., Jenkins, S., Eckhoff, D. E., Hubbard, W. J., Lobashevsky, A., Bilbao, G., Thomas, F. T., Neville, D. M., Jr., and Thomas, J. M. (2003). Stable alpha- and beta-islet cell function after tolerance induction to pancreatic islet allografts in diabetic primates. *Am J Transplant* 3, 128-138.

Corbascio, M., Ekstrand, H., Osterholm, C., Qi, Z., Simanaitis, M., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Riesbeck, K., and Ekberg, H. (2002). CTLA4Ig combined with anti-LFA-1 prolongs cardiac allograft survival indefinitely. *Transpl Immunol* 10, 55-61.

Correale, J., Rojany, M., and Weiner, L. P. (1997). Human CD8+ TCR-alpha beta(+) and TCR-gamma delta(+) cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific CD4+ T-cells by different mechanisms. *J Neuroimmunol* 80, 47-64.

Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2004). The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol* 13, 101-104.

Cosimi, A. B., Delmonico, F. L., Wright, J. K., Wee, S. L., Preffer, F. I., Jolliffe, L. K., and Colvin, R. B. (1990). Prolonged survival of nonhuman primate renal allograft recipients treated only with anti-CD4 monoclonal antibody. *Surgery* 108, 406-413; discussion 413-404.

Cosimi, A. B., and Sachs, D. H. (2004). Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 77, 943-946.

Cottrez, F., and Groux, H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 77, S12-15.

Cox, G. (1995). Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154, 4719-4725.

Croft, M., Bradley, L. M., and Swain, S. L. (1994). Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 152, 2675-2685.

Cronstein, B. N., Kimmel, S. C., Levin, R. I., Martiniuk, F., and Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 9991-9995.

Crowe, N. Y., Smyth, M. J., and Godfrey, D. I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 196, 119-127.

D'Ambrosio, D., Iellem, A., Bonecchi, R., Mazzeo, D., Sozzani, S., Mantovani, A., and Sinigaglia, F. (1998). Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 161, 5111-5115.

Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blanche, G., Dreno, B., and Soulillou, J. P. (1998). Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351, 623-628.

Dantal, J., Ninin, E., Hourmant, M., Boeffard, F., Cantarovich, D., Giral, M., Wijdenes, J., Soulillou, J. P., and Le Mauff, B. (1996). Anti-CD4 MoAb therapy in kidney transplantation--a pilot study in early prophylaxis of rejection. *Transplantation* 62, 1502-1506.

Darrasse-Jeze, G., Marodon, G., Salomon, B. L., Catala, M., and Klatzmann, D. (2005). Ontogeny of CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells in human fetus. *Blood*.

Dayyani, F., Belge, K. U., Frankenberger, M., Mack, M., Berki, T., and Ziegler-Heitbrock, L. (2003). Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol* 74, 33-39.

De Bosscher, K., Schmitz, M. L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., and Haegeman, G. (1997). Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13504-13509.

de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., and Kapsenberg, M. L. (1999). Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol* 66, 201-204.

Dedrick, R. L., Walicke, P., and Garovoy, M. (2002). Anti-adhesion antibodies efalizumab, a humanized anti-CD11a monoclonal antibody. *Transpl Immunol* 9, 181-186.

Deeg, H. J., Loughran, T. P., Jr., Storb, R., Kennedy, M. S., Sullivan, K. M., Doney, K., Appelbaum, F. R., and Thomas, E. D. (1985). Treatment of human acute graft-versus-host disease with antithymocyte globulin and cyclosporine with or without methylprednisolone. *Transplantation* 40, 162-166.

Dehoux, J. P., Talpe, S., Dewolf, N., Otsuka, M., Oike, F., Jamar, F., de la Parra, B., Latinne, D., Bazin, H., and Gianello, P. (2000). Effects on human and nonhuman primate immune response of a new rat anti-CD2 monoclonal antibody. *Transplantation* 69, 2622-2633.

Dennis, G. J., Mizuguchi, J., McMillan, V., Finkelman, F. D., Ohara, J., and Mond, J. J. (1987). Comparison of the calcium requirement for the induction and maintenance of B cell class II molecule expression and for B cell proliferation stimulated by mitogens and purified growth factors. *J Immunol* 138, 4307-4312.

Devlin, J., Doherty, D., Thomson, L., Wong, T., Donaldson, P., Portmann, B., and Williams, R. (1998). Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 27, 926-933.

Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193, 233-238.

Diaconescu, R., Flowers, C. R., Storer, B., Sorrow, M. L., Maris, M. B., Maloney, D. G., Sandmaier, B. M., and Storb, R. (2004). Morbidity and mortality with nonmyeloablative compared with myeloablative conditioning before hematopoietic cell transplantation from HLA-matched related donors. *Blood* 104, 1550-1558.

Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193, 1303-1310.

Diegel, M. L., Nadler, S. G., and Kiener, P. A. (2002). In vivo administration of 15-deoxyspergulin inhibits antigen-presenting cell stimulation of T cells and NF-kappaB activation. *Int Immunopharmacol* 2, 1451-1464.

Duijvestijn, A. M., Derhaag, J. G., and van Breda Vriesman, P. J. (2000). Complement activation by anti-endothelial cell antibodies in MHC-mismatched and MHC-matched heart allograft rejection: anti-MHC-, but not anti non-MHC alloantibodies are effective in complement activation. *Transpl Int* 13, 363-371.

Djamali, A., Turc-Baron, C., Portales, P., Levenson, G., Chong, G., Clot, J., and Mourad, G. (2000). Low dose antithymocyte globulins in renal transplantation: daily versus intermittent administration based on T-cell monitoring. *Transplantation* 69, 799-805.

Donahoo, W. T., Kosmiski, L. A., and Eckel, R. H. (1998). Drugs causing dyslipoproteinemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27, 677-697.

Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H., and Flavell, R. A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97-101.

Druilhe, A., Letuve, S., and Pretolani, M. (2003). Glucocorticoid-induced apoptosis in human eosinophils: mechanisms of action. *Apoptosis* 8, 481-495.

Dubernard, J. M., Rifle, G., Bonneau, M., Touraine, J. L., Revillard, J. P., and Traeger, J. (1974). Antimacaque thymocyte globulins. Toxicity and immunodepressive effect in the human species. *Transplantation* 18, 71-74.

Dubey, S., Srivastava, A., and Nityanand, S. (2002). Induction of apoptosis of peripheral blood mononuclear cells by antithymocyte globulin (ATG) in aplastic anemia: an in vivo and in vitro study. *Ann Hematol* 81, 249-253.

Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A., and Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF α therapy. *J Exp Med* 200, 277-285.

Eiermann, T. H., Freitag, S., Cortes-Dericks, L., Sahm, H., and Zander, A. R. (2001). Jurkat cell-reactive anti-thymocyte globulin assessed ex vivo by flow cytometry persists three weeks in circulation. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 385-390.

Ellis, C. N., and Krueger, G. G. (2001). Treatment of chronic plaque psoriasis by selective targeting of memory effector T lymphocytes. *N Engl J Med* 345, 248-255.

Elsner, J., Hochstetter, R., Spiekermann, K., and Kapp, A. (1996). Surface and mRNA expression of the CD52 antigen by human eosinophils but not by neutrophils. *Blood* 88, 4684-4693.

Elster, E. A., Hale, D. A., Mannon, R. B., Cendales, L. C., Swanson, S. J., and Kirk, A. D. (2004). The road to tolerance: renal transplant tolerance induction in nonhuman primate studies and clinical trials. *Transpl Immunol* 13, 87-99.

Emilie, D., Crevon, M. C., Auffredou, M. T., and Galanaud, P. (1988). Glucocorticosteroid-dependent synergy between interleukin 1 and interleukin 6 for human B lymphocyte differentiation. *Eur J Immunol* 18, 2043-2047.

Epperson, D. E., and Pober, J. S. (1994). Antigen-presenting function of human endothelial cells. Direct activation of resting CD8 T cells. *J Immunol* 153, 5402-5412.

Falcini, F., Taccetti, G., Trapani, S., Tafi, L., and Volpi, M. (1991). Growth retardation in juvenile chronic arthritis patients treated with steroids. *Clin Exp Rheumatol* 9 Suppl 6, 37-40.

Fang, L., Fehse, B., Engel, M., Zander, A., and Kroger, N. (2005). Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* 79, 369-371.

Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2004). Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16, 203-208.

Feinberg, M. B., and Silvestri, G. (2002). T(S) cells and immune tolerance induction: a regulatory renaissance? *Nat Immunol* 3, 215-217.

Fiche, M., Soullou, J. P., Bignon, J. D., Billaudel, S., and Guenel, J. (1984). T lymphocyte monitoring in kidney transplant recipients undergoing cytomegalovirus infection or rejection episodes. *Transplantation* 37, 421-423.

Filaci, G., Bacileri, S., Fravega, M., Monetti, M., Contini, P., Ghio, M., Setti, M., Puppo, F., and Indiveri, F. (2001). Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166, 6452-6457.

Filaci, G., Fravega, M., Negrini, S., Procopio, F., Fenoglio, D., Rizzi, M., Brenchi, S., Contini, P., Olive, D., Ghio, M., et al. (2004). Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum Immunol* 65, 142-156.

Filaci, G., and Suci-Foca, N. (2002). CD8+ T suppressor cells are back to the game: are they players in autoimmunity? *Autoimmun Rev* 1, 279-283.

Fischer, T., Schobel, H., and Barenbrock, M. (1996). Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 70, 217-219.

Fournel, S., Genestier, L., Robinet, E., Flacher, M., and Revillard, J. P. (1996). Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 157, 4309-4315.

Franchimont, D., Galon, J., Vacchio, M. S., Fan, S., Visconti, R., Frucht, D. M., Geenen, V., Chrousos, G. P., Ashwell, J. D., and O'Shea, J. J. (2002). Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J Immunol* 168, 2212-2218.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., et al. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-1034.

Fujii, T., Ushiyama, N., Hosonuma, K., Suenaga, A., and Kawashima, K. (2002). Effects of human antithymocyte globulin on acetylcholine synthesis, its release and choline acetyltransferase transcription in a human leukemic T-cell line. *J Neuroimmunol* 128, 1-8.

Fukaura, H., Kent, S. C., Pietrusewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., and Hafler, D. A. (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, 70-77.

Gaber, A. O., First, M. R., Tesi, R. J., Gaston, R. S., Mendez, R., Mulloy, L. L., Light, J. A., Gaber, L. W., Squiers, E., Taylor, R. J., et al. (1998). Results of the double-blind, randomized, multicenter, phase III clinical trial of Thymoglobulin versus Atgam in the treatment of acute graft rejection episodes after renal transplantation. *Transplantation* 66, 29-37.

Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P., and Abrignani, S. (2003). CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 197, 1051-1057.

- Game, D. S., Hernandez-Fuentes, M. P., Chaudhry, A. N., and Lechler, R. I. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 14, 1652-1661.
- Gansuud, B., Hubbard, W. J., Hutchings, A., Thomas, F. T., Goodwin, J., Wilson, S. B., Exley, M. A., and Thomas, J. M. (2003). Phenotypic and functional characterization of long-term cultured rhesus macaque spleen-derived NKT cells. *J Immunol* 171, 2904-2911.
- Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.
- Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 194, 1711-1719.
- Geissler, F., Jankowska-Gan, E., DeVito-Haynes, L. D., Rhein, T., Kalayoglu, M., Sollinger, H. W., and Burlingham, W. J. (2001). Human liver allograft acceptance and the "tolerance assay": in vitro anti-donor T cell assays show hyporeactivity to donor cells, but unlike DTH, fail to detect linked suppression. *Transplantation* 72, 571-580.
- Genestier, L., Fournel, S., Flacher, M., Assossou, O., Revillard, J. P., and Bonnefoy-Berard, N. (1998). Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 91, 2360-2368.
- Ghezzi, P., and Sipe, J. D. (1988). Dexamethasone modulation of LPS, IL-1, and TNF stimulated serum amyloid A synthesis in mice. *Lymphokine Res* 7, 157-166.
- Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F. H., Malchow, H. A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnaek, P., Zadorova, Z., Palmer, T., and Donoghue, S. (2003). Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 348, 24-32.
- Gilliet, M., and Liu, Y. J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195, 695-704.
- Giral, M., Nguyen, J. M., Karam, G., Kessler, M., de Ligny, B. H., Buchler, M., Bayle, F., Meyer, C., Foucher, Y., Martin, M. L., et al. (2005). Impact of graft mass on the clinical outcome of kidney transplants. *J Am Soc Nephrol* 16, 261-268.
- Giral-Classe, M., Hourmant, M., Cantarovich, D., Dantal, J., Blancho, G., Daguin, P., Ancelet, D., and Soulillou, J. P. (1998). Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int* 54, 972-978.
- Godfrey, D. I., Hammond, K. J., Poulton, L. D., Smyth, M. J., and Baxter, A. G. (2000). NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21, 573-583.
- Godfrey, W. R., Spoden, D. J., Ge, Y. G., Baker, S. R., Liu, B., Levine, B. L., June, C. H., Blazar, B. R., and Porter, S. B. (2004). Cord blood CD4+CD25+ derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*.
- Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192, 557-564.
- Goldstein, C., Reiss, G. R., Mohiuddin, M., Shen, Z., Yokoyama, H., and DiSesa, V. J. (1996). Tolerance to cardiac allografts requires a time lag between intrathymic treatment and transplantation. *J Surg Res* 63, 83-85.

Goldstein, D. R., Tesar, B. M., Akira, S., and Lakkis, F. G. (2003). Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 111, 1571-1578.

Gotoh, M., Porter, J., Monaco, A. P., and Maki, T. (1988). Induction of antigen-specific unresponsiveness to pancreatic islet allografts by antilymphocyte serum. *Transplantation* 45, 429-433.

Gottlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 76, 480-489.

Grattan, C. E., Dawn, G., Gibbs, S., and Francis, D. M. (2003). Blood basophil numbers in chronic ordinary urticaria and healthy controls: diurnal variation, influence of loratadine and prednisolone and relationship to disease activity. *Clin Exp Allergy* 33, 337-341.

Gray, J. G., Monaco, A. P., and Russell, P. S. (1964). Heterologous Mouse Anti-Lymphocyte Serum to Prolong Skin Homografts. *Surg Forum* 15, 142-144.

Grindebacke, H., Wing, K., Andersson, A. C., Suri-Payer, E., Rak, S., and Rudin, A. (2004). Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 34, 1364-1372.

Grinyo, J. M., Gil-Vernet, S., Seron, D., Cruzado, J. M., Moreso, F., Fulladosa, X., Castela, A. M., Torras, J., Hooftman, L., and Alsina, J. (1997). Steroid withdrawal in mycophenolate mofetil-treated renal allograft recipients. *Transplantation* 63, 1688-1690.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742.

Guillot, C., Mathieu, P., Coathalem, H., Le Mauff, B., Castro, M. G., Tesson, L., Usal, C., Laumonier, T., Brouard, S., Souillou, J. P., et al. (2000). Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4Ig expression. *J Immunol* 164, 5258-5268.

Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. (2001). CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol* 13, 471-478.

Hale, G., Xia, M. Q., Tighe, H. P., Dyer, M. J., and Waldmann, H. (1990). The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue Antigens* 35, 118-127.

Hayamizu, K., Zeng, D., Huie, P., Garcia-Ojeda, M. E., Bloch, D. A., Fong, L., Engleman, E. G., Sibley, R. K., and Strober, S. (1998). Donor blood monocytes but not T or B cells facilitate long-term allograft survival after total lymphoid irradiation. *Transplantation* 66, 585-593.

Hayamizu, K., Zeng, D., and Strober, S. (1999). Donor cells that facilitate tolerance to rat heart allografts after posttransplant total lymphoid irradiation and rabbit anti-thymocyte globulin. *Transplant Proc* 31, 25S-26S.

Hebart, H., Ehninger, G., Schmidt, H., Berner, B., Reuss-Borst, M., Waller, H. D., Muller, C. A., and Einsele, H. (1995). Treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation with anti-CD3/TCR monoclonal antibodies. *Bone Marrow Transplant* 15, 891-894.

Heck, S., Bender, K., Kullmann, M., Gottlicher, M., Herrlich, P., and Cato, A. C. (1997). I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J* 16, 4698-4707.

Heidenreich, S., Weyers, M., Gong, J. H., Sprenger, H., Nain, M., and Gemsa, D. (1988). Potentiation of lymphokine-induced macrophage activation by tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 140, 1511-1518.

Heimbürger, M., Larfars, G., and Bratt, J. (2000). Prednisolone inhibits cytokine-induced adhesive and cytotoxic interactions between endothelial cells and neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 119, 441-448.

Hellings, N., Raus, J., and Stinissen, P. (2004). T-cell vaccination in multiple sclerosis: update on clinical application and mode of action. *Autoimmun Rev* 3, 267-275.

Henech, P., Kendall, E., Slocumb, C., and Polley, H. (1950). Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Arch Int Med* 85, 545-566.

Henry, M. L., Pelletier, R. P., Elkhammas, E. A., Bumgardner, G. L., Davies, E. A., and Ferguson, R. M. (2001). A randomized prospective trial of OKT3 induction in the current immunosuppression era. *Clin Transplant* 15, 410-414.

Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Ochoa, F. S., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., and Lechler, R. I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 173, 4828-4837.

Higuchi, M., Zeng, D., Shizuru, J., Gworek, J., Dejbakhsh-Jones, S., Taniguchi, M., and Strober, S. (2002). Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion. *J Immunol* 169, 5564-5570.

Ho, L. P., Urban, B. C., Jones, L., Ogg, G. S., and McMichael, A. J. (2004). CD4(-)CD8alpha subset of CD1d-restricted NKT cells controls T cell expansion. *J Immunol* 172, 7350-7358.

Hojo, M., Morimoto, T., Maluccio, M., Asano, T., Morimoto, K., Lagman, M., Shimbo, T., and Suthanthiran, M. (1999). Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397, 530-534.

Horigome, A., Hirano, T., Oka, K., Takeuchi, H., Sakurai, E., Kozaki, K., Matsuno, N., Nagao, T., and Kozaki, M. (1997). Glucocorticoids and cyclosporine induce apoptosis in mitogen-activated human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology* 37, 87-94.

Hourmant, M., Bedrossian, J., Durand, D., Lebranchu, Y., Renoult, E., Caudrelier, P., Buffet, R., and Souillou, J. P. (1996). A randomized multicenter trial comparing leukocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody with rabbit antithymocyte globulin as induction treatment in first kidney transplantations. *Transplantation* 62, 1565-1570.

Hourmant, M., Buzelin, F., Dubigeon, P., and Souillou, J. P. (1987). High long-term graft survival rates in kidney transplantation with the sequential association of antithymocyte globulin and cyclosporine A monotherapy. *Transplant Proc* 19, 2113-2114.

Hourmant, M., Le Mauff, B., Cantarovich, D., Dantal, J., Baatard, R., Denis, M., Jacques, Y., Karam, G., and Souillou, J. P. (1994). Prevention of acute rejection episodes with an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody. II. Results after a second kidney transplantation. *Transplantation* 57, 204-207.

Hu, X., Li, W. P., Meng, C., and Ivashkiv, L. B. (2003). Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 170, 4833-4839.

Hutchings, A., Wu, J., Asiedu, C., Hubbard, W., Eckhoff, D., Contreras, J., Thomas, F. T., Neville, D., and Thomas, J. M. (2003). The immune decision toward allograft tolerance in non-human primates requires early inhibition of innate immunity and induction of immune regulation. *Transpl Immunol* 11, 335-344.

Illem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. (2001). Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194, 847-853.

Illes, Z., Kondo, T., Newcombe, J., Oka, N., Tabira, T., and Yamamura, T. (2000). Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 164, 4375-4381.

Imai, E., Miner, J. N., Mitchell, J. A., Yamamoto, K. R., and Granner, D. K. (1993). Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* 268, 5353-5356.

Ishida-Takahashi, R., Uotani, S., Abe, T., Degawa-Yamauchi, M., Fukushima, T., Fujita, N., Sakamaki, H., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., and Eguchi, K. (2004). Rapid inhibition of leptin signaling by glucocorticoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 279, 19658-19664.

Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., and Ihara, A. (1992). Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255, 1125-1127.

Janssens, S., and Decramer, M. (1989). Corticosteroid-induced myopathy and the respiratory muscles. Report of two cases. *Chest* 95, 1160-1162.

Jiang, H., and Chess, L. (2000). The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu Rev Immunol* 18, 185-216.

Jiang, S., Camara, N., Lombardi, G., and Lechler, R. I. (2003). Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood* 102, 2180-2186.

Jiang, S., Tugulea, S., Pennesi, G., Liu, Z., Mulder, A., Lederman, S., Harris, P., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum Immunol* 59, 690-699.

Jin, Y., Fuller, L., Carreno, M., Esquenazi, V., Blomberg, B. B., Wei, Y. T., Ciancio, G., Burke, G. W., 3rd, Tzakis, A., Ricordi, C., and Miller, J. (2002). Functional and phenotypic properties of peripheral T cells anergized by autologous CD3(+) depleted bone marrow cells. *Hum Immunol* 63, 567-575.

Jin, Y., Fuller, L., Wei, Y., Blomberg, B. B., Miller, J., and Esquenazi, V. (2000). Bone marrow cells promote TH2 polarization and inhibit virus-specific CTL generation. *Hum Immunol* 61, 1233-1241.

Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

Jonker, M., Ringers, J., Ossevoort, M. A., Slingerland, W., van den Hout, Y., Haanstra, K., Wubben, J., Kuhn, E., Friend, P., and Calne, R. (2002). Long-term kidney graft survival by delayed T cell ablative treatment in rhesus monkeys. *Transplantation* 73, 874-880.

Jonker, M., van den Hout, Y., Noort, R. C., Versteeg-van der Voort Maarschalk, M. F., Claas, F. H., Woude, F. J., Hollander, D., Perico, N., and Remuzzi, G. (2001). Immunomodulation by intrathymic injection of donor leukocytes in rhesus monkeys. *Transplantation* 72, 1432-1436.

Jonuleit, H., and Schmitt, E. (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171, 6323-6327.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A. H. (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196, 255-260.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2, 301-306.

Kaech, S. M., Tan, J. T., Wherry, E. J., Konieczny, B. T., Surh, C. D., and Ahmed, R. (2003). Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4, 1191-1198.

Kaiser, B. A., Palmer, J. A., Dunn, S. P., Mochon, M. A., Bartosh, S. M., Schulman, S. L., Polinsky, M. S., and Baluarte, H. J. (1991). Antimouse antibody response after OKT3 administration for steroid resistant rejection. *Child Nephrol Urol* 11, 190-192.

Kampinga, J., Nieuwenhuis, P., Roser, B., and Aspinall, R. (1990). Differences in turnover between thymic medullary dendritic cells and a subset of cortical macrophages. *J Immunol* 145, 1659-1663.

Kaplon, R. J., Hochman, P. S., Michler, R. E., Kwiatkowski, P. A., Edwards, N. M., Berger, C. L., Xu, H., Meier, W., Wallner, B. P., Chisholm, P., and Marboe, C. C. (1996). Short course single agent therapy with an LFA-3-IgG1 fusion protein prolongs primate cardiac allograft survival. *Transplantation* 61, 356-363.

Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N. J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P. Y., Menz, G., Akdis, C. A., Blaser, K., and Schmidt-Weber, C. B. (2004). Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114, 1425-1433.

Kawai, T., Cosimi, A. B., Wee, S. L., Houser, S., Andrews, D., Sogawa, H., Phelan, J., Boskovic, S., Nadazdin, O., Abrahamian, G., et al. (2002). Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 73, 1757-1764.

Kawai, T., Sogawa, H., Boskovic, S., Abrahamian, G., Smith, R. N., Wee, S. L., Andrews, D., Nadazdin, O., Koyama, I., Sykes, M., et al. (2004). CD154 blockade for induction of mixed chimerism and prolonged renal allograft survival in nonhuman primates. *Am J Transplant* 4, 1391-1398.

Kawai, T., Sogawa, H., Koulmanda, M., Smith, R. N., O'Neil, J. J., Wee, S. L., Boskovic, S., Sykes, M., Colvin, R. B., Sachs, D. H., et al. (2001). Long-term islet allograft function in the absence of chronic immunosuppression: a case report of a nonhuman

primate previously made tolerant to a renal allograft from the same donor. *Transplantation* 72, 351-354.

Kawai, T., Wee, S. L., Bazin, H., Latinne, D., Phelan, J., Boskovic, S., Ko, D. S., Hong, H. Z., Mauiyyedi, S., Nadazdin, O., et al. (2000). Association of natural killer cell depletion with induction of mixed chimerism and allograft tolerance in non-human primates. *Transplantation* 70, 368-374.

Kemper, C., Chan, A. C., Green, J. M., Brett, K. A., Murphy, K. M., and Atkinson, J. P. (2003). Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421, 388-392.

Kendall, E., Masson, H., McKenzie, B., Myers, C., and Koelsche, G. (1934). Isolation in crystalline form of the hormone essential to life from the suprarenal cortex; its chemical nature and physiologic properties. *Proc Mayo Clin* 9, 245-250.

Kilgore, K. S., Flory, C. M., Miller, B. F., Evans, V. M., and Warren, J. S. (1996). The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 149, 953-961.

Kingsley, C. I., Karim, M., Bushell, A. R., and Wood, K. J. (2002). CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168, 1080-1086.

Kirk, A. D., Burkly, L. C., Batty, D. S., Baumgartner, R. E., Berning, J. D., Buchanan, K., Fechner, J. H., Jr., Germond, R. L., Kampen, R. L., Patterson, N. B., et al. (1999). Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 5, 686-693.

Kirk, A. D., Hale, D. A., Mannon, R. B., Kleiner, D. E., Hoffmann, S. C., Kampen, R. L., Cendales, L. K., Tadaki, D. K., Harlan, D. M., and Swanson, S. J. (2003). Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation* 76, 120-129.

Kirk, A. D., Harlan, D. M., Armstrong, N. N., Davis, T. A., Dong, Y., Gray, G. S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J. H., Jr., and Knechtle, S. J. (1997). CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8789-8794.

Kitani, A., Chua, K., Nakamura, K., and Strober, W. (2000). Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 165, 691-702.

Kivity, S., Onn, A., Agami, O., and Fireman, E. (1997). The in vitro and in vivo effect of corticosteroids on basophil releasability in patients with mild and severe bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 27, 909-914.

Klaus, G., Mostert, K., Reckzeh, B., and Mueller, T. F. (2003). Phenotypic changes in lymphocyte subpopulations in pediatric renal-transplant patients after T-cell depletion. *Transplantation* 76, 1719-1724.

Kline, G. M., Shen, Z., Mohiuddin, M., Ruggiero, V., Rostami, S., and DiSesa, V. J. (1993). Successful experimental heart transplantation without immunosuppressive drugs. *J Heart Lung Transplant* 12, 388-393.

Knechtle, S. J., and Burlingham, W. J. (2004). Metastable tolerance in nonhuman primates and humans. *Transplantation* 77, 936-939.

Knechtle, S. J., Fechner, J. H., Jr., Dong, Y., Stavrou, S., Neville, D. M., Jr., Oberley, T., Buckley, P., Armstrong, N., Rusterholz, K., Hong, X., et al. (1998). Primate renal transplants using immunotoxin. *Surgery* 124, 438-446; discussion 446-437.

Kojo, S., Adachi, Y., Keino, H., Taniguchi, M., and Sumida, T. (2001). Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44, 1127-1138.

Koshiha, T., Van Damme, B., Ji, P., Lu, Y., Yan, Y., Sefrioui, H., Rutgeerts, O., Overbergh, L., Tanaka, K., Mathieu, C., et al. (2001). Intestinal allografts delay rejection and prolong survival of combined donor-specific and third party solid organ transplants. *Transplant Proc* 33, 1550-1552.

Kumar, V., Coulsell, E., Ober, B., Hubbard, G., Sercarz, E., and Ward, E. S. (1997). Recombinant T cell receptor molecules can prevent and reverse experimental autoimmune encephalomyelitis: dose effects and involvement of both CD4 and CD8 T cells. *J Immunol* 159, 5150-5156.

Kuwana, M. (2002). Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum Immunol* 63, 1156-1163.

Lakkis, F. G., Arakelov, A., Konieczny, B. T., and Inoue, Y. (2000). Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6, 686-688.

Lance, E. M., and Medawar, P. (1969). Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IX. Induction of tolerance with antilymphocytic serum. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 173, 447-473.

Le Mauff, B., Hourmant, M., Rougier, J. P., Hirn, M., Dantal, J., Baatard, R., Cantarovich, D., Jacques, Y., and Souillou, J. P. (1991). Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation. *Transplantation* 52, 291-296.

Leclercq, L., Chastagnier, P., Mishal, Z., Bismuth, G., and Theze, J. (1985). Antigen-specific major histocompatibility complex-restricted helper T cell clones are sufficient to induce unprimed B cells to switch and to secrete IgG and IgA in a primary in vitro polyclonal response. *Eur J Immunol* 15, 1060-1066.

Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195, 637-641.

Leeuwenberg, J. F., Jeunhomme, G. M., and Buurman, W. A. (1990). Adhesion of polymorphonuclear cells to human endothelial cells. Adhesion-molecule-dependent, and Fc receptor-mediated adhesion-molecule-independent mechanisms. *Clin Exp Immunol* 81, 496-500.

Lenhoff, S., and Olofsson, T. (1996). Effects of immunosuppressive drugs and antibiotics on GM-CSF and G-CSF secretion in vitro by monocytes, T lymphocytes and endothelial cells. *Br J Haematol* 95, 33-38.

Levings, M. K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R., and Roncarolo, M. G. (2001a). IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166, 5530-5539.

Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G. (2001b). Human cd25(+)cd4(+) regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193, 1295-1302.

Levings, M. K., Sangregorio, R., Sartirana, C., Moschin, A. L., Battaglia, M., Orban, P. C., and Roncarolo, M. G. (2002). Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 196, 1335-1346.

Levy, A. E., and Alexander, J. W. (1996). The significance of timing of additional short-term immunosuppression in the donor-specific transfusion/cyclosporine-treated rat. *Transplantation* 62, 262-266.

Li, J., Liu, Z., Jiang, S., Cortesini, R., Lederman, S., and Suci-Foca, N. (1999). T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J Immunol* 163, 6386-6392.

Li, Y., Koshiba, T., Yoshizawa, A., Yonekawa, Y., Masuda, K., Ito, A., Ueda, M., Mori, T., Kawamoto, H., Tanaka, Y., et al. (2004). Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 4, 2118-2125.

Lider, O., Reshef, T., Beraud, E., Ben-Nun, A., and Cohen, I. R. (1988). Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science* 239, 181-183.

Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174, 561-569.

Liu, Q., Wang, Y., and Thorlacius, H. (2000). Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of macrophage inflammatory protein-2 and adhesion of neutrophils to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 364-367.

Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* 10, 775-783.

Liyanage, U. K., Moore, T. T., Joo, H. G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J. A., Strasberg, S. M., Eberlein, T. J., Goedegebuure, P. S., and Linehan, D. C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169, 2756-2761.

Loh, E., Bergin, J. D., Couper, G. S., and Mudge, G. H., Jr. (1994). Role of panel-reactive antibody cross-reactivity in predicting survival after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 13, 194-201.

Lohse, A. W., Mor, F., Karin, N., and Cohen, I. R. (1989). Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by T cells responding to activated T cells. *Science* 244, 820-822.

Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352, 497-505.

- Lukert, B. P., and Raisz, L. G. (1990). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. *Ann Intern Med* 112, 352-364.
- Mackall, C. L., Fleisher, T. A., Brown, M. R., Andrich, M. P., Chen, C. C., Feuerstein, I. M., Magrath, I. T., Wexler, L. H., Dimitrov, D. S., and Gress, R. E. (1997). Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89, 3700-3707.
- Maier, S., Tertilt, C., Chambron, N., Gerauer, K., Huser, N., Heidecke, C. D., and Pfeffer, K. (2001). Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat Med* 7, 557-562.
- Maki, T., Simpson, M., and Monaco, A. P. (1982). Development of suppressor T cells by antilymphocyte serum treatment in mice. *Transplantation* 34, 376-381.
- Manavalan, J. S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A. J., Vlad, G., Colombo, P. C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (2004). Alloantigen specific CD8+CD28⁻FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16, 1055-1068.
- Manavalan, J. S., Rossi, P. C., Vlad, G., Piazza, F., Yarilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suci-Foca, N. (2003). High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 11, 245-258.
- Maraskovsky, E., Teepe, M., Morrissey, P. J., Braddy, S., Miller, R. E., Lynch, D. H., and Peschon, J. J. (1996). Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol* 157, 5315-5323.
- Marshall, N. A., Vickers, M. A., and Barker, R. N. (2003). Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol* 170, 6183-6189.
- Massy, Z. A., Guijarro, C., Wiederkehr, M. R., Ma, J. Z., and Kasiske, B. L. (1996). Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors. *Kidney Int* 49, 518-524.
- Matas, A. J., Gillingham, K. J., Payne, W. D., and Najarian, J. S. (1994). The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* 57, 857-859.
- Matas, A. J., Humar, A., Payne, W. D., Gillingham, K. J., Dunn, D. L., Sutherland, D. E., and Najarian, J. S. (1999). Decreased acute rejection in kidney transplant recipients is associated with decreased chronic rejection. *Ann Surg* 230, 493-498; discussion 498-500.
- Matis, L. A., Sorger, S. B., McElligott, D. L., Fink, P. J., and Hedrick, S. M. (1987). The molecular basis of alloreactivity in antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell clones. *Cell* 51, 59-69.
- Matthews, J. B., Ramos, E., and Bluestone, J. A. (2003). Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant* 3, 794-803.
- Mazariegos, G. V., Zahorchak, A. F., Reyes, J., Chapman, H., Zeevi, A., and Thomson, A. W. (2005). Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant* 5, 314-322.
- Medawar, P. B., and Woodruff, M. F. (1958). The induction of tolerance by skin homografts on newborn rats. *Immunology* 1, 27-35.

Meiser, B. M., Reiter, C., Reichenspurner, H., Uberfuhr, P., Kreuzer, E., Rieber, E. P., Riethmuller, G., and Reichart, B. (1994). Chimeric monoclonal CD4 antibody--a novel immunosuppressant for clinical heart transplantation. *Transplantation* 58, 419-423.

Merion, R. M., Howell, T., and Bromberg, J. S. (1998). Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation* 65, 1481-1489.

Messer, J., Reitman, D., Sacks, H. S., Smith, H., Jr., and Chalmers, T. C. (1983). Association of adrenocorticosteroid therapy and peptic-ulcer disease. *N Engl J Med* 309, 21-24.

Metcalf, S., Alexander, D., and Turner, J. (1994). FK506 and cyclosporin A each inhibit antigen-specific signaling in the T cell line 171 in the absence of a calcium signal. *Cell Immunol* 158, 46-58.

Michallet, M. C., Preville, X., Flacher, M., Fournel, S., Genestier, L., and Revillard, J. P. (2003a). Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 75, 657-662.

Michallet, M. C., Saltel, F., Preville, X., Flacher, M., Revillard, J. P., and Genestier, L. (2003b). Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. *Blood* 102, 3719-3726.

Middleton, D., Curran, M., and Maxwell, L. (2002). Natural killer cells and their receptors. *Transpl Immunol* 10, 147-164.

Midtvedt, K., and Neumayer, H. H. (2000). Management strategies for posttransplant hypertension. *Transplantation* 70, S64-69.

Migliorati, G., Nicoletti, I., D'Adamio, F., Spreca, A., Pagliacci, C., and Riccardi, C. (1994). Dexamethasone induces apoptosis in mouse natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 81, 21-26.

Millan, M. T., Shizuru, J. A., Hoffmann, P., Dejbakhsh-Jones, S., Scandling, J. D., Grumet, F. C., Tan, J. C., Salvatierra, O., Hoppe, R. T., and Strober, S. (2002). Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 73, 1386-1391.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., and Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172, 4676-4680.

Mitchell, I. J., Cooper, A. J., Griffiths, M. R., and Barber, D. J. (1998). Phencyclidine and corticosteroids induce apoptosis of a subpopulation of striatal neurons: a neural substrate for psychosis? *Neuroscience* 84, 489-501.

Mittelstadt, P. R., and Ashwell, J. D. (2001). Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276, 29603-29610.

Monaco, A. P. (1967). Recent observations of antilymphocyte serum in mice, dogs, and men. In GEW Wolstenholme and M O'Connor. *Ciba Foundation Study Group, N°29. Antilymphocyte Serum* London pg, 111-123.

Monaco, A. P., Clark, A. W., Wood, M. L., Sahyoun, A. I., Codish, S. D., and Brown, R. W. (1976). Possible active enhancement of a human cadaver renal allograft with antilymphocyte serum (ALS) and donor bone marrow: case report of an initial attempt. *Surgery* 79, 384-392.

Montgomery, S. P., Xu, H., Tadaki, D. K., Celniker, A., Burkly, L. C., Berning, J. D., Cruzata, F., Elster, E. A., Gray, G., Kampen, R. L., et al. (2002). Combination induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80, CD86, and CD154 in nonhuman primate renal transplantation. *Transplantation* 74, 1365-1369.

Monti, P., Allavena, P., Di Carlo, V., and Piemonti, L. (2003). Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 3, 189-196.

Mor, F., Reizis, B., Cohen, I. R., and Steinman, L. (1996). IL-2 and TNF receptors as targets of regulatory T-T interactions: isolation and characterization of cytokine receptor-reactive T cell lines in the Lewis rat. *J Immunol* 157, 4855-4861.

Moreland, L. W., Pratt, P. W., Mayes, M. D., Postlethwaite, A., Weisman, M. H., Schnitzer, T., Lightfoot, R., Calabrese, L., Zelinger, D. J., Woody, J. N., and et al. (1995). Double-blind, placebo-controlled multicenter trial using chimeric monoclonal anti-CD4 antibody, cM-T412, in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate. *Arthritis Rheum* 38, 1581-1588.

Morris, P. J., Johnson, R. J., Fuggle, S. V., Belger, M. A., and Briggs, J. D. (1999). Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 354, 1147-1152.

Mourad, G., Garrigue, V., Squifflet, J. P., Besse, T., Berthoux, F., Alamartine, E., Durand, D., Rostaing, L., Lang, P., Baron, C., et al. (2001). Induction versus noninduction in renal transplant recipients with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation* 72, 1050-1055.

Mozo, L., Suarez, A., and Gutierrez, C. (2004). Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy* 34, 406-412.

Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., and Matsushima, K. (1994). Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 269, 13289-13295.

Muller, T. F., Grebe, S. O., Neumann, M. C., Heymanns, J., Radsak, K., Sprenger, H., and Lange, H. (1997). Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 64, 1432-1437.

Myburgh, J. A., Smit, J. A., Mieny, C. J., and Mason, J. A. (1971). Hepatic allotransplantation in the baboon. 3. The effects of immunosuppression and administration of donor-specific antigen after transplantation. *Transplantation* 12, 202-210.

Myburgh, J. A., Smit, J. A., Pieterz, G. A., Ling, S., Sandrin, M. S., and McKenzie, I. F. (2001). Tolerance in baboon kidney transplantation with total lymphoid irradiation (TLI) and anti-CD3/CD4-idarubicin conjugates. *Transplantation* 72, 1150-1152.

Nair, M. P., and Schwartz, S. A. (1984). Immunomodulatory effects of corticosteroids on natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxic activities of human lymphocytes. *J Immunol* 132, 2876-2882.

Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L., O'Connell, P. J., Allen, R. D., and Chapman, J. R. (2003). The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349, 2326-2333.

Nast, C. C., Moudgil, A., Zuo, X. J., Toyoda, M., and Jordan, S. C. (1997). Long-term allograft acceptance in a patient with posttransplant lymphoproliferative disorder: correlation with intragraft viral interleukin-10. *Transplantation* 64, 1578-1582.

Newton, C. J., Ran, G., Xie, Y. X., Bilko, D., Burgoyne, C. H., Adams, I., Abidia, A., McCollum, P. T., and Atkin, S. L. (2002). Statin-induced apoptosis of vascular endothelial cells is blocked by dexamethasone. *J Endocrinol* 174, 7-16.

O'Byrne, S., and Feely, J. (1990). Effects of drugs on glucose tolerance in non-insulin-dependent diabetics (Part I). *Drugs* 40, 6-18.

O'Connor, P. W., Goodman, A., Willmer-Hulme, A. J., Libonati, M. A., Metz, L., Murray, R. S., Sheremata, W. A., Vollmer, T. L., and Stone, L. A. (2004). Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology* 62, 2038-2043.

Oertel, M., Sack, U., Kohlhaw, K., Lehmann, I., Emmrich, F., Berr, F., Hauss, J., and Schwarz, R. (2002). Induction therapy including antithymocyte globulin induces marked alterations in T lymphocyte subpopulations after liver transplantation: results of a long-term study. *Transpl Int* 15, 463-471.

O'Garra, A., and Barrat, F. J. (2003). In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines. *Immunol Lett* 85, 135-139.

Opelz, G. (1994). Effect of the maintenance immunosuppressive drug regimen on kidney transplant outcome. *Transplantation* 58, 443-446.

Opelz, G., and Wujciak, T. (1994). The influence of HLA compatibility on graft survival after heart transplantation. The Collaborative Transplant Study. *N Engl J Med* 330, 816-819.

Opelz, G., Wujciak, T., Dohler, B., Scherer, S., and Mytilineos, J. (1999). HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1, 334-342.

Oppenheimer, F., Aljama, P., Asensio Peinado, C., Bustamante Bustamante, J., Crespo Albiach, J. F., and Guirado Perich, L. (2004). The impact of donor age on the results of renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 19 Suppl 3, iii11-15.

Oriol, R., Opelz, G., Chun, C., and Terasaki, P. I. (1980). Combined effects of HLA matching and age in renal transplantation. *Transplantation* 29, 125-126.

Orosz, C. G. (2002). Graft rejection: mechanisms. *encyclopedia of life sciences*, 1-7.

Orosz, C. G., Wakely, E., Sedmak, D. D., Bergese, S. D., and VanBuskirk, A. M. (1997). Prolonged murine cardiac allograft acceptance: characteristics of persistent active alloimmunity after treatment with gallium nitrate versus anti-CD4 monoclonal antibody. *Transplantation* 63, 1109-1117.

Owens-Grillo, J. K., Hoffmann, K., Hutchison, K. A., Yem, A. W., Deibel, M. R., Jr., Handschumacher, R. E., and Pratt, W. B. (1995). The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common

site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 20479-20484.

Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., and Chung, H. T. (2003). Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25⁻ and CD25⁺ subsets of human CD4⁺ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 701-705.

Pagliacci, M. C., Migliorati, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C., and Nicoletti, I. (1993). Cellular stress and glucocorticoid hormones protect L929 mouse fibroblasts from tumor necrosis factor alpha cytotoxicity. *J Endocrinol Invest* 16, 591-599.

Pai, R. P., Mitchell, P., Chow, V. C., Chapman, J. R., O'Connell, P. J., Allen, R. D., and Nankivell, B. J. (2000). Posttransplant cataract: lessons from kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 69, 1108-1114.

Paliogianni, F., Raptis, A., Ahuja, S. S., Najjar, S. M., and Boumpas, D. T. (1993). Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest* 91, 1481-1489.

Palmer, S. M., Burch, L. H., Davis, R. D., Herczyk, W. F., Howell, D. N., Reinsmoen, N. L., and Schwartz, D. A. (2003). The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 628-632.

Pan, J., Ju, D., Wang, Q., Zhang, M., Xia, D., Zhang, L., Yu, H., and Cao, X. (2001). Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol Lett* 76, 153-161.

Panoutsakopoulou, V., Huster, K. M., McCarty, N., Feinberg, E., Wang, R., Wucherpfennig, K. W., and Cantor, H. (2004). Suppression of autoimmune disease after vaccination with autoreactive T cells that express Qa-1 peptide complexes. *J Clin Invest* 113, 1218-1224.

Pearce, D., Matsui, W., Miner, J. N., and Yamamoto, K. R. (1998). Glucocorticoid receptor transcriptional activity determined by spacing of receptor and nonreceptor DNA sites. *J Biol Chem* 273, 30081-30085.

Pearson, T. C., Trambley, J., Odom, K., Anderson, D. C., Cowan, S., Bray, R., Lin, A., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Siadak, A. W., et al. (2002). Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 74, 933-940.

Pedersen, A. E., Gad, M., Walter, M. R., and Claesson, M. H. (2004). Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunol Lett* 91, 63-69.

Peers, S. H., and Flower, R. J. (1990). The role of lipocortin in corticosteroid actions. *Am Rev Respir Dis* 141, S18-21.

Pelot, M. R., Pearson, D. A., Swenson, K., Zhao, G., Sachs, J., Yang, Y. G., and Sykes, M. (1999). Lymphohematopoietic graft-vs.-host reactions can be induced without graft-vs.-host disease in murine mixed chimeras established with a cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 5, 133-143.

Pennesi, G., Liu, Z., Ciubotariu, R., Jiang, S., Colovai, A., Cortesini, R., Suci-Foca, N., and Harris, P. (1999). TCR repertoire of suppressor CD8⁺CD28⁻ T cell populations. *Hum Immunol* 60, 291-304.

Pepin, M. C., Pothier, F., and Barden, N. (1992). Impaired type II glucocorticoid-receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature* 355, 725-728.

Perico, N., Cattaneo, D., Sayegh, M. H., and Remuzzi, G. (2004). Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 364, 1814-1827.

Piccirillo, C. A., and Thornton, A. M. (2004). Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol* 25, 374-380.

Pistillo, M. P., Tazzari, P. L., Bonifazi, F., Bandini, G., Kato, T., Matsui, T., Nishioka, K., Conte, R., and Ferrara, G. B. (2002). Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* 73, 1295-1302.

Planey, S. L., and Litwack, G. (2000). Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 307-312.

Pober, J. S. (1999). Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res* 19, 225-232.

Pockley, A. G. (2001). Heat shock proteins, anti-heat shock protein reactivity and allograft rejection. *Transplantation* 71, 1503-1507.

Ponec, M., de Haas, C., Kempenaar, J. A., and Bachra, B. N. (1979). Effects of glucocorticosteroids on cultured human skin fibroblasts. V. Influence of anabolic steroids on the inhibitory effects of clobetasol-17-propionate on cell proliferation and collagen synthesis. *Arch Dermatol Res* 266, 75-82.

Powell, D. J., Jr., Dudley, M. E., Robbins, P. F., and Rosenberg, S. A. (2005). Transition of late-stage effector T cells to CD27+ CD28+ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* 105, 241-250.

Pratschke, J., Paz, D., Wilhelm, M. J., Laskowski, I., Kofla, G., Vergopoulos, A., MacKenzie, H. J., Tullius, S. G., Neuhaus, P., Hancock, W. W., et al. (2004). Donor hypertension increases graft immunogenicity and intensifies chronic changes in long-surviving renal allografts. *Transplantation* 77, 43-48.

Preville, X., Flacher, M., LeMauff, B., Beauchard, S., Davelu, P., Tiollier, J., and Revillard, J. P. (2001). Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 71, 460-468.

Przepiorka, D., Phillips, G. L., Ratanatharathorn, V., Cottler-Fox, M., Sehn, L. H., Antin, J. H., LeBherz, D., Awwad, M., Hope, J., and McClain, J. B. (1998). A phase II study of BTI-322, a monoclonal anti-CD2 antibody, for treatment of steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Blood* 92, 4066-4071.

Qian, S., Lu, L., Fu, F., Li, Y., Li, W., Starzl, T. E., Fung, J. J., and Thomson, A. W. (1997). Apoptosis within spontaneously accepted mouse liver allografts: evidence for deletion of cytotoxic T cells and implications for tolerance induction. *J Immunol* 158, 4654-4661.

Raefsky, E. L., Gascon, P., Gratwohl, A., Speck, B., and Young, N. S. (1986). Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood* 68, 712-719.

Raz, I., Elias, D., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M., and Cohen, I. R. (2001). Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358, 1749-1753.

Rebellato, L. M., Gross, U., Verbanac, K. M., and Thomas, J. M. (1994). A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 57, 685-694.

Reichstein, T., and Euw, J. (1936). Über bestandteile der nebennieren-Rinde. VI Trennungsmethodes sowie Isolierung des Substanzen Fa, H une J. *Helv Chim Acta* 19, 1107-1126.

Reinsmoen, N. L., Jackson, A., Hertz, M., Savik, K., Kubo, S., Ormaza, S., Miller, L., and McSherry, C. (1999). Peripheral blood allogeneic microchimerism in lung and cardiac allograft recipients. *J Leukoc Biol* 66, 306-309.

Riccardi, C., Bruscoli, S., and Migliorati, G. (2002). Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol Res* 45, 361-368.

Richards, D. F., Fernandez, M., Caulfield, J., and Hawrylowicz, C. M. (2000). Glucocorticoids drive human CD8(+) T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *Eur J Immunol* 30, 2344-2354.

Rogoff, J., and Stewart, G. (1929). Suprarenal cortical extracts in suprarenal insufficiency. *J Amer Med Ass* 92, 1569-1571.

Rose, L. M., Alvord, E. C., Jr., Hruby, S., Jackevicius, S., Petersen, R., Warner, N., and Clark, E. A. (1987). In vivo administration of anti-CD4 monoclonal antibody prolongs survival in longtailed macaques with experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Immunol Immunopathol* 45, 405-423.

Rossi, S. J., Schroeder, T. J., Hariharan, S., and First, M. R. (1993). Prevention and management of the adverse effects associated with immunosuppressive therapy. *Drug Saf* 9, 104-131.

Ruiz, L. M., Bedoya, G., Salazar, J., Garcia de, O. D., and Patino, P. J. (2002). Dexamethasone inhibits apoptosis of human neutrophils induced by reactive oxygen species. *Inflammation* 26, 215-222.

Russo-Marie, F. (1992). Macrophages and the glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 40, 281-286.

Sakaguchi, S. (2003). The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest* 112, 1310-1312.

Salama, A. D., Najafian, N., Clarkson, M. R., Harmon, W. E., and Sayegh, M. H. (2003). Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14, 1643-1651.

Santini, G., Patrignani, P., Sciulli, M. G., Seta, F., Tacconelli, S., Panara, M. R., Ricciotti, E., Capone, M. L., and Patrono, C. (2001). The human pharmacology of monocyte cyclooxygenase 2 inhibition by cortisol and synthetic glucocorticoids. *Clin Pharmacol Ther* 70, 475-483.

Satoguina, J., Mempel, M., Larbi, J., Badusche, M., Loliger, C., Adjei, O., Gachelin, G., Fleischer, B., and Hoerauf, A. (2002). Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). *Microbes Infect* 4, 1291-1300.

Sayer, H. G., Longton, G., Bowden, R., Pepe, M., and Storb, R. (1994). Increased risk of infection in marrow transplant patients receiving methylprednisolone for graft-versus-host disease prevention. *Blood* 84, 1328-1332.

Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S., Jr. (1995). Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 270, 283-286.

Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.

Schorr, K. (1985). Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 80, 502-514.

Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J. S., Weksler, M. E., Posnett, D. N., Pannetier, C., Kourilsky, P., and Even, J. (1997). Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J Immunol* 158, 4493-4499.

Schwartz, R. H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-1356.

Sebille, F., Brouard, S., Petzold, T., Degauque, N., Guillet, M., Moreau, A., Benjamin, C. D., and Souillou, J. P. (2003). Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation. *Transplantation* 75, 169-172.

Seddon, B., Tomlinson, P., and Zamoyska, R. (2003). Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4, 680-686.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., and Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201, 723-735.

Shapiro, R., Jordan, M. L., Scantlebury, V. P., Vivas, C., Marsh, J. W., McCauley, J., Johnston, J., Randhawa, P., Irish, W., Gritsch, H. A., et al. (1999). A prospective, randomized trial of tacrolimus/prednisone vs tacrolimus/prednisone/mycophenolate mofetil in renal transplantation: 1-year actuarial follow-up. *Transplant Proc* 31, 1134.

Shapiro, R., Scantlebury, V. P., Jordan, M. L., Vivas, C., Gritsch, H. A., Ellis, D., Gilboa, N., Lombardozzi-Lane, S., Irish, W., Fung, J. J., et al. (1996). Tacrolimus in pediatric renal transplantation. *Transplantation* 62, 1752-1758.

Sharabi, Y., and Sachs, D. H. (1989). Mixed chimerism and permanent specific transplantation tolerance induced by a nonlethal preparative regimen. *J Exp Med* 169, 493-502.

Shimizu, Y., Shichijo, M., Hiramatsu, K., Takeuchi, M., Nagai, H., and Takagi, K. (1998). Mite antigen-induced IL-4 and IL-13 production by basophils derived from atopic asthma patients. *Clin Exp Allergy* 28, 497-503.

Shodell, M., and Siegal, F. P. (2001). Corticosteroids depress IFN-alpha-producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol* 108, 446-448.

Simpson, E. R., and Waterman, M. R. (1988). Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol* 50, 427-440.

Sirak, J., Orosz, C. G., Wakely, E., and VanBuskirk, A. M. (1997). Alloreactive delayed-type hypersensitivity in graft recipients: complexity of responses and divergence from acute rejection. *Transplantation* 63, 1300-1307.

Slavin, J., Unemori, E., Hunt, T. K., and Amento, E. (1994). Transforming growth factor beta (TGF-beta) and dexamethasone have direct opposing effects on collagen metabolism in low passage human dermal fibroblasts in vitro. *Growth Factors* 11, 205-213.

Smith, S. J., Piliponsky, A. M., Rosenhead, F., Elchalal, U., Nagler, A., and Levi-Schaffer, F. (2002). Dexamethasone inhibits maturation, cytokine production and Fc epsilon RI expression of human cord blood-derived mast cells. *Clin Exp Allergy* 32, 906-913.

Sommer, B. G., Henry, M. L., and Ferguson, R. M. (1987). Sequential antilymphoblast globulin and cyclosporine for renal transplantation. *Transplant Proc* 19, 1879-1880.

Soulillou, J. P., and Giral, M. (2001). Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 72, S89-93.

Spaulding, C., Guo, W., and Effros, R. B. (1999). Resistance to apoptosis in human CD8+ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 34, 633-644.

Srivastava, R. K., Sasaki, C. Y., Hardwick, J. M., and Longo, D. L. (1999). Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med* 190, 253-265.

Stankova, J., Turcotte, S., Harris, J., and Rola-Pleszczynski, M. (2002). Modulation of leukotriene B4 receptor-1 expression by dexamethasone: potential mechanism for enhanced neutrophil survival. *J Immunol* 168, 3570-3576.

Starzl, T. E., Demetris, A. J., Trucco, M., Murase, N., Ricordi, C., Ildstad, S., Ramos, H., Todo, S., Tzakis, A., Fung, J. J., and et al. (1993). Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 17, 1127-1152.

Starzl, T. E., Marchioro, T. L., Porter, K. A., Iwasaki, Y., and Cerilli, G. J. (1967). The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation. *Surg Gynecol Obstet* 124, 301-308.

Stassen, M., Schmitt, E., and Jonuleit, H. (2004). Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation* 77, S23-25.

Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D., and Powrie, F. (2001). Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31, 1247-1254.

Stiller, C. R., Sinclair, N. R., Abrahams, S., Ulan, R. A., Fung, M., and Wallace, A. C. (1975). Lymphocyte-dependent antibody and renal graft rejection. *Lancet* 1, 953-954.

Strober, S., Benike, C., Krishnaswamy, S., Engleman, E. G., and Grumet, F. C. (2000). Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 69, 1549-1554.

Strom, T. B., Tilney, N. L., Carpenter, C. B., and Busch, G. J. (1975). Identity and cytotoxic capacity of cells infiltrating renal allografts. *N Engl J Med* 292, 1257-1263.

Suciu-Foca, N., Manavalan, J. S., and Cortesini, R. (2003). Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl Immunol* 11, 235-244.

Sugiyama, H., Gyulai, R., Toichi, E., Garaczi, E., Shimada, S., Stevens, S. R., McCormick, T. S., and Cooper, K. D. (2005). Dysfunctional blood and target tissue

CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 174, 164-173.

Susal, C., and Opelz, G. (2002). Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 73, 1269-1273.

Sze, D. M., Giesajtis, G., Brown, R. D., Raitakari, M., Gibson, J., Ho, J., Baxter, A. G., Fazekas de St Groth, B., Basten, A., and Joshua, D. E. (2001). Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8⁺CD57⁺CD28⁻ compartment. *Blood* 98, 2817-2827.

Taams, L., Vukmanovic-Stejic, M., Salmon, M., and Akbar, A. (2003). Immune regulation by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 11, 277-285.

Taams, L. S., Smith, J., Rustin, M. H., Salmon, M., Poulter, L. W., and Akbar, A. N. (2001). Human anergic/suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 31, 1122-1131.

Taams, L. S., van Amelsfort, J. M., Tiemessen, M. M., Jacobs, K. M., de Jong, E. C., Akbar, A. N., Bijlsma, J. W., and Lafeber, F. P. (2005). Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol* 66, 222-230.

Takagi, D., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Nakamaru, Y., Maguchi, S., Ohwatari, R., Furuta, Y., Fukuda, S., Joyce, S., and Onoe, K. (2004). Immunoregulatory defects of V α 24V β 11⁺ NKT cells in development of Wegener's granulomatosis and relapsing polychondritis. *Clin Exp Immunol* 136, 591-600.

Takahashi, K., Saijo, N., Kimata, M., Sasaki, Y., Fujita, J., Futami, H., Shimizu, E., Eguchi, K., Shinkai, T., Tominaga, K., and et al. (1985). Suppression of natural killer activity in patients treated with cisplatin and methylprednisolone. *J Cancer Res Clin Oncol* 109, 78-81.

Takatsuki, M., Uemoto, S., Inomata, Y., Egawa, H., Kiuchi, T., Fujita, S., Hayashi, M., Kanematsu, T., and Tanaka, K. (2001). Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 72, 449-454.

Tan, J. T., Ernst, B., Kieper, W. C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C. D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med* 195, 1523-1532.

Terasaki, P. I., and Ozawa, M. (2004). Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 4, 438-443.

Thomas, J. M., Carver, F. M., Cunningham, P. R., Olson, L. C., and Thomas, F. T. (1991). Kidney allograft tolerance in primates without chronic immunosuppression--the role of veto cells. *Transplantation* 51, 198-207.

Thomas, J. M., Carver, F. M., Foil, M. B., Hall, W. R., Adams, C., Fahrenbruch, G. B., and Thomas, F. T. (1983). Renal allograft tolerance induced with ATG and donor bone marrow in outbred rhesus monkeys. *Transplantation* 36, 104-106.

Thomas, J. M., Contreras, J. L., Smyth, C. A., Lobashevsky, A., Jenkins, S., Hubbard, W. J., Eckhoff, D. E., Stavrou, S., Neville, D. M., Jr., and Thomas, F. T. (2001). Successful

reversal of streptozotocin-induced diabetes with stable allogeneic islet function in a preclinical model of type 1 diabetes. *Diabetes* 50, 1227-1236.

Thomas, J. M., Eckhoff, D. E., Contreras, J. L., Lobashevsky, A. L., Hubbard, W. J., Moore, J. K., Cook, W. J., Thomas, F. T., and Neville, D. M., Jr. (2000). Durable donor-specific T and B cell tolerance in rhesus macaques induced with peritransplantation anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin: absence of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 69, 2497-2503.

Thompson, C., and Powrie, F. (2004). Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol* 4, 408-414.

Tobler, A., Meier, R., Seitz, M., Dewald, B., Baggiolini, M., and Fey, M. F. (1992). Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood* 79, 45-51.

Tomita, Y., Khan, A., and Sykes, M. (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, 1087-1098.

Torrealba, J. R., Katayama, M., Fechner, J. H., Jr., Jankowska-Gan, E., Kusaka, S., Xu, Q., Schultz, J. M., Oberley, T. D., Hu, H., Hamawy, M. M., et al. (2004). Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates. *J Immunol* 172, 5753-5764.

Touraine, J. L., Lefrancois, N., Dubernard, J. M., Garnier, J. L., Eygonnet, J. P., Gibelin, N., Betuel, H., and Traeger, J. (1987). Place of antilymphocyte globulins in the immunosuppressive regimen for kidney transplantation. *Transplant Proc* 19, 1881.

Traeger, J., Touraine, J. L., Archimbaud, J. P., Malik, M. C., and Dubernard, J. M. (1978). Thoracic duct drainage and antilymphocyte globulin for renal transplantation in man. *Kidney Int Suppl*, S103-107.

Trinchieri, G. (1998). Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res* 17, 269-278.

Trzonkowski, P., Szmit, E., Mysliwska, J., Dobyszek, A., and Mysliwski, A. (2004). CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 112, 258-267.

Tsaknaridis, L., Spencer, L., Culbertson, N., Hicks, K., LaTocha, D., Chou, Y. K., Whitham, R. H., Bakke, A., Jones, R. E., Offner, H., et al. (2003). Functional assay for human CD4+CD25+ Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 74, 296-308.

Utset, T. O., Auger, J. A., Peace, D., Zivin, R. A., Xu, D., Jolliffe, L., Alegre, M. L., Bluestone, J. A., and Clark, M. R. (2002). Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol* 29, 1907-1913.

van der Vliet, H. J., Pinedo, H. M., von Blomberg, B. M., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J., and Giaccone, G. (2002). Natural Killer T cells. *Lancet Oncol* 3, 574.

Van Laethem, F., Baus, E., Smyth, L. A., Andris, F., Bex, F., Urbain, J., Kioussis, D., and Leo, O. (2001). Glucocorticoids attenuate T cell receptor signaling. *J Exp Med* 193, 803-814.

van Oosten, B. W., Lai, M., Hodgkinson, S., Barkhof, F., Miller, D. H., Moseley, I. F., Thompson, A. J., Rudge, P., McDougall, A., McLeod, J. G., et al. (1997). Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a

randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351-357.

VanBuskirk, A. M., Burlingham, W. J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R. P., and Orosz, C. G. (2000). Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 106, 145-155.

Vanhove, B., Laflamme, G., Coulon, F., Mouglin, M., Vusio, P., Haspot, F., Tiollier, J., and Soulillou, J. P. (2003). Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 102, 564-570.

Vigouroux, S., Yvon, E., Biagi, E., and Brenner, M. K. (2004). Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 104, 26-33.

Vigouroux, S., Yvon, E., Wagner, H. J., Biagi, E., Dotti, G., Sili, U., Lira, C., Rooney, C. M., and Brenner, M. K. (2003). Induction of antigen-specific regulatory T cells following overexpression of a Notch ligand by human B lymphocytes. *J Virol* 77, 10872-10880.

Vincent, C., and Revillard, J. P. (1977). Antibody response to horse gamma-globulin in recipients of renal allografts: relationship with transplant crises and transplant survival. *Transplantation* 24, 141-147.

Vincenti, F. (2002). What's in the pipeline? New immunosuppressive drugs in transplantation. *Am J Transplant* 2, 898-903.

Vink, A., Uyttenhove, C., Wauters, P., and Van Snick, J. (1990). Accessory factors involved in murine T cell activation. Distinct roles of interleukin 6, interleukin 1 and tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 20, 1-6.

Vlad, G., Piazza, F., Colovai, A., Cortesini, R., Della Pietra, F., Suci-Foca, N., and Manavalan, J. S. (2003). Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum Immunol* 64, 483-489.

Wakkach, A., Cottrez, F., and Groux, H. (2001). Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J Immunol* 167, 3107-3113.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J. P., Cottrez, F., and Groux, H. (2003). Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-617.

Waksman, B. H., Arbouys, S., and Arnason, B. G. (1961). The use of specific "lymphocyte" antisera to inhibit hypersensitive reactions of the "delayed" type. *J Exp Med* 114, 997-1022.

Walker, G., Pfeilschifter, J., and Kunz, D. (1997). Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 272, 16679-16687.

Walker, M. R., Kasprowicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. H., and Ziegler, S. F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest* 112, 1437-1443.

Wang, C., Sun, J., Sheil, A. G., McCaughan, G. W., and Bishop, G. A. (2001). A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Transplantation* 72, 44-51.

Wargnier, A., Lafaurie, C., Legros-Maida, S., Bourge, J. F., Sigaux, F., Sasportes, M., and Paul, P. (1998). Down-regulation of human granzyme B expression by glucocorticoids. Dexamethasone inhibits binding to the Ikaros and AP-1 regulatory elements of the granzyme B promoter. *J Biol Chem* 273, 35326-35331.

Webb, S., Morris, C., and Sprent, J. (1990). Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 63, 1249-1256.

Weekes, M. P., Carmichael, A. J., Wills, M. R., Mynard, K., and Sissons, J. G. (1999). Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol* 162, 7569-7577.

Weiner, H. L. (2001). Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 207-214.

Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Parfitt, A. M., and Manolagas, S. C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102, 274-282.

Wekerle, T. (2001). Transplantation tolerance induced by mixed chimerism. *J Heart Lung Transplant* 20, 816-823.

Wekerle, T., Blaha, P., Koporc, Z., Bigenzahn, S., Pusch, M., and Muehlbacher, F. (2003). Mechanisms of tolerance induction through the transplantation of donor hematopoietic stem cells: central versus peripheral tolerance. *Transplantation* 75, 21S-25S.

Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Balk, S. P., et al. (1998). Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391, 177-181.

Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A., and Suri-Payer, E. (2002). Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 106, 190-199.

Wink, D. A., and Laval, J. (1994). The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 15, 2125-2129.

Wolf, A. M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstien, B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9, 606-612.

Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S. C., Kaiser, L. R., and June, C. H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61, 4766-4772.

Wood, K. J., and Sakaguchi, S. (2003). Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 199-210.

Woodle, E. S., Xu, D., Zivin, R. A., Auger, J., Charette, J., O'Laughlin, R., Peace, D., Jolliffe, L. K., Haverty, T., Bluestone, J. A., and Thistlethwaite, J. R., Jr. (1999). Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 68, 608-616.

Woodruff, M., and Forman, B. (1951). Effect of antilymphocytic serum on suspensions of lymphocytes in vitro. *Nature* 168, 35-36.

Woodruff, M. F., and Anderson, N. A. (1963). Effect of Lymphocyte Depletion by Thoracic Duct Fistula and Administration of Antilymphocytic Serum on the Survival of Skin Homografts in Rats. *Nature* 200, 702.

Wu, Z., Bensinger, S. J., Zhang, J., Chen, C., Yuan, X., Huang, X., Markmann, J. F., Kassae, A., Rosengard, B. R., Hancock, W. W., et al. (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* 10, 87-92.

Yagi, H., Nomura, T., Nakamura, K., Yamazaki, S., Kitawaki, T., Hori, S., Maeda, M., Onodera, M., Uchiyama, T., Fujii, S., and Sakaguchi, S. (2004). Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16, 1643-1656.

Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S., and Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166, 7282-7289.

Yang, O. O., Racke, F. K., Nguyen, P. T., Gausling, R., Severino, M. E., Horton, H. F., Byrne, M. C., Strominger, J. L., and Wilson, S. B. (2000). CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation. *J Immunol* 165, 3756-3762.

Yang, Y., Mercep, M., Ware, C. F., and Ashwell, J. D. (1995). Fas and activation-induced Fas ligand mediate apoptosis of T cell hybridomas: inhibition of Fas ligand expression by retinoic acid and glucocorticoids. *J Exp Med* 181, 1673-1682.

Yang-Yen, H. F., Chambard, J. C., Sun, Y. L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62, 1205-1215.

Yoshimura, C., Miyamasu, M., Nagase, H., Iikura, M., Yamaguchi, M., Kawanami, O., Morita, Y., Iwata, T., Yamamoto, K., and Hirai, K. (2001). Glucocorticoids induce basophil apoptosis. *J Allergy Clin Immunol* 108, 215-220.

Young, N., Griffith, P., Brittain, E., Elfenbein, G., Gardner, F., Huang, A., Harmon, D., Hewlett, J., Fay, J., Mangan, K., and et al. (1988). A multicenter trial of antithymocyte globulin in aplastic anemia and related diseases. *Blood* 72, 1861-1869.

Yvon, E. S., Vigouroux, S., Rousseau, R. F., Biagi, E., Amrolia, P., Dotti, G., Wagner, H. J., and Brenner, M. K. (2003). Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* 102, 3815-3821.

Zacharchuk, C. M., Mercep, M., Chakraborti, P. K., Simons, S. S., Jr., and Ashwell, J. D. (1990). Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J Immunol* 145, 4037-4045.

Zhang, H. Y., and Young, A. P. (1991). A single upstream glucocorticoid response element juxtaposed to an AP1/ATF/CRE-like site renders the chicken glutamine synthetase gene hormonally inducible in transfected retina. *J Biol Chem* 266, 24332-24338.

Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., and Horwitz, D. A. (2002). Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25-precursors. *J Immunol* 169, 4183-4189.

Zheng, X. X., Sanchez-Fueyo, A., Sho, M., Domenig, C., Sayegh, M. H., and Strom, T. B. (2003). Favorably tipping the balance between cytopathic and regulatory T cells to create transplantation tolerance. *Immunity* 19, 503-514.

Zhou, J., Olsen, S., Moldovan, J., Fu, X., Sarkar, F. H., Moudgil, V. K., and Callewaert, D. M. (1997). Glucocorticoid regulation of natural cytotoxicity: effects of cortisol on the phenotype and function of a cloned human natural killer cell line. *Cell Immunol* 178, 108-116.

Zou, L., Barnett, B., Safah, H., Larussa, V. F., Evdemon-Hogan, M., Mottram, P., Wei, S., David, O., Curiel, T. J., and Zou, W. (2004). Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64, 8451-8455.

Zuany-Amorim, C., Sawicka, E., Manlius, C., Le Moine, A., Brunet, L. R., Kemeny, D. M., Bowen, G., Rook, G., and Walker, C. (2002). Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med* 8, 625-629.

Zuckermann, A. O., Grimm, M., Czerny, M., Ofner, P., Ullrich, R., Ploner, M., Wolner, E., and Laufer, G. (2000). Improved long-term results with thymoglobuline induction therapy after cardiac transplantation: a comparison of two different rabbit-antithymocyte globulines. *Transplantation* 69, 1890-1898.

Annexes

**PERIPHERAL BLOOD-BASED GENE EXPRESSION MONITORING IDENTIFIES
A BIOMARKER PANEL PREDICTIVE OF NATURALLY OCCURRING clinical
RENAL ALLOGRAFT TOLERANCE**

Sophie Brouard^{1P}, Elaine Mansfield^{2P}, Szu-chuan Hsieh², Alexandre Dupont¹, Meixia Zhang², Magali Giral¹, Frank Hsieh³, Cécile Braudeau¹, Dominique Baeten¹, Stéphanie Louis¹, Annaik Pallier¹, Rosa Liu², Sheryl Shah², Gavin Sherlock⁴, Jean-Paul Souillou^{1P} and Minnie Sarwal^{2P}.

^P First authors are listed by alphabetical order. First and last authors contributed equally to this work.

¹Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Unité 437: “Immunointervention dans les Allo- et Xénotransplantations”. Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (I.T.E.R.T.), CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.

²Department of Pediatrics, 300 Pasteur Drive, Stanford University, Stanford, CA 94304.

³Department of Veterans Affairs, Palo Alto Health Care System (151-K), Palo Alto, CA 94304.

⁴Department of Genetics, 300 Pasteur Drive, Stanford University, Stanford, CA 94304.

Corresponding authors:

^PMinnie Sarwal, M.D., MRCP, Ph.D.
Department of Pediatrics, G320,
300 Pasteur Drive,
Stanford, CA 94304, USA
msarwal@stanford.edu
Phone: (650) 724-3320
FAX : (650) 498-6714 or (650) 498-4517

^PJean-Paul Souillou, M.D.
I.N.S.E.R.M. Unité 437-ITERT,
CHU Hôtel-Dieu,
30 Bd Jean Monnet,
44093 Nantes Cedex 01, France
jps@nantes.inserm.fr
Phone: (33) 2 40 08 74 10
FAX: (33)2 40 08 74 11

Abbreviations: TOL – drug-free tolerant transplant recipients; IS – immunosuppression; MIS – minimal immunosuppression (steroid monotherapy); CR – chronic rejection; TCR – T cell receptor gene; Q-PCR - real-time quantitative polymerase chain reaction; PAM - predictive analysis of microarrays; SAM – statistical analysis of microarrays; □-CD3/□-CD28 – co-stimulation of the CD28 cascade with antibodies to CD3 and CD28; FK506 - calcinurin inhibitor, Prograf®; T-reg – regulatory T lymphocyte; TGF-β – transforming growth factor beta; AICD - activation induced cell death; GITR – glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene; FOXP3 - forkhead box protein P3.

Abstract

Long-term allograft survival generally requires lifelong immunosuppression, which increases recipient risk of opportunistic infections, malignancies, and drug-related nephrotoxicity. Indefinite, spontaneous kidney graft acceptance without chronic immunosuppression has however been observed. Peripheral blood gene expression profiles of adult renal transplant recipients with immunosuppressive drug free, naturally acquired tolerance were compared to other post-transplant diagnoses using DNA microarray and real-time quantitative-PCR (Q-PCR). Blood expression profiles from patients with acute rejection (n=14) were uniquely different from all patient groups, including drug-free tolerance (n=5). A panel 49 known genes, ~25% regulated by TGF- β and ~26% cell cycle regulated, was identified using a learning set of 5 tolerant (TOL) patients compared to 11 patients with chronic rejection (CR). These genes distinguish the tolerant phenotype with a high concordance in an independent test-set of de-identified tolerant patients (n=3). The expression signature suggests a complex pattern of reduced co-stimulatory signaling, immune quiescence, T cell proliferation, apoptosis, and regulation may all contribute to the TOL phenotype. In addition to being highly diagnostic biomarkers for established clinical tolerance, the 49 gene panel also predicts a tolerance phenotype in a substantial number of stable transplant patients on triple (8%) and single immunosuppression (40%). Q-PCR showed reduced expression of FOXP3, GITR and neurophilin in CR patients compared to TOL patients and normal controls suggesting a critical role for maintenance of regulatory T cell responses where TGF- β may play a role in operational tolerance. Transcriptional profiling of peripheral blood across a highly customized group of genes could prove to be a critical non-invasive monitoring tool for guiding immunosuppression titration in renal transplantation.

Introduction

Kidney transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage renal disease. Despite continuous improved renal allograft survival over the last three decades, the half-life of renal allografts has increased only marginally, largely due to accrual of chronic graft injury from drug-related nephrotoxicity and chronic rejection^{1,2}. In addition, patients facing life-long immunosuppression, have increased risk of infection and malignancy³. Insufficient exposure to immunosuppressive drugs, and immunosuppression interruption, usually increases the risk of rejection⁴. However, spontaneous acceptance to the graft has been observed in a small number of patients following solid organ transplantation⁵. Patients demonstrating long term graft acceptance, years after total withdrawal of immunosuppressive drugs, confirm that a clinical operational state of tolerance to a mismatched graft, a state described as “*a state of quiescence of the transplanted organ, functioning without a destructive immune response*”⁶ can also occur in humans. Identification of patients primed to develop this immune adaptation, and the frequency of this observance in the adult kidney transplant population, are both unknown.

Recently, we showed that both naturally drug-free tolerant kidney recipients and patients with chronic rejection can exhibit skewed clonal selection of circulating lymphocyte populations⁷. T cell receptor (TCR) alteration in the form of TCR V β usage, and an increased frequency of oligoclonality, has been shown to be a common feature of long-term allograft outcome⁸. However, selected peripheral blood T cells from patients having spontaneously developed tolerance, in contrast to recipients with chronic rejection, displayed no accumulation of inflammatory cytokines suggesting blood T cell hyporesponsiveness⁷. Clearly, in the absence of demonstrated selective donor unresponsiveness, the state of clinical operational tolerance must be distinguished, at least semantically, from tolerance in animal models where donor specificity of unresponsiveness and eventual transfer of tolerance to a naïve host can be documented^{6,9,10}. Although the term of “*stable, immunosuppressive drug-free patients*” may be more descriptive, all recipients referred in this study as having clinical operational tolerance enjoyed a stable graft function (8.8 ± 4.9) following withdrawal of all immunosuppressive drug.

A major objective in the field of transplantation would be to identify robust biomarkers for clinical operational tolerance, allowing for individualized therapy and safe immunosuppression minimization. The aim of this study was to study a small cohort of highly informative patients presenting a clinical operational tolerance state years after complete immunosuppression withdrawal⁷, and to identify reliable, non-invasive biomarkers diagnostic

of clinical tolerance state from peripheral blood. Gene expression patterns from peripheral blood samples were examined across normal adults and five cohorts of renal transplant recipients in different clinical contexts. We report the identification of ~600 known gene transcripts from 893 cDNA clones that are significantly differentially expressed in peripheral blood of drug-free tolerant patients and the confirmation of an expression “footprint” for operational tolerance across a minimal gene-set of only 49 known genes. Expression of these genes also predicted a clinical tolerant phenotype in an independent test group of drug-free tolerant patients with goodness-of-fit scores of > 98%. In addition, we show that 8% of stable patients on standard maintenance immunotherapy and 40% of minimally immunosuppressed patients on steroid monotherapy (<10mg/day), also displayed peripheral blood transcription profiles with tolerance class-prediction scores of > 80%, suggesting that these patients may be candidates for safe immunosuppression withdrawal.

Our data suggests, for the first time, that non-invasive identification of natural tolerance in renal transplant recipients is possible by gene-expression pattern recognition across a modest number of genes. This pattern may also serve as a screening tool to identify potential stable transplant candidates that could benefit from immunosuppression minimization or withdrawal, thus decreasing patient morbidity and mortality and improving long-term patient and graft outcomes.

Patients, Materials and Methods

Patient Selection and RNA extraction

The study was accepted by both participation of University Institutional Review Boards and all enrolled patients signed approved informed consent. Peripheral blood samples were collected from 61 adult renal transplant patients and 8 normal adult controls enrolled in this study at Nantes (France) and Stanford Universities (Palo Alto, CA). Samples were separated into a *Training-group* of 16 patients with drug-free tolerance (n=5) or chronic rejection (n=11) and compared against a *Test-group* of 53 patients, with various clinical diagnoses, for prediction of tolerance. Clinical descriptors of all study samples are summarized in Table 1 and have also been previously described ⁷. *Stable graft function* was defined as stable creatinine clearance > 60 mls/min/1.73m² with absent or low grade proteinuria (<1.5g/day) ¹¹. **Training-group** samples were separated into 2 phenotypes 1) Chronic rejection (CR, n=11): patients with poor or failed graft function (3 of 11 patients on dialysis). Biopsies were performed on the 11 patients. Chronic rejection was confirmed by renal histology in 8/11 patients. ¹².

3/11 patients were classified as chronic allograft nephropathy. 2) Operationally immunosuppressive drug-free tolerant (TOL, n=5): patients with long-term stable graft function (see above) without any immunosuppression for >3 years (8.8+/-4.9 years). Immunosuppression withdrawal was related to severe calcineurin nephrotoxicity (n=1), prior malignancy (n=1) or non-adherence (n=6) (Table 1; See also Brouard *et al.* ⁷). The patient who had malignancy (PTLD) the disease was considered as cured or in complete remission without specific therapy for >2 years prior to analysis. Biopsies were not performed on these well functioning grafts.

Additional 53 independent **Test-group** samples from 6 study groups were collected for hypothesis validation and testing. Samples were de-identified in this cohort at the time of class prediction analyses. Their nomenclature and definitions were as following: 1) Operationally immunosuppressive drug-free tolerant test-group (TOL-Test; n=3): patients in this group had similar entry criteria to the TOL group. 2) Chronic rejection test-group (CR-Test, n=5): patients in this group had similar entry criteria to the CR group. A single patient (#04), who previously retained stable graft function while drug-free for over 19 years presented levels of daily proteinuria consistently above the threshold at the time of sampling, possibly the consequence of chronic urinary tract infection following self-administered bladder catheterization or chronic rejection with transplant glomerulopathy. No histological diagnosis was available (patient refusal). This patient typed as “unknown” was not included in the training group but was added to the test group. 3) Minimal immunosuppression test-group (MIS, n=10): patients with stable graft function on steroid monotherapy (<10mg/day) for 4.6+/-2.6 years. 4) Long-term stable test-group (STA, n=12): patients with stable kidney graft function at > 5 years post-transplantation while under calcineurin inhibitor regimen (n=5) or not (n=6) associated with mycophenolate mofetil or azathioprine, and maintenance steroids. 5) Acute rejection test-group (AR, n=14): patients experiencing rapid decline (>20% from baseline) in graft function and biopsy proven acute rejection ¹³. 6) Normal adult healthy controls (n=8).

Patient peripheral blood (5ml) was harvested in EDTA tubes from a peripheral vein or arterio-venous fistula. Peripheral blood leukocytes (PBL) were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and 10 million cells were frozen in Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, San Diego, CA) for RNA extraction. Samples used in the validation studies were collected in PAXgene tubes (Qiagen/PD Company) and total RNA prepared using the manufacturer’s recommended protocols. Samples of total RNA were subjected to

two successive rounds of amplification before hybridization using a modified protocol based on the method described by Wang *et al.* ¹⁴.

Microarray hybridization and data analysis

cDNA microarrays were processed using protocols as previously described using 2 µg RNA in each channel ¹⁵. A “common reference” RNA pool ¹⁶ was used as an internal standard on each array for normalizing expression measurements. Each microarray ^{17,18}, contains ~32,000 cDNA clones representing over 12,400 unique genes. Hybridized microarrays were scanned using GenePix 4000 (Axon Instruments, Union City, CA) and fluorescent images were analyzed with the GenePix Pro software package. Sixty-two arrays were run; these included all patients samples, except the 5 CR-Test and 5 Normal controls. These latter samples were used only for PCR validation studies. The 3 TOL-Test samples were run in duplicate. Data for arrays in this study were stored in the Stanford Microarray Database (SMD) ^{19,20} and gene lists filtered at retrieval. Defective spots were flagged and removed, generating a data file with 11,820 clones under low stringency retrieval settings (80% representative data, signal/noise ratio of expression measurements > 1.5, signal >200 in both channels and expression cut-off of 2-fold in one array). Data were centered prior to statistical analysis.

Cluster (V3.0) generated hierarchical clusters of the samples measuring similarity of expression of the genes and across arrays which are visualized with the TreeView program ²¹; <http://www.microarrays.org/software>. The Prediction Analysis of Microarray (PAM) program ²² was used to identify the minimum gene set that differentiated TOL from CR in the Training-group and to classify the remaining samples in the Test-group. Significance of gene expression differences among the groups of samples was performed using Statistical Analysis of Microarray (SAM) ²³ using a false discovery rate threshold of $q < 0.05\%$. The q -values in a data set are used to compute a false discovery rate (FDR); the lower the FDR the greater the differences between groups being compared. Four approaches were used to assess the functional composition of genes assessed as significantly associated with phenotype: KEGG gene family information retrieved from the Dragon database ²⁴; <http://pevsnerlab.kennedykrieger.org>) and hypergeometric analysis was used to identify enrichment of gene sets identified in previous immune and cancer studies (<http://home.clara.net/sisa/hypergeo.htm>). These include 2,610 “T-cell inducible” transcripts ²⁵, 1,138 cell cycle related genes ²⁶, 874 T-cell activation genes ²⁷, 428 genes up-regulated in bacterial infection ²⁷ and 2,833 associated with lymphoma ¹⁸. Expression of gene families was

then studied by MAPPfinder and the GenMAPP metabolic pathway programs (<http://www.genmapp.org/>). Average fold difference for classes of patients were superimposed over metabolic maps for cell cycling, apoptosis, inflammatory response and transforming growth factor–beta (TGF- β) signaling. Finally, EASE (Expression Analysis Systematic Explorer; <http://apps1.niaid.nih.gov/david/>)²⁸ was used to identify significant enrichment of cellular functional gene classes in the SAM and PAM gene sets. EASE provides statistical significance of gene families identified using standardized KEGG or Gene Ontology databases terms. A normalized gene enrichment score and Fisher T-test are reported for each functional category.

Quantitative Real-time PCR

Amplified RNA (100 ng) was subjected to real-time PCR analysis across 13 Test-group samples; 3 TOL-Test, 5 CR-Test and 5 normal controls (Table 1B) to assess quantification of marker genes identified in the microarray screen and the literature (FOXP3, GITR, neuropilin). Assay-on-demand primer sets and Taqman EZ RT-PCR core reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) were used according to manufacturer's directions in 20 μ L reaction volumes using the 7900HT Sequence Detection System and transcript levels were calculated using the standard curve method of the manufacturer (ABI PRISM 7700 user bulletin, Applied Biosystem). Probe sequences are available in the methods section of the web supplement (<http://microarray-pubs.stanford.edu/tolerance/>). Statistical significance was determined using the SAS Multitest procedure (SAS Institute, Inc. Cary, NC) and F-statistic determined. An analysis of variance (ANOVA) model for repeated measurements was used to compare TOL, CR and normal control sample groups. ANOVA p-values were corrected for the replicate measurements using the false-discovery rate (FDR) option that controls the "false discovery rate" as described²⁹. These adjustments control the FDR only with independent p-values that are uniformly distributed under their respective null hypotheses.

Results

Global variance of gene expression has previously been measured in the blood of healthy controls or individuals with bacterial infection by Boldrick *et al.*²⁷ as well as with malignancy¹⁸ and found to be approximately 5-fold higher in the latter study. Expression variation significant for samples from tolerant patients in this study is 3.5-fold greater than that with normal individuals and 1.9-fold greater than observed infected patients although not

as high as observed in similar sized populations of patients with blood malignancies (Figure 1A). Further, removing samples from stable patients or ones with acute rejection did not significantly change the global expression variance. In contrast, removing either the CR or TOL groups reduced the global variance substantially (*data not shown*). Consequently, we used the CR patients as a reference group for class prediction of tolerance and for comparing to the other patients.

To test fold-expression differences and the degree of overlap in genes that distinguish tolerance from both chronic and acute rejection, patient groups and healthy controls were then compared to CR using SAM 2-class analysis²³. Highly significant individual gene expression differences were observed in MIS, AR, and TOL relative to CR. Of the 11,820 differentially expressed genes studied, 893 were found to show significant differences in expression between the TOL and CR (SAM score $q < 0.05\%$) (Figure 1B; also see <http://microarray-pubs.stanford.edu/tolerance/> for full gene lists). Whereas only ~4% of genes are in common between AR and TOL patients, ~1/3 of the expressed transcripts overlapped between normal controls, MIS and TOL patient groups. In contrast, average gene expression among the stable patient group is statistically indistinguishable from CR as reflected by minimal false discovery rate (FDR) of 87%. The majority of the STA patients consistently co-cluster with CR and a consistent group of MIS patients co-cluster with TOL. EASE functional enrichment scoring of the gene classes differentiating AR and TOL from CR are summarized in Table 2.

Unsupervised expression analysis in tolerance

Global gene expression differences across all 11,820 genes largely segregates the whole blood samples by the phenotypes predicted by PAM (Figure 2A; See also the dendrogram on the home page of the web supplement, <http://microarray-pubs.stanford.edu/tolerance/>). When a higher-stringency gene list is selected (3 samples with >3-fold expression difference), complete segregation of samples predicted with TOL and CR phenotypes is observed. This is largely driven by the three gene clusters identified in Figure 2B and summarized in Table 4. Cluster I suggests overall reduced immune activation in clinical tolerant patients. Specifically, there is decreased expression of cytotoxicity-associated genes (granzyme A, B, and C), cytokine receptors (IL17R, IL18R, an IL2 inducible T cell kinase IK2) and the TCR gamma (TRGV9), delta (TRD@) and zeta (Zap70) chains. Cluster II contains several significantly down-regulated signal transduction genes and RNA binding genes in the TOL patients (EASE score $p < 0.007$), such as splicing factor genes SF1 and SFRS3 ribonucleoprotein genes HNRPK and HNRPU (~2 to 2.5-fold respectively) in TOL

group. Cluster III contains the discriminant up-regulated cell cycle regulator genes in TOL patients (EASE $p = 5.6E-07$; Table 3). Thus, a significant enrichment of genes expressed primarily during mitotic phase (EASE score $p=1.42E-10$) and in cellular energetic processes (EASE score $p=2E-05$) was observed in blood samples from clinically tolerant patients.³⁰

Immunological quiescence and cell cycling distinguish spontaneous renal allograft tolerance

Comparison of the tolerance signature with published gene lists: SAM significance analysis was used to identify genes differentially expressed between CR and TOL (Figure 2C) and between AR and CR (Figure 2D). The 893 statistically-significant transcripts associated with tolerance were first compared to several published gene lists. Significant enrichment of cell cycle regulated genes ($p= 0.00038$; ²⁶) and T cell specific transcripts ($p=0.006$; ³¹) were among the strongest associations observed. Further, the tolerance signature shows substantial enrichment of genes down-regulated during *in vitro* T cell co-stimulation experiments (T cell α -CD3/ α -CD28 co-stimulation with and without concurrent FK506 treatment, $p=10E-8$ and $p=0.00002$) ²⁷. In agreement with the EASE analysis, clusters of chemokines and cell adhesion molecules show reduced expression in TOL relative to CR include while several ribosomal protein genes, cell cycle and proliferation markers as well as key transcription factors show increased expression.

Intrinsic analysis of tolerance signature: Only 4% (36 of 893 transcripts) overlap between tolerance and AR patient samples suggesting contrasted molecular processes in graft acceptance and destruction. AR lacks the strong cell cycle signature characteristic of the tolerance footprint (TK1, CDK7, CCNA2, CCNB2, CDCNK2, CD27; Table 4) but rather shows strong evidence of a classical immune response such as higher expression of interferon-driven genes (IFIT1, IFIT2, GBP1, GIP2 GIP3 MX1, MX2), B cell markers, cytokines and chemokines (Figure 2D).

Validation of the tolerance expression footprint using class prediction

Replicate arrays were run from the 3 independent TOL-Test recipients, geographically and ethnically diverse (1 Canadian Caucasian, 2 Hispanic) from the original Training-group of tolerant patients who were all French Caucasians. These samples were then compared against the original CR training-set patients. All 8 tolerant patients were combined to generate a robust consensus gene list. As expected, this list segregated the samples consistently ($R^2=0.99$) with their previously predicted phenotype including patient #04 who broke

tolerance after 19 years of drug-free existence with stable graft function, now classifies as a CR phenotype and co-clusters with this group (Figure 3C).

The tolerance footprint of 49 known unique genes (Table 3), generated by the comparison between TOL and CR in the Training-group, was used to score de-identified MIS, STA (n=12) and TOL-Test (n=3) samples using PAM (v1.12) class prediction²² analysis (Figure 3A). All arrays from the 3 TOL-Test patients produced tolerance class prediction scores of 98% or greater (Figure 3B), and additionally predicted a tolerance phenotype for 4 of 10 MIS patients (#15-18) and 1 of 12 STA patients (#07).

Interestingly, TGF- β regulates the function of 12 (25%) of the 49 tolerance signature genes identified by PAM class prediction, even though the level of TGF- β mRNA is only marginally higher in TOL patients (~1.2-fold). Several TGF- β regulated genes are expressed in high levels in tolerance including NR2F1 (6-fold) which is known to induce TGF- β synthesis as well as TGF- β inducible early growth response protein (TIEG) (3.3-fold) and β -catenin (2.8-fold), known to enhance the ability of TGF- β to induce cell cycle arrest in the G1 phase³². CD9, a surface antigen initiating the TGF- β signaling pathway^{33,34}, is 4.3-fold higher in tolerance. Additional TGF- β regulated genes in this set include insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3)³⁵, sentrin specific protease 6 (SSP1)³⁶, natural killer cell group 7 (NKG7)³⁷, connective tissue growth factor (CTGF)³⁸, and fibronectin (FN1)³⁹. These are gene markers for apoptosis, early T cell activation, suppression, growth arrest, and the stress-response respectively and are also involved in apoptosis and early T and NK cell activation⁴⁰. In addition, multiple protein kinases (MELK, CDKN3, STK6), cell adhesion molecules (CYR61, FAT, various collagens, and FN1), and cell cycle regulated genes including cyclin B1, B2 and D1 as well as the mitotic checkpoint genes MAD2L1 and BUB1 were also all expressed in higher levels in the tolerance footprint.

Real-time PCR gene validation

Replicate real-time PCR assay reactions were used to confirm expression difference in templates from normal controls (n=5) and the confirming test groups of TOL (n=3) and CR patients (n=5) using 12 candidate genes identified by PAM class prediction and the literature (FOXP3⁴¹, GTR⁴² and neurophilin-1⁴³). Six genes distinguished tolerance from CR (Figure 4), as analyzed by the ANOVA test for repeated measurements and corrected FDR (p<0.05). Increased expression of TK1 (p=0.029), FOXP3 (p=0.035), CD9 (p=0.0002), NKG7 (p=0.0033), MAPK9 (p=0.038), and CD27 (p=0.0094) was in clinical tolerance relative to CR

was confirmed using this independent group of post-transplant patients. Consistent with the array data, increased expression of β -Actin and KLRB1 were suggested with p-values of 0.10, 0.15, and 0.70 respectively as well as reduced expression of EVI2A and CD80 (p=0.26 and 0.38). However, these genes do not reach significance with the small number of patient samples tested. In addition, NKG7, CD9, CD27, MAPK9, TK1, and FOXP3 also distinguish normal controls from CR (p<0.01 for all genes). Only TK1 distinguishes the normal controls from the TOL-Test samples (p=0.05). Finally, expression of neurophilin 1 and GITR (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18), two additional marker genes for regulatory T cells, were ~2- and 8-fold levels higher respectively in TOL vs. CR (*data not shown*) although statistical significance was not reached. Use of additional TOL and CR training set templates confirmed array-based inter-group trends for MMP2 (p=0.16), EVI2A (p=0.10), CD27 (p=0.052), FOXP3 (p=0.083), MAPK9 (p=0.011), and TK1 (p=0.015) when combined with the samples used to confirm the array screen (*data not shown*).

Discussion

Long-term results of kidney transplantation have continuously improved with a parallel increase in patient use of novel immunosuppressive drugs with reduced side effects^{44,45}. Despite this, 80% of long term kidney grafts present various degrees of histological lesions consistent with chronic drug cytotoxicity². In addition, chronic use of immunosuppressants such as the calcineurin inhibitors dramatically increases the incidence of cancer³ in the transplant recipients. One way to limit the devastating long-term effects of immunosuppression would be to identify patients in whom immunosuppressive medication could be minimized or eventually eliminated. However, despite substantial empirical progress in immunosuppression minimization³, reliable biological markers to identify the patients who may directly benefit currently do not exist. Based on reports of regulatory T cells in the blood of long-term stable transplant patients⁴⁶⁻⁴⁹, potential monitoring approaches could be envisioned⁴⁹. However, animal models have unambiguously shown that several histological chronic rejection can coexist in the presence of regulatory T cell activity with sufficient potency to transfer tolerance to naïve host⁵⁰.

Previous transplant studies have already shown that selected gene expression patterns differentiate acute from chronic rejection and from normal renal graft biopsies^{15,51-53}. Here, we studied a small and very rare population of highly informative allogenic kidney recipients presenting stable graft function for several years (>3 years) following immunosuppressive

drug withdrawal to identify non-invasive biological markers associated with this clinical operational tolerance.^{15,51-53} In this report, we described for the first time a highly-selected peripheral blood footprint of only 49 genes that define patients with operational tolerance and our data suggests that this state of naturally acquired immune tolerance can be identified by analyzing gene expression patterns in non-invasive blood samples. In addition, the expression footprint may also be predictive of an evolving tolerant state, that may be developing in a substantial number of stable transplant patients; ~8% on triple immunosuppression and ~40% on steroid monotherapy showed this footprint in the study population. The utility of these biomarkers for monitoring recipients of other solid organ transplants⁵⁴⁻⁵⁷ and for monitoring patients on tolerance induction protocols remains to be studied.

While this peripheral blood analysis has identified a highly-predictive signature for established and possibly developing operational tolerance state, blood may not be the ideal tissue source for deciphering the underlying molecular mechanisms in graft acceptance. For example, although differences in cellular responses in blood, spleen, lymph nodes and the graft are observed in experimental models of rejection and tolerance, infectious tolerance can be transferred with splenocytes, lymph nodes, or graft infiltrating cells^{58,59}, and has not been demonstrated in whole blood. Different molecular studies focused on tolerance have revealed that several mechanisms can operate concurrently including anergy⁶⁰, ignorance⁶¹, clonal deletion of alloreactive cells^{30,62} and presence of regulatory T cells⁴⁶⁻⁴⁹.

Keeping these limitations in mind, several interesting observations emerge from this study. Despite the fact that mRNA levels of TGF- β are not substantially different between patient groups, this chemokine regulates the function of ~25% of the 49 genes that define the naturally acquired tolerance signature. For example, the latent TGF- β 1-binding protein (LTBP1) which is involved in the assembly and secretion of TGF- β as well as several transcription factors regulated by TGF- β including NR2F1 and TIEG are elevated in operationally tolerant patients. TGF- β has been involved in various animal models of tolerance both during induction^{63,64} and the maintenance phases⁶⁵. It is also important for homeostasis of CD4⁺ CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ FOXP3⁺ regulatory T cells⁶⁶ and TGF- β producing cells Th3^{67,68} that known to have suppressive activity⁶⁶. The data presented in this peripheral blood analysis serve to substantiate the intra-graft finding of Scherer *et al.*⁵² who showed a 6-fold lower expression of TGF- β in patients that went on to develop chronic rejection compared to control biopsies. In contrast, Stegall *et al.*⁵¹ and Sarwal *et al.*¹⁵ found increased TGF- β expression in renal biopsies of acute rejection suggesting different roles for TGF- β in

protective and acute alloresponses. Finally, differences between tissue and peripheral expression of TGF- β and its association with both rejection^{38,69} and graft tolerance⁷⁰ are now emerging⁷⁰. A second important finding in this transcription profiling study was that known co-stimulatory genes, including CD28, B7, ICAM-1 and CD80, were under-expressed in TOL patients (Figure 5). This finding is cross-validated by a down-regulation of many other genes that were also identified to be differentially expressed during independent T cell co-stimulation experiments *in vitro*²⁷. Mirroring the co-stimulation response, we also observed an absence of up-regulation of genes generally associated with T cell activation. Indeed, classical markers for early and late T cell activation (CD69, TACTILE, LAG3 or SLAM), expression of cytotoxicity-associated genes such as granzyme, perforin, fas and granulysin⁷¹ and genes characterizing pro-inflammatory Th1/Th2 responses (TNF α , IL-4, IL-10) were consistently reduced in TOL patients. Approximately 90% of known pro-inflammatory cytokines were reduced in TOL patients, supporting evidence for immune quiescence and ignorance of donor antigen in the absence of immunosuppression^{72,73}. Altered expression of multiple cell adhesion molecules (CD9, P-selectin and α - and β -integrins) suggests that cell-contact-dependent mechanisms or homing^{74,75} may contribute to the regulatory mechanisms in TOL patient. Furthermore, comparison of operational tolerance and acute rejection signatures¹⁵ reveal that the ongoing cellular processes in tolerance, are distinct from acute rejection, as evidenced by <4% overlap in significant immunological circuits in the two phenotypes.

We have recently observed that operationally tolerant patients, patients under minimal immunosuppression and normal individuals have more blood CD4⁺CD25^{+high} T cells than patients with CR (*S. Louis et al., submitted*). It may be hypothesized that homeostatic proliferation of regulatory T cells may be a potential source of the transcriptional signature of tolerants compared to chronic rejecting patients. A higher accumulation of the FOXP3 transcripts, a marker for CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in mice⁷⁶ and humans⁵², was also demonstrated in CD4⁺/CD8⁺ cells from clinically operationally tolerant patients and normal individuals compared to patients with chronic rejection (*S. Louis et al., submitted*). Elevated FOXP3, GITR and neuropillin, all markers of regulatory T cells, were also confirmed in the independent group of clinically operationally tolerant patients (TOL-Test) and in normal controls when compared to patients with chronic rejection in this study, suggesting a role for an intact T cell regulation in tolerance, and conversely its loss during chronic rejection. The combination of multiple immune-monitoring parameters such as the biomarker panel

identified in this study, T cell receptor repertoire alteration^{7,8} changes in mononuclear cell phenotype^{55,77} or *ex-vivo* inhibition of allospecific responses⁴⁸ could improve the accuracy of identifying and predicting the tolerant phenotype.

In conclusion, we have identified a critical biomarker from gene expression profiling from peripheral blood from spontaneously tolerant recipients.⁷⁰ Confirmatory large-scale clinical studies would continue to validate the utility of this tolerant footprint as a means to non-invasively identify spontaneous clinical operational tolerance in long-term kidney recipients with stable graft function, to determine the timing of appearance of the observed tolerant footprint post-transplant, and to test the stability of this profile over time. This expression profiling may also be useful for clinical patient management particularly for immunosuppression titration.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge technical assistance from staff at the Stanford Microarray Database, and Drs. Xin Chen, Balasubramanian Narasimhan, and Mei-Sze Chua for helpful suggestions with microarray data analysis, Christophe Legendre (Hôpital St Louis, Paris, France) and Janie Waskerwitz, R.N for help with sample collection. The research was funded by grants from the NIH (U01 AI55795-02 and R01 AI 61739-01 to M.S.), Clinical Center for Immunological Studies at Stanford University (M.S.) and the Lucille-Packard Foundation (M.S., E.S.M.). Additional supports for the research were provided by the “Fondation Progreffe, the “Etablissement Français des Greffes” and a ROTRF (Roche) grant (#559688078), a collaborative clinical research project headquartered at the University of California San Francisco supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Disease and the Juvenile Diabetes Research Foundation. We gratefully acknowledge the assistance of Drs. Oscar Salvatierra (Stanford University) and Philip Halloran (University of Alberta) for kindly providing blood samples from drug-free tolerant patients for the confirmatory studies. We thank Joanna Ashton for editing of the manuscript.

References

1. Opelz G. Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine and steroids on chronic allograft failure. The Collaborative Transplant Study. *Kidney Int Suppl* 1995;**52**:S89-92.
2. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;**349**(24):2326-33.
3. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, et al. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998;**351**(9103):623-8.
4. Iman A, Rao M, Juneja R, Jacob CK. Immunosuppression in live-related donor renal transplantation. *Natl Med J India* 2001;**14**(2):75-80.
5. Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000;**165**(2):691-702.
6. Waldmann H, Cobbold S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001;**14**(4):399-406.
7. Brouard S, Dupont A, Giral M, et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;**5**(2):330-40.
8. Alvarez CM, Opelz G, Giraldo MC, et al. Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* 2005;**5**(4):746-56.
9. 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;**May 15**;**168**(10):5058-69.
10. Kataoka M, Margenthaler JA, Ku G, Flye MW. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 2003;**171**(1):204-11.
11. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976;**16**(1):31-41.
12. Racusen LC. The Banff schema and differential diagnosis of allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2004;**36**(3):753-4.
13. Charney DA, Nadasdy T, Lo AW, Racusen LC. Plasma cell-rich acute renal allograft rejection. *Transplantation* 1999;**68**(6):791-7.
14. Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 2000;**406**(6798):855-62.
15. Chua MS, Barry C, Chen X, Salvatierra O, Sarwal MM. Molecular profiling of anemia in acute renal allograft rejection using DNA microarrays. *Am J Transplant* 2003;**3**(1):17-22.
16. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;**406**(6797):747-52.
17. Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, et al. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999;**64**:71-8.
18. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;**403**(6769):503-11.
19. Gollub J, Ball CA, Binkley G, et al. The Stanford Microarray Database: data access and quality assessment tools. *Nucleic Acids Res* 2003;**31**(1):94-6.
20. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;**29**(4):365-71.
21. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**(25):14863-8.
22. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(10):6567-72.

23. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**(9):5116-21.
24. Bouton C, Demple B. Nitric oxide-inducible expression of heme oxygenase-1 in human cells. Translation-independent stabilization of the mRNA and evidence for direct action of nitric oxide. *J Biol Chem* 2000;**275**(42):32688-93.
25. Dietz AB, Bulur PA, Knutson GJ, Matasic R, Vuk-Pavlovic S. Maturation of human monocyte-derived dendritic cells studied by microarray hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;**275**(3):731-8.
26. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell* 2002;**13**(6):1977-2000.
27. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, et al. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(2):972-7.
28. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;**4**(5):P3.
29. Benjamini YH, Y. Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society* 1995;**57**(B):289-300.
30. Shon HK, Cho KJ, Chung AS. Survivin reduces activation-induced T cell death in G1 phase. *Mol Cells* 2003;**16**(2):147-53.
31. Su AI, Cooke MP, Ching KA, et al. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;**99**(7):4465-70.
32. Satterwhite DJ, Neufeld KL. TGF-beta Targets the Wnt Pathway Components, APC and beta-catenin, as Mv1Lu Cells Undergo Cell Cycle Arrest. *Cell Cycle* 2004;**3**(8).
33. Hattori T, Kubota S, Yutani Y, et al. Change in cellular localization of a rheumatoid arthritis-related antigen (RA-A47) with downregulation upon stimulation by inflammatory cytokines in chondrocytes. *J Cell Physiol* 2001;**186**(2):268-281.
34. Hattori T, Kawaki H, Kubota S, et al. Downregulation of a rheumatoid arthritis-related antigen (RA-A47) by ra-a47 antisense oligonucleotides induces inflammatory factors in chondrocytes. *J Cell Physiol* 2003;**197**(1):94-102.
35. Baxter RC. Signalling pathways involved in antiproliferative effects of IGFBP-3: a review. *Mol Pathol* 2001;**54**(3):145-8.
36. Fagenholz PJ, Warren SM, Greenwald JA, et al. Osteoblast gene expression is differentially regulated by TGF-beta isoforms. *J Craniofac Surg* 2001;**12**(2):183-90.
37. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol* 1995;**155**(3):1066-73.
38. Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 2002;**14**(6):681-5.
39. Saed GM, Kruger M, Diamond MP. Expression of transforming growth factor-beta and extracellular matrix by human peritoneal mesothelial cells and by fibroblasts from normal peritoneum and adhesions: Effect of Tisseel. *Wound Repair Regen* 2004;**12**(5):557-64.
40. Xu Y, Kapp JA. Gammadelta T cells in anterior chamber-induced tolerance in CD8(+) CTL responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;**43**(11):3473-9.
41. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;**172**(10):6003-10.
42. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;**163**(10):5211-8.

43. Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, et al. Frontline: Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004;**34**(3):623-30.
44. Khanna AK, Li B, Stenzen KH, Suthanthiran M. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by CsA: demonstration of a TFG beta dependant mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation* 1994;**57**:577-582.
45. Boulday G, Bremand L, Karam G, et al. Effect of blockade of the costimulation pathway by anti-B7 antibodies in renal allotransplantation in baboons. *Transplant Proc* 2001;**33**(1-2):241-2.
46. 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**(4):1247-54.
47. Kishimoto K, Sandner S, Imitola J, et al. Th1 cytokines, programmed cell death, and alloreactive T cell clone size in transplant tolerance. *J Clin Invest* 2002;**109**(11):1471-9.
48. VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan, et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*. 2000;**106**:145-55.
49. Ciubotariu R, Li J, Colovai AI, Platt JL, Cortesini R, Suciuc F, Cortesini N. Human xenospecific T suppressor cells inhibit T helper cell proliferation to porcine aortic endothelial cells, and NF-kappaB activity in porcine APC. *Hum Immunol* 2001;**62**(5):470-8.
50. Koshiba T, Kitade H, Van Damme B, et al. Regulatory cell mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003;**76**(3):588-96.
51. Stegall M, Park W, Kim D, Kremers W. Gene expression during acute allograft rejection: novel statistical analysis of microarray data. *Am J Transplant* 2002;**2**(10):913-25.
52. Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003;**75**(8):1323-30.
53. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, et al. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 2004;**4**(9):1475-89.
54. Devlin J, Doherty D, Thomson L, et al. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998;**27**(4):926-33.
55. Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW. Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *Trends Immunol* 2001;**22**(8):437-42.
56. Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;**72**(3):449-54.
57. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, et al. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003;**361**(9368):1502-10.
58. Onodera K, Chandraker A, Volk HD, et al. Role of regulatory T cells in the "infectious" tolerance pathway in transplant recipients. *Transplant Proc* 1998;**30**(1):13-5.
59. Zhai Y, Li J, Hammer M, Busuttill R, Volk H, Kupiec-Weglinski J. Evidence of T cell clonality in the infectious tolerance pathway: Implications towards identification of regulatory T cells. *Transplantation* 2001;**71**:1701-1708.
60. Alard P, Lantz O, Perrot JY, Chavanel G, Senik A, Charpentier B. A possible role for specific "anergy" in immunologic hyporeactivity to donor stimulation in human kidney allograft recipients. *Transplantation* 1993;**55**(2):277-83.
61. Zinkernagel RM. On 'reactivity' versus 'tolerance'. *Immunol Cell Biol* 2004;**82**(4):343-52.
62. Kurtz J, Shaffer J, Lie A, Anosova N, Benichou G, Sykes M. Mechanisms of early peripheral CD4 T-cell tolerance induction by anti-CD154 monoclonal antibody and allogeneic bone marrow transplantation: evidence for anergy and deletion but not regulatory cells. *Blood* 2004;**103**(11):4336-43.

63. Cuturi M, Anegon I, Josien R, Souillou J. Cytokines and transplantation. *Les annales de l'institut Pasteur/Actualités. In Press* 1998.
64. Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol* 2001;**31**(10):3111-20.
65. Knechtle SJ, Burlingham WJ. Metastable tolerance in nonhuman primates and humans. *Transplantation* 2004;**77**(6):936-9.
66. Chen L, Woo M, Hakem R, Miller RG. Perforin-dependent activation-induced cell death acts through caspase 3 but not through caspases 8 or 9. *Eur J Immunol* 2003;**33**(3):769-78.
67. Cerwenka A, Swain SL. TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect* 1999;**1**(15):1291-6.
68. Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;**3**(11):947-54.
69. Khanna A, Plummer M, Bromberek C, Bresnahan B, Hariharan S. Expression of TGF-beta and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int* 2002;**62**(6):2257-63.
70. Graca L, Chen TC, Moine AL, Cobbold SP, Howie D, Waldmann H. Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells. *Trends Immunol* 2005;**26**(3):130-5.
71. Harris MA, Clark J, Ireland A, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 2004;**32 Database issue**:D258-61.
72. Toyooka K, Tai XG, Yashiro Y, et al. Synergy between CD28 and CD9 costimulation for naive T-cell activation. *Immunol Lett* 1997;**58**(1):19-23.
73. Park CS, Yashiro Y, Tai XG, et al. Differential involvement of a Fas-CPP32-like protease pathway in apoptosis of TCR/CD9-costimulated, naive T cells and TCR-restimulated, activated T cells. *J Immunol* 1998;**160**(12):5790-6.
74. Syrbe U, Jennrich S, Schottelius A, Richter A, Radbruch A, Hamann A. Differential regulation of P-selectin ligand expression in naive versus memory CD4+ T cells: evidence for epigenetic regulation of involved glycosyltransferase genes. *Blood* 2004;**104**(10):3243-8.
75. Haddad W, Cooper CJ, Zhang Z, et al. P-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 are major determinants for Th1 cell recruitment to nonlymphoid effector sites in the intestinal lamina propria. *J Exp Med* 2003;**198**(3):369-77.
76. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;**299**(5609):1057-61.
77. Holm AM, Sivertsen EA, Tunheim SH, et al. Gene expression analysis of peripheral T cells in a subgroup of common variable immunodeficiency shows predominance of CCR7(-) effector-memory T cells. *Clin Exp Immunol* 2004;**138**(2):278-89.

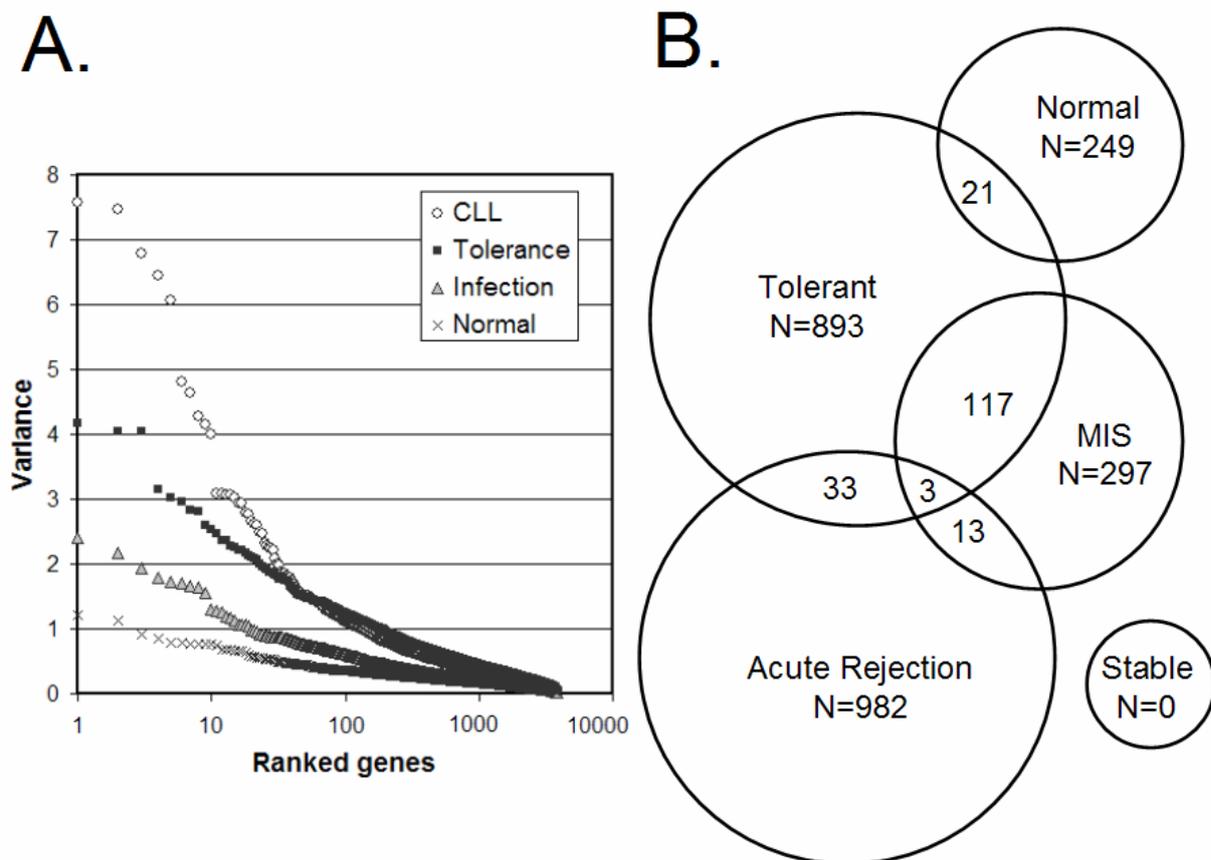


Figure 1. Tolerance involves active transcription and expression signature is distinct from AR and CR. A). The variance in global gene expression is compared to three reference studies. Specifically Whitney *et al.* {Whitney, 2003 #381} surveyed variation in gene expression patterns in peripheral blood from 75 healthy volunteers (Normal), Boldrick *et al.* {Boldrick, 2002 #190} studied the innate immune response is crucial for defense against different pathogenic bacteria (Infection), and Alizadeh and Staudt {Alizadeh, 2000 #185} characterized expression variation in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Variance in 3,826 randomly selected transcripts across 45 samples from each of these studies was calculated and plotted in rank order (highest to lowest) along with the data from this study (Tolerance). B). Statistical analysis of microarray (SAM) was used to identify differentially expressed genes in peripheral blood samples among the adult renal transplant groups described in Table 1 and adult controls (n=3). The Venn diagram shows the degree of overlap among the genes with highest significance using 2-class comparison to chronic rejection using SAM significance cut-off of $q < 0.05\%$. No statistically significant genes were identified when CR is compared to a group of stable graft recipients under standard therapy as evidenced by minimum false discovery rate of 87%. Fewer genes distinguish CR from MIS (n=297) or Normal (n=249) than either AR (n=982) or TOL (n=893) and there is minimal overlap ($< 4\%$) between those associated with AR and TOL.

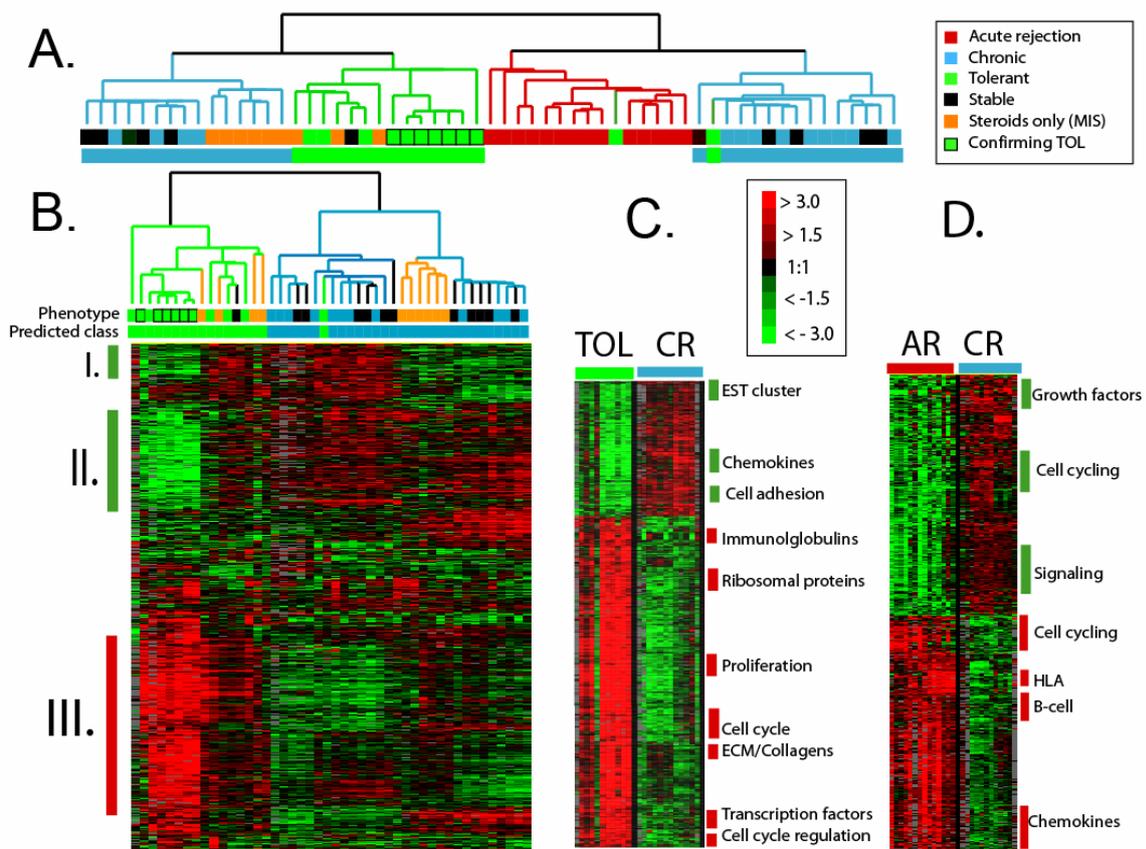


Figure 2. Unsupervised clustering of whole blood lysates. A). The dendrogram derived from unsupervised clustering of all the samples run on genome-wide scan arrays across 11,280 differentially expressed transcripts is shown. The confirmatory drug-free TOL patients co-cluster with the learning set of tolerant samples and the dendrogram is color-coded according to the predicted class. B). Unsupervised clustering of whole blood lysates based on 2,986 differentially expressed transcripts. All of the MIS or STA patients predicted to have a TOL phenotype co-cluster with both the learning set of drug-free TOL patients and confirmatory Test-TOL patients. Three major gene clusters drive this segregation as indicated and described in the text. See supplemental information at (<http://microarray-pubs.stanford.edu/tolerance/>) for the full data on these clusters and output of the SAM analysis. C). Supervised SAM analysis comparing TOL and CR identified 893 significantly differentially expressed transcripts. The majority of these genes are expressed in higher levels in TOL and predominant enriched gene functions listed (see Table 2). Gene expression scale ranged ± 3 -fold relative to the mean expression for each gene and missing data is displayed in grey. D). Expression of 982 cDNA clones representing 578 unique known genes differentially expressed between AR and CR. Approximately half the genes are more abundant in AR including genes in cell cycling, antigen presentation and pro-inflammatory chemokines and cytokines.

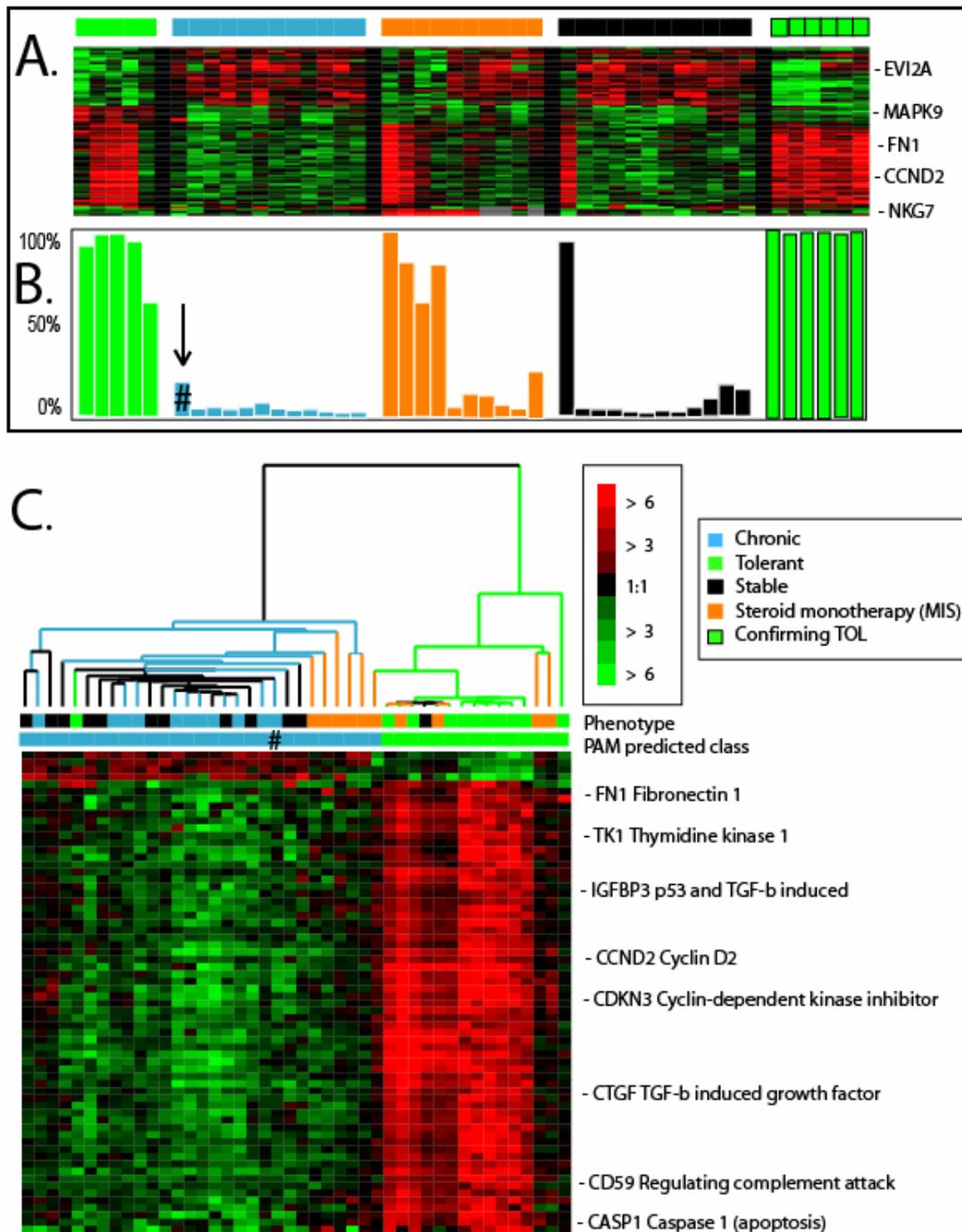


Figure 3. Class prediction for tolerance expression signature. Minimal gene sets extracted from 11,280 cDNA were identified by PAM class prediction. A). A learning set of 5 TOL and 11 CR patients identify 75 transcripts that exceed segregation threshold of $2\log = 2.1$ (> 4 -fold average expression difference) and key genes assayed by real-time PCR indicated. B). PAM class prediction score for tolerance is graphed under individual patients. Patient #04 who had broken tolerance (indicated by the arrow) was not used to train the class-predication algorithm and has a low predicted tolerance score (28%). C). To obtain a consensus gene set, PAM class prediction was repeated using 8 TOL patients and 11 CR patients. Clustering of samples based on this consensus gene set cluster in agreement with unsupervised analysis and patient #03 clusters with the chronic group (indicated by #).

Figure 4

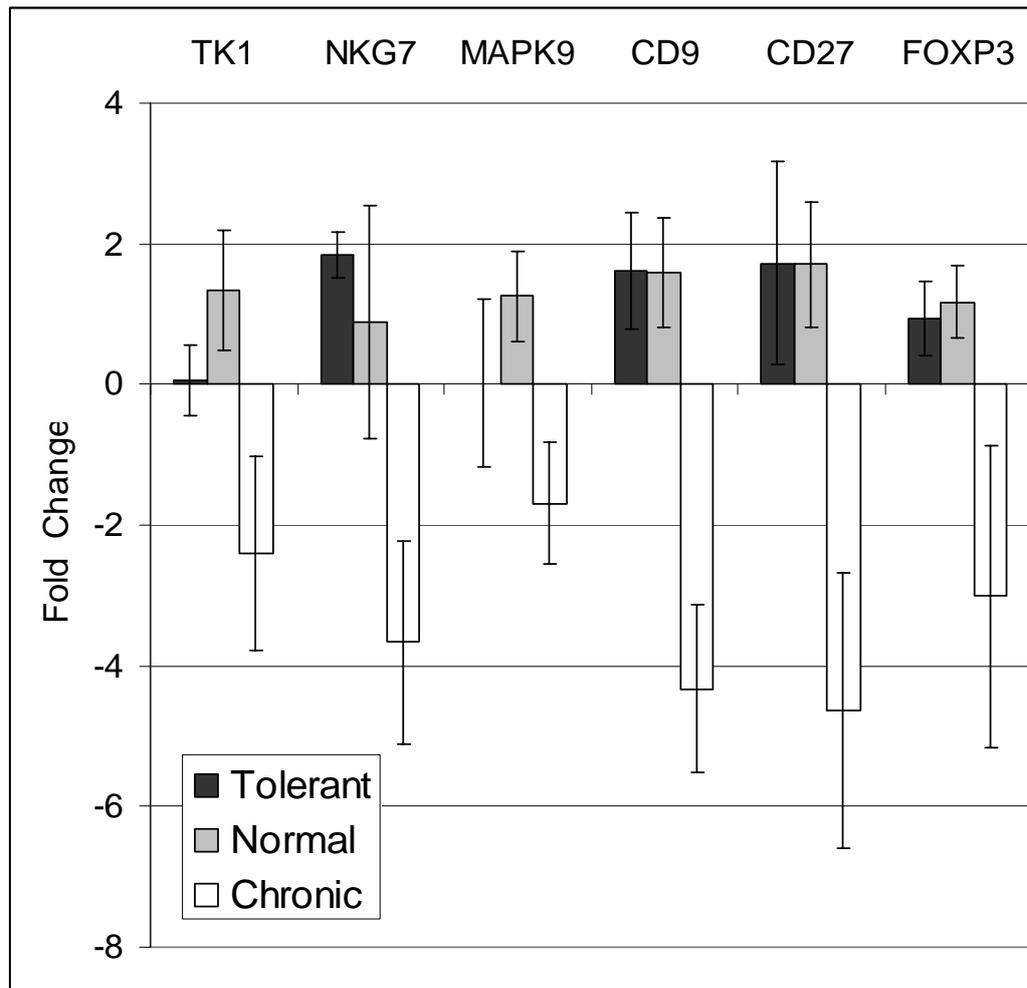


Figure 4. Real-time PCR confirmation of selected gene expression differences. Replicate real-time PCR assays at 10 loci were run in from whole blood RNA extracted from Test-TOL patients (Tolerant; n=3) were compared to an independent group of patients with chronic rejection (Chronic; n=5) and with whole blood from healthy normal donor controls (Normal; n=4) and fold differences relative to the average are shown. Significant expression differences were observed at six of the markers analyzed (FDR adjusted ANOVA scores) comparing TOL and CR including TK1 (p=0.035), NKG7 (p=0.004), MAPK9 (p=0.038), CD9 (p=0.003), CD27 (p=0.004), and FOXP3 (p=0.035). In addition, CD80, NKG7, CD9, CD27, MAPK9, TK1, and FOXP3 also distinguish Normal controls from Chronic (p<0.01 for all genes). Only TK1 distinguishes the normal controls from Tolerant post-transplant samples (p=0.05). Consistent with the array data, increased expression of β -Actin, KLRB1, and MMP2 in TOL and reduced expression of EVI2A and CD80 was found by PCR. However, these genes do not reach significance with the small number of patient samples tested.

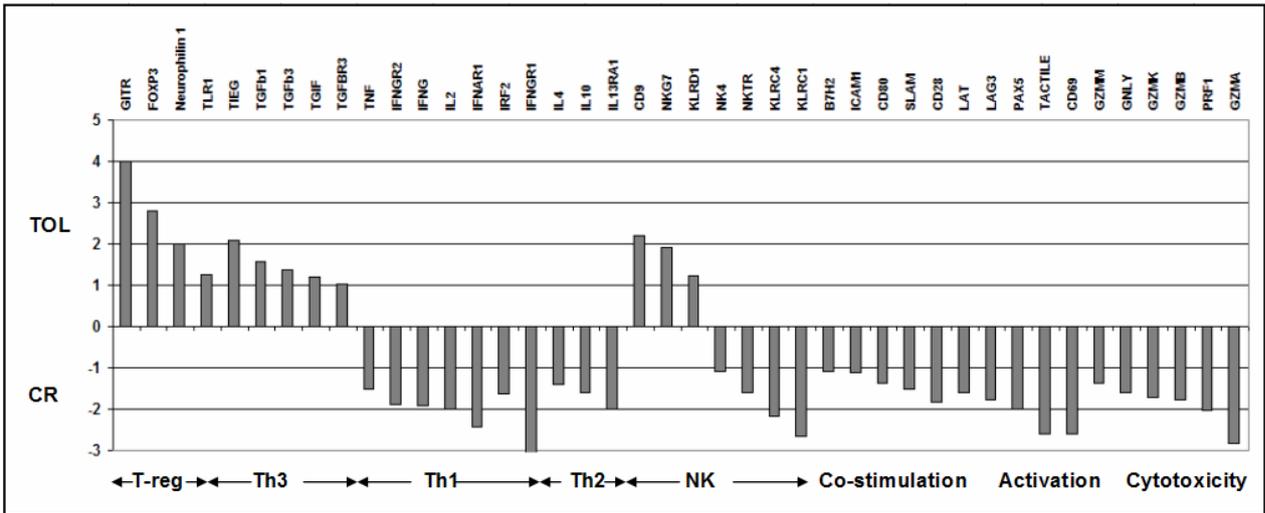


Figure 5. Gene expression footprint of spontaneous tolerance. Relative fold differences of lymphocyte of marker genes between TOL and CR are plotted (ratio of expression in TOL/CR). Genes that positively correlate with the TOL patients include markers for regulatory T cells, Th3 cells (TGF- β driven genes) and selected natural killer (NK) cell markers. Expression of key genes in co-stimulation, lymphocyte activation and cytotoxic T lymphocyte markers were expressed in higher levels in CR.

Table 1. Demographic summary of patient groups.

	Test Groups		Confirmatory Groups		Comparison Groups			
	TOL	CR	Test-TOL	Test-CR	MIS	Stable	AR	Normal
Number	5	11	3	5	10	12	14	8
Age (years)	66.8±5.8	52.5±16.5	51.3±27.4	15.9±2.9	53±19.1	49.3±7.8	19.5±2.5	24.3±4.8
% Male	80%	63%	67%	60%	50%	66%	64%	62%
Time post-Transplant	19.5±7.6	6.5±3.8	10.1±2.5	2.9±3.3	11.5±5.7	12.8±7.8	4.6±3.8	NA
Serum Creatinine	104.8±97.9	276±116	77.5±9.2	3.5±1.9	99.3±31	94.5±25.12	49.6±17	NA
Urine Protein/Creatinine	0.37±0.19	3.4±4.0	1.1±1.6	1.9±1.5	0.14±0.08	0.23±0.28	41.3±35	NA
Prior AR	20%	27%	33%	20%	10%	25%	100%	0%
Prior CA	20%	0%	0%	0%	80.0%	0%	0%	0%
Prior CMV	NA	36%	0%	0%	60%	17%	0%	0%

Table 2. Expression of minimal gene set that differentiates tolerance from chronic rejection.

CloneID	Gene	Definition	Fold change in Expression		
			TOL vs. CR	TOL vs. N	CR vs. N
IMAGE:212188	APOH	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I)	10.45	8.35	0.80
IMAGE:360254	CYR61	Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	9.88	7.28	0.74
IMAGE:378461	SPP1	Osteopontin, early T-lymphocyte activation 1	9.27	10.35	1.12
IMAGE:116743	FADS1	Fatty acid desaturase 1	8.96	8.46	0.94
IMAGE:898092	CTGF	Connective tissue growth factor	8.25	4.94	0.60
IMAGE:74537	AFP	Alpha-fetoprotein	8.23	8.33	1.01
IMAGE:1323591	SERPINA5	Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin	7.99	5.95	0.74
IMAGE:2391979	DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family)	7.65	6.97	0.91
IMAGE:139009	FN1	Fibronectin 1	7.02	5.55	0.79
IMAGE:760299	DKK3	Dickkopf homolog 3	7.02	7.04	1.00
IMAGE:359412	CCND2	Cyclin D2	6.91	6.30	0.91
IMAGE:2109103	COL6A3	Collagen, type VI, alpha 3	6.86	6.68	0.97
IMAGE:700792	CDKN3	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	6.69	4.06	0.61
IMAGE:2457449	CCNB2	Cyclin B2	6.68	5.01	0.75
IMAGE:758088	CALD1	Caldesmon 1	6.65	10.78	1.62
IMAGE:1341540	BUB1	BUB1 budding uninhibited	6.42	3.43	0.53
IMAGE:379920	TK1	Thymidine kinase 1, soluble	6.42	5.83	0.91
IMAGE:486110	PFN2	Profilin 2	6.10	6.51	1.07
IMAGE:114639	TCF3	Transcription factor 3	6.08	4.38	0.72
IMAGE:148800	N33	Putative prostate cancer tumor suppressor	5.98	7.69	1.29
IMAGE:503119	FAT	Tumor suppressor homolog 1	5.89	4.79	0.81
IMAGE:66478	EPOR	Erythropoietin receptor	5.70	4.31	0.76
IMAGE:487297	CAP2	Adenylyl cyclase-associated protein 2	5.69	6.82	1.20
IMAGE:1316861	MELK	Maternal embryonic leucine zipper kinase	5.57	4.52	0.81
IMAGE:1456118	PSMB9	Proteasome (prosome, macropain protease	5.56	4.80	0.86
IMAGE:70224	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease	5.56	2.63	0.47
IMAGE:2497698	TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	5.49	2.98	0.54
IMAGE:1577805	CDH2	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	5.41	2.86	0.53
IMAGE:250654	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	5.38	5.80	1.08
IMAGE:344430	BMP7	Bone morphogenetic protein 7	5.21	3.49	0.67
IMAGE:788566	PCP4	Purkinje cell protein 4	5.16	6.71	1.30
IMAGE:1407750	IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	5.05	5.85	1.16
IMAGE:789049	NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2F1	4.91	4.27	0.87
IMAGE:263716	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	4.84	4.03	0.83
IMAGE:624627	RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	4.83	3.40	0.70
IMAGE:788256	KNSL5	Kinesin-like 5 (mitotic kinesin-like protein 1)	4.73	2.97	0.63
IMAGE:814701	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	4.46	3.39	0.76
IMAGE:142788	SERPINH2	Heat shock protein 47 (proteinase inhibitor)	4.33	4.30	0.99
IMAGE:1357548	STK6	Serine/threonine kinase 6	4.32	2.74	0.64
IMAGE:234237	PIR	Pirin	4.31	3.00	0.70
IMAGE:744647	CTNNAL1	Catenin (cadherin-associated protein)	4.21	3.84	0.91
IMAGE:129865	STK6	Serine/threonine kinase 6	4.21	3.47	0.82
IMAGE:45720	CD59	CD59 antigen p18-20	4.18	4.48	1.07
IMAGE:36374	CCNB1	Cyclin B1	4.13	3.26	0.79
IMAGE:810454	BACE2	Beta-site APP-cleaving enzyme 2	3.88	2.86	0.74
IMAGE:450533	SERPINA3	Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin	3.72	4.00	1.07
IMAGE:753038	KIFC3	Kinesin family member C3	3.66	2.72	0.74

IMAGE:682989	PAICS	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase	3.64	3.29	0.90
IMAGE:760298	LGMN	Legumain	3.63	3.29	0.90

Table 3. Gene family enrichment in acute rejection and tolerance.

Class	Gene Function Category	Genes	EASE Score	Fisher Exact
AR	Defense response	58	2.38E-06	1.19E-06
AR	Immune response	54	2.54E-06	1.24E-06
AR	Response to stress	52	4.78E-05	2.54E-05
AR	Response to stimulus	87	0.000292	0.000197
AR	Regulation of cell proliferation	22	0.000477	0.000189
AR	Humoral immune response	15	0.00219	0.00078
AR	Anti-apoptosis	11	0.0023	0.000645
AR	Signal transduction	113	0.00266	0.00203
AR	Regulation of apoptosis	19	0.00283	0.0012
AR	Regulation of cellular process	27	0.00523	0.00275
AR	Nitric oxide metabolism	4	0.0065	0.000473
AR	Immune cell activation	9	0.00867	0.00252
AR	Cellular defense response	10	0.0101	0.00329
AR	Intracellular signaling cascade	45	0.0104	0.00675
AR	Cell communication	134	0.0127	0.0104
AR	Cell motility	19	0.0153	0.00769
AR	Hemopoiesis	7	0.0201	0.00547
AR	Programmed cell death	24	0.023	0.0129
AR	Antigen presentation	4	0.0253	0.00337
AR	Antigen processing	5	0.0256	0.00501
TOL	Mitotic cell cycle	35	3.23E-08	1.01E-08
TOL	Cell proliferation	72	8.43E-08	4.2E-08
TOL	Cell cycle	52	7.18E-07	3.29E-07
TOL	Nuclear division/ DNA replication	18	5.56E-05	1.59E-05
TOL	Blood coagulation	11	0.000969	0.00024
TOL	Pyrimidine metabolism	6	0.00147	0.000167
TOL	Hemostasis	11	0.00161	0.00043
TOL	Regulation of cell cycle	27	0.00193	0.000946
TOL	Morphogenesis	55	0.00204	0.0013
TOL	Response to oxidative stress	7	0.00348	0.000633
TOL	Regulation of cell growth	10	0.00359	0.000987
TOL	Mitotic checkpoint	4	0.00702	0.000526
TOL	Organogenesis	47	0.00737	0.00481
TOL	Cell adhesion	36	0.00825	0.00506
TOL	Response to external stimulus	71	0.00846	0.0061
TOL	Skeletal development	12	0.00981	0.00363
TOL	Cell cycle checkpoint	6	0.00995	0.00189
TOL	Cell growth	11	0.0102	0.00358
TOL	Cytokinesis	10	0.0104	0.00339
TOL	Development	78	0.0109	0.00808
TOL	Response to stimulus	48	0.0148	0.0101
TOL	Cell growth/maintenance	142	0.0158	0.0131

Table 4. Gene family enrichment in unsupervised analysis.

<i>Cluster I - Reduced expression</i>	No. Genes	<i>EASE Score</i>	<i>Fisher Exact</i>	<i>Representative genes</i>
Immune response	17	0.0000106	0.00000286	GZMA, -B, -C, KLRK1, LY64
Response to stress	13	0.00324	0.0012	MAP4K1, SCAP1, ZAP70
Cell communication	30	0.00698	0.00439	BIN2, CCL5, CD3E, CD5, IL17R, ITPR1
Protein kinase activity	10	0.0212	0.00847	SYK, STK4, ITK, STK39, ZAP70
Signal transduction	25	0.00857	0.00505	ADRB2, AKAP10, HLA-DPA1, IL16
Protein modification	12	0.0445	0.0222	STK39, PTPN22, SIAT4A, SYK
Regulation of cell proliferation	5	0.0759	0.023	CD3E, MXD4, PCAF, SLAMF1
Innate immune response	4	0.0666	0.0305	NCR3, LY64, CCL5, IL18RAP
<i>Cluster II - Reduced expression</i>	No. Genes	<i>EASE Score</i>	<i>Fisher Exact</i>	<i>Representative genes</i>
Signal transduction	56	0.0000124	0.00000702	JAK1, LCP2, RAB1A, RAP1A
RNA binding	18	0.000106	0.000034	RBM5, CUGBP2, DHX9, HDLBP
Intracellular signaling cascade	26	0.000124	0.0000522	ABL2, FYN, LIMK1, RHOH
Immune response	22	0.001	0.000442	CD74, CD2, FN1, TRIM, IL2RB
RNA processing	11	0.00941	0.0034	HNRPK, HNRPU, ROD1, SF1
Double-stranded RNA binding	3	0.0605	0.0074	DHX9, MBNL1, PRKRA
Humoral immune response	6	0.0637	0.0212	OCIL, IL7R, LY9, POU2F2, PAG
DNA binding	36	0.0121	0.00781	NFATC1, IRF2, TBRG1, TRIM26
<i>Cluster III - Increased expression</i>	No. Genes	<i>EASE Score</i>	<i>Fisher Exact</i>	<i>Representative genes</i>
Mitotic cell cycle	45	1.42E-10	4.26E-11	MCM5, -6, -7, Survivin, CyclinA2, B1, D1
Regulation of cell cycle	42	0.00000056	0.000000218	BUB1, CDC2, -20, -25C, CDKN3, -N2A
Electron transporter activity	24	0.0000194	0.00000634	COX11, ETFA, GPX4, PLOD, TXNL2
Mitochondrion	50	0.0000203	0.0000103	ATP5F1, -5J, -5O, -5G2, C1QBP, TIMM8B
Cell growth	18	0.0000248	0.00000648	ENO1, FHL1, TSG101, SOCS5, LTBP4
Insulin-like growth factor binding	5	0.00722	0.000896	CTGF, CYR61, ESM1, IGFBP3, NOV
Cell migration	8	0.00547	0.00126	JAG1, FEZ2, RTN4, SDCBP, LAMA1
Cytoskeleton	42	0.017	0.0113	FLNA, DST, GAS2, MYO1B, -5B
Calcium ion homeostasis	6	0.00423	0.000618	CXCL12, CCL2, -15, -19, S10B, STC1

The recurrence of Focal and Segmental Glomerulosclerosis after kidney transplantation correlates with T CD8+ lymphocytes abnormalities.

Caroline Hervé, Stéphanie Louis, François-Xavier Hubert, Ludmilla Le Berre, Jeanne Naulet, Sophie Brouard, Jean Paul Souillou and Jacques Dantal.

Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) and Nantes University
Unité mixte 643 : « Immunointervention dans les Allo et Xénotransplantations », Institut de
Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT) CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean
Monnet, 44093 Nantes Cedex, France

short title: CD8+ abnormalities in recurrence of FSGS

Correspondence : Jacques Dantal, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex,
France, tel : +33.2.40.08.74.10, Fax : +33.2.40.08.74.11
e-mail : jacques.dantal@chu-nantes.fr

The recurrence of Focal and Segmental Glomerulosclerosis after kidney transplantation correlates with T CD8+ lymphocytes abnormalities.

Background Etiology of primary Focal and Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) and mechanisms that lead to the relapse of the disease after transplantation are not yet elucidated. Several observations suggest a primary T cell disorder that may induce glomerular podocyte dysfunction. The aim of this work was to determine if some T lymphocyte phenotype and activation patterns correlate with FSGS relapse. **Methods** FSGS relapsing patients (R, n=10) were thus compared with non relapsing patient (NR, n=9) and to patients with other end stage renal disease etiology (Non-FSGS, n=9). The distribution of lymphocyte subsets after transplantation was determined by flow cytometry and transcripts analysis were performed by quantitative PCR. In addition, peripheral blood mononucleated cell phosphorylation patterns were studied following polyclonal stimulation. **Results** Relapsing patients displayed significantly less CD8+CD28- T cells than the two other groups: 21.2±3% vs. 41.4±6.2% (NR) and 42.2±5.6% (non-FSGS), p<0.05. T CD8+ of relapsing patients, compared with those of NR patients, also showed highly significant decrease of MAPK9 (JNK2, p=0.009) and CTLA-4 (p=0.01) transcripts, both involved in T cell regulation. Moreover, a specific phosphorylation pattern observed in PBMC of FSGS recurrent patients also suggests a decrease in phosphatase activity. **Conclusion** Taken together, these data suggest a lack of regulation in the CD8+ T cell of patients with active FSGS disease.

Keywords: Focal and segmental glomerulosclerosis, recurrence, T lymphocyte, CD8+

INTRODUCTION

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a glomerulopathy which represents 80% of childhood nephrotic syndrome and 25% of adults. The clinical definition is major proteinuria, edema and hypoalbuminemia. First described as lipoid nephrosis [1], INS was then classified into three distinct histological variants: minimal-change nephrotic syndrome (MCNS), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), and mesangial hypercellularity. FSGS and MCNS may represent opposite ends of one pathophysiological process or distinct disease entities. Patients with INS are initially treated with corticosteroids and alkylating agents and ciclosporine in steroid unresponsive patients. Drug resistance leads in a large majority to end stage renal failure. Unfortunately, initial disease recurs after initial transplantation in as many as 30% to 50% of patients [2, 3]. The main clinical predictors of relative risk for recurrence in pediatric recipients of first transplants are age at diagnosis and rapid progression to renal failure in native kidney [4].

The etiology and physiopathology of INS remain unknown but recent observations may provide important clues to the primary physiopathology of INS. Mutations in several podocyte proteins have been identified in families with inherited nephrotic syndrome, highlighting the central importance of the podocyte. Nephricin was the first slit-diaphragm protein identified as being involved in nephrotic syndrome [5], then others mutated proteins have been yet described in humans (Podocin [6], α -actinin-4 [7]). The role of podocyte proteins in the pathogenesis of sporadic cases requires further investigation. In opposition to the genetic form of INS, immune disorders have been suggested in the “idiopathic” form of the disease. A yet uncharacterized soluble factor which could alter capillary wall permeability and lead to albuminuria has been evoked. The most compelling evidences come from clinical observations: FSGS can recur immediately in a normal kidney after transplantation [8, 9] whereas a FSGS kidney transplanted into a patient without nephrotic syndrome becomes histologically normal and free of proteinuria [10]. This factor may cross the placenta to induce transient neonatal proteinuria [11, 12] and may circulate in association with immunoglobulins, in regards to the beneficial effects of different types of Ig depletion on the proteinuria [13, 14]. Although several candidates have been proposed [15-18], the nature of this permeability factor remains unknown.

In 1974, Shaloub postulated that “a systemic abnormality in lymphocyte function” could be a possible working hypothesis [19]. This proposal was based on the effect of treatment with steroids or cyclophosphamide, or after infection by “immunosuppressive” virus. However, the

precise molecular links between the immune system and INS remain elusive, despite differences between T cell phenotypes, cytokines expression and lymphocytes function have been noted during relapse and remission [20-23]. A Th2 polarization pattern of cytokine synthesis in disease relapses in steroid responsiveness patients have been also described [24-26], as well as association between relapse and allergies [27, 28]. Recently, a study showed transcriptional abnormalities in Tc-mip, a protein involved in c-maf-dependent Th2 signaling pathway in MCNS patients [29]. However, most of studies were carried out on the initial and steroid responsive MCNS but few of them were conducted on the post-transplantation relapse of FSGS [30, 31].

The aim of this work was to analyze some T cell immune correlating in FSGS patients with or without immediate relapse following transplantation, a situation considered to represent a characteristically active phase of the disease. We report here, for the first time, important alteration in the CD8 T cell compartment for cell surface markers, transcriptional profile and protein phosphorylation pattern. Collectively, our data suggest a dysfunction of CD8+ T cell regulation in “active” FSGS disease.

PATIENTS, MATERIAL AND METHODS

Patients. Nineteen kidney transplant recipients with biopsy proven cortico-resistant idiopathic nephrotic syndrome as original disease were studied (FSGS patients). These patients were divided in two groups according to the presence (Group R, n = 10) or the absence (Group NR, n = 9) of an immediate recurrence of the initial disease on the kidney graft. All patients received a cadaver kidney. The main clinical characteristics of these two groups are summarized in table I.

The recurrence was clinically defined by the occurrence of immediate nephrotic syndrome (above 3 g per day two weeks after transplantation) and confirmed by the evidence of podocyte foot processes at electronic examination. A third group (non-FSGS patients) consisted of proteinuric recipients in which the proteinuria was not related to INS (allograft glomerulopathy or recurrence of IgA nephritis, n=9). Patients of each group received the same immunosuppressive treatments and were roughly matched for age and sex. The absence of interfering infectious illness or other diseases was confirmed. Blood was collected at distance from induction treatments and transplantation, during a stable clinical situation (table I). All patients gave their informed consent to this study according to French legislation guidelines.

RNA extraction and cDNA synthesis. Thirty mL of blood were collected from a forearm vein into EDTA-containing tubes. Peripheral Blood Lymphocyte (PBL) were recovered after a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France). After washing, $5 \cdot 10^7$ cells were frozen in Trizol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, California) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. The other part of the cells were kept for CD4/CD8 selection. The RNA concentration for each sample was determined by optical density measurement and a quality control test on a 1% agarose gel was performed. Two µg of RNA were reverse transcribed using an Invitrogen cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 100 µL.

CD4 and CD8 T cell separation. CD4^{+ve} or CD8^{+ve} T cell purification was performed using MACS microbeads according to manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Germany). The kit consists in an indirect magnetic labelling system composed of a biotin-hapten-monoclonal antibody cocktail (anti CD8/CD4, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 and TCRγ/δ) and iron microbeads coupled with an anti-biotin antibody which enables the magnetic depletion of non-T cells. Briefly, cells were washed and incubated 10 min on ice with the hapten monoclonal antibody cocktail. After adding buffer and incubating with mouse monoclonal anti-biotin antibody 15 min on ice, cells were washed and resuspend in buffer. The labeled cells were depleted by passing the cells through a MACS column. Purity, determined by flow cytometry, was >90%.

Cytokine and protein transcript quantification. Cytokines and proteins transcription measurement was performed on RNA from CD4+ and CD8+ isolated T cells. Real time quantitative PCR was performed using TNFα, IFNγ, IL-4, IL-13, perforin, granzyme, MAPK9 (JNK-2), FOXP3 and CTLA-4 labeled Taqman® probes (table II). Target transcripts were amplified in 25 µL of PCR mix containing 11 µL diluted cDNA, 12.5 µL of Taqman Universal 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City) containing AmpliTaq Gold® DNA polymerase, dNTPs with dUTP and optimized buffer components, and 2.5 µL of 20X Taqman® probes. The step-cycle program was set for denaturing at 95°C for 15 sec, annealing and extension at 60°C for 1 min for a total of 40 cycles (ABI Prism 7900 sequence detection system; Applied Biosystems). The real-time PCR data were plotted as the ΔRn

fluorescence signal versus the cycle number. The Ct value is defined as the cycle number at which the ΔRn crosses a threshold. The threshold was set above the background fluorescence to intersect the exponential portion of the amplification curve. HPRT was used as an endogenous control to normalize RNA amounts. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) was used as an endogenous control gene to normalize for varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 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).

Flow cytometry. 2×10^5 cells per sample were centrifuged in 96-well microtiter plates. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were stained 30 min with the following phycoerythrin (PE), fluorescein isothiocyanate (FITC), or Antigen-Presenting Cell (APC) –conjugated Mabs: anti-CD4-APC, anti CD8-APC, anti CD3-FITC, anti CD45RA-FITC, anti CD28 FITC, anti CCR7-PE, anti CD62L-PE (Beckman Coulter, Marseille, France), anti CD25-PE, and anti DR-PE (BD Biosciences, Mountain View, CA). PE, APC or FITC-labeled mouse IgG1 was used as negative control. Antibodies combinations which have been associated in the literature with cellular function are indicated in table III. Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with PBS 1% formaldehyde. A FACScalibur cytofluorimeter was used and data were analysed using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Cells stimulation and Western Blot. PBMC were cultured at 37°C in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at a density of 2×10^6 cells/ml, in the presence or absence of 50ng/mL PMA (Phorbol Myristate Acetate) and 1µg/mL calcium ionophore (ionomycin) for 15 min and 30 min. Proteins were extracted with lysis buffer (Tris-HCl: 50 mM, pH 7.4, NP-40: 1%, NaCl: 150 mM, EDTA: 1 mM, PMSF: 1 mM, aprotinin, leupeptin, pepstatin: 1 µg/ml each, Na₃VO₄: 1 mM). After protein determination, samples were boiled for 5 minutes in Laemli buffer and run in reducing conditions on a 5-10% acrylamide gel. Proteins were then transferred to nitrocellulose paper, blocked with 5% dry milk in PBS 1X, and incubated for 2 hours with monoclonal antibody to phosphotyrosine (clone 4G10; UBI, Lake Placid, NY; 1:1000). The nitrocellulose paper was then washed in PBS 1X and incubated in horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:3000) for 1 hour.

Proteins were then visualized by enhanced chemiluminescence reagent (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL). The Kodak Digital analysis software (1D version) was used to analyze the scanned protein bands of 52 kDa. Bands intensities are expressed in Arbitrary Unit (AU).

Statistical analysis. Non parametric test (Mann-Whitney) was used for group comparisons; *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

The CD4+ T cell populations of patients with FSGS recurrence showed similar profile as non recurrent and non-FSGS patients.

We first characterized the CD4 T cells profile of FSGS patients after transplantation. CD4+ T cells phenotype of recurrent patients (R) was compared to non recurrent patients (NR) and non-FSGS patients with proteinuria (fig. 1). Concerning markers which have been associated with activation and regulation (table III), the three groups showed similar levels of CD4+CD28+ and CD4+DR+ T cells subsets. However, relapsing patients displayed significantly less CD4+CD45RA-CD62L+ T cells, associated with central memory, than non-FSGS patients (36±8% vs. 47±8%, *p*=0.04) but not than NR patients. No significant differences were observed in the others memory CD4+ T cell populations analyzed. Moreover, the two groups of proteinuric kidney recipients (R and non-FSGS) displayed significantly more CD4+CD25+ high than non proteinuric NR patients (8.2±1% and 8.5±1% vs. 4.2±0.7%, *p*=0.01 for both). This observation should be no specific since an increase of CD4+CD25+ have been related with renal dysfunction and creatinine levels [32]. Finally, no CD4+ T cell phenotype could discriminate patients with relapse from the two other groups.

CD8+ T cells from FSGS patients displayed less central memory and more naive T cells than non-FSGS proteinuric patients.

We then analyzed the CD8+ T compartment in FSGS and non-FSGS patients. Both FSGS patient groups showed a decrease in CD8+CD45RA-CD62L+ (central memory) T cells in comparison with non-FSGS patients, but the difference reached significance only for relapsing patients (7.8±3.3% vs. 17.8±9.9%, *p*=0.02). In addition, a significant increase in CD8+CD45RA+CD62L+ T cells (i.e. naive cells; 62.5%±12 vs. 47±12.9, *p*=0.01) was

observed in patients with relapse from non-FSGS patients but not from non recurrent patients (fig. 2). Associated with the decrease in CD4+CD45RA-CD62L+, the data suggest a different mobilization of memory T cells in FSGS and non-FSGS patients.

FSGS relapsing patients have a decrease number of circulating CD8+CD28- T cells.

The main difference associated with relapse was related to a decrease in the CD8+CD28- population. Relapsing patients displayed significantly less CD8+CD28- than non recurrent patients ($21.2\pm 3\%$ vs. $41.4\pm 6.2\%$, $p=0.007$). The difference was also significant compared to non-FSGS patients ($21.2\pm 3\%$ vs. $42.2\pm 5.6\%$, $p=0.02$) (fig. 3A and 3B), suggesting that CD8+CD28- T cells may exhibit regulatory function which could lack in relapsing patients. Conversely, the CD8+CD28+ T cells were decreased in both NR and non-FSGS patients compared to relapsing patients ($57.5\pm 18\%$ and $58.9\pm 17\%$ vs. $78.8\pm 10\%$, $p=0.007$ and $p=0.02$ respectively).

CD8+ T cells of relapsing patients show a down-regulation of CTLA-4 and MAPK9 mRNA.

As CD8+ T cell phenotype alteration was observed in patients with disease recurrence, a quantitative PCR analysis of several transcripts including Th1 and Th2 cytokines, cytotoxic associated proteins and proteins which have been linked to T cell regulation, was performed on CD4+ and CD8+ purified T cells from R and NR patients (fig 4). For the cytokine analysis, the level of IL-4 and IL-13 transcripts was undetectable in both groups. Similarly, no significant difference was observed in TNF α , IFN γ and FOXP3 mRNA levels (data not shown). Perforin and granzyme mRNA levels were low in CD4+ T cells and no difference between R and NR patients was observed. However, a highly significant decrease was found in perforin mRNA level of the CD8+ T cells of R patients, compared to NR patients (2.2 ± 1.5 vs. 8.24 ± 1.5 , $p=0.004$). In addition, CTLA-4 (0.09 ± 0.08 vs. 0.91 ± 0.4 , $p=0.01$) and MAPK9 (JNK-2; 0.37 ± 0.15 vs. 2.23 ± 0.98 , $p=0.009$) transcripts were also highly significantly decreased in the CD8+ T cells of relapsing patients. In fact, CTLA-4 transcripts were almost undetectable in the CD8+ T cells of R patients, whereas their CD4+ T cells displayed similar levels to those of NR patients. Taken collectively, these observations suggest a decrease in the transcription of some proteins involved in the CD8+ T cells regulation in active FSGS disease.

PBMC of relapsing patients displayed a different phosphorylation pattern after polyclonal stimulation.

To try to better document abnormalities in T cell activation associated with disease recurrence, PBMC from FSGS and non-FSGS patients were cultured with PMA and ionomycin and the protein phosphorylation patterns were analyzed. A first series of experiment was done on unstimulated CD4⁺ and CD8⁺ T cells from one representative patient of each group to assess the basal level of the tyrosine phosphorylated proteins in the both populations. As similar phosphorylation pattern was observed within the CD4⁺ and CD8⁺ of a same patient (fig 5A), unseparated PBMC were then used in a second series of experiments. PBMC from 4 patients for each group were incubated with PMA/ionomycin for 15 and 30 minutes and lysed; non-stimulated cells served as control. After migration, the lysates were revealed with an anti-phospho-tyrosine or with an anti-GAPDH antibodies (fig. 5B). At a basal level (unstimulated), the phosphorylation level of the different patients was elevated but the pattern remains roughly similar within the three studied groups. Moreover, after 15 to 30 minutes of stimulation, non-FSGS and non relapsing patients displayed a dephosphorylation of the majority of their proteins, whereas relapsing patients showed a persistence of phosphorylation, particularly for a protein of 52 kDa (apparent weight) (fig 5C), comforting the presence of abnormal activation, or regulation, in PBMC from relapsing patients.

DISCUSSION

The course of INS has been associated with a TH2 profile and, recently, with disorders in the CD4⁺ T cell. Although the role of CD8⁺ T lymphocytes in the progression of INS has also been postulated [20, 33], the involvement of these cells is to be determined. In this study, focusing on a population of patients with an immediate recurrence of the disease after transplantation, we have identified several CD8⁺ T cell abnormalities strongly associated with active disease. The T cell phenotype of relapsing patients (R) was compared with non relapsing FSGS patients (NR) and one group of proteinuric transplanted patient from other origin (non-FSGS). We showed that R patients displayed significantly less CD8⁺CD28⁻ T cells than NR and non-FSGS patients. The proportion of CD8⁺CD28⁻ T cells, known to increase with age [34], has also been shown to increase one year after transplantation [35]. Ages of patients of the different groups analyzed in this study were roughly matched and the

time interval between transplantation and blood harvesting was done more than one year after transplantation. Recent studies have demonstrated that some CD8⁺CD28⁻ could be suppressor T cells and play a role in controlling autoimmunity, allergy and transplant rejection [36, 37]. The incapacity to generate in vitro CD8⁺ suppressor T lymphocyte has been also correlated with the appearance of relapses in patients affected by autoimmune diseases [38, 39]. Lower level of CD8⁺ T suppressor cells in R patients could favor the development of immune response, as suggested by the increased incidence of allograft rejection in patients with relapsing FSGS [40].

In contrast, relapsing patients had more CD8⁺CD28⁺ T cells than the control groups. This T cell population is known to increase in response to T cell activation [41]. CD28 is a ligand for B7-1 which was recently found upregulated in podocytes during various genetic, drug induced, immune mediated and bacterial toxin model of nephrotic syndrome [42]. The hypothesis was that B7-1 up-regulation in podocytes may contribute to the pathogenesis of proteinuria by disrupting the glomerular filter. Our results suggest that a dysregulation of the CD8⁺CD28⁺ T cell population in relapsing patients could induce an over stimulation of the podocyte through B7-1 and lead to proteinuria. Nevertheless, a contact between B7-1 on the podocyte and CD28 on T lymphocyte appeared improbable since no cell infiltrate is observed in kidneys of FSGS patients. A soluble form of CD28, resulted from the shedding of the membrane form, could interact with B7.1 on the podocyte [43]. However, the analyse of CD28 soluble concentration in the sera of our three groups showed no significant difference between relapsing patients and controls (data not shown).

Among the CD8⁺ T cell population, differences were also found in memory T cells. Two major groups of CD8⁺ memory cells have been described: effector memory T cells (T_{EM}), able to immediately produce effector cytokines upon antigen recognition, allowing a rapid response to infections, and central memory T cells (T_{CM}) which have greater proliferative potential upon re-stimulation [44]. In our study, we found that FSGS patients displayed less central memory T cells (CD8⁺/CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺) and more naive T cells (CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) than non-FSGS patients, suggesting a slow maturation of naive T cells in FSGS patients.

To better document the abnormal CD8⁺ T cells of relapsing patient, mRNA from cytokines and protein involved in T cell regulation were quantified on purified CD4⁺ and CD8⁺ cells. Interestingly, CTLA-4 mRNA was down-regulated in the CD8⁺ of relapsing patients, as well as MAPK9, also known as JNK2. CTLA-4 is a co-ligand on activated T cells that also binds to B7-1 and is believed to deliver a negative signal to CD28⁺ T cell

population. CTLA-4 is also a marker of regulatory T cells [45]. A decrease of CTLA-4 level in CD8⁺ cells of relapsing patients may reflect an impaired capacity to regulate the CD28⁺ T cell population.

The c-jun NH2 terminal kinase (JNK) signalling pathway is induced by cytokines and stress stimuli and has been implicated in cell death and differentiation [46]. JNK-1 and JNK-2 have been shown to play modulating role during T cell activation and: an absence of JNK-2 has been associated with an increased in IL-2 production and proliferation of CD8⁺ T cells [47]. The significant decrease in MAPK9 transcripts observed in the CD8⁺ T cells of relapsing patients could further contribute to the hyper proliferation of these cells in active FSGS.

Activation profile of T cells of relapsing and control patients were also observed when patient PBL were stimulated with PMA and ionomycin. The basal level of tyrosine phosphorylation was high in the three groups suggesting an activation of T cells, probably due to the transplantation process. However, after stimulation, only PBMC from relapsing patients showed a persistence of tyrosine phosphorylated proteins. In contrast, the two other groups displayed a profound dephosphorylation after 15 and 30 minutes of stimulation. In resting T lymphocytes, TCR and CD28 activation also leads to the phosphorylation of different proteins in the first 15 minutes and to a dephosphorylation at 30 minutes [48]. In transplanted patients, the PMA/ionomycin activation was applied on PBMC already activated and lead directly to a dephosphorylation process in control groups at T15 and T30, perhaps to down-regulate the activation. In recurrent patients, this absence of down-regulation of tyrosine phosphorylation, suggests a defect in tyrosine phosphatases.

In conclusion, we have shown that recurrence of FSGS after transplantation is associated with several significant changes in CD8⁺ T cells including a decrease in CD8⁺CD28⁻ T lymphocytes and abnormalities in regulation of T cell activation. Our data suggest that CD8⁺ T cells may play a role in the recurrence of INS after transplantation, although a link between these observations and the podocyte damages is to be determined.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by the “Fondation Progreffe”. We thank Bernard Vanhove for his technical help, Joanna Ashton for editing the manuscript, Dr Westeel P.F. (Amiens, France), Pr Merville P. (Bordeaux, France) and Pr Bourbigot D. (Brest, France) for clinical data harvesting.

REFERENCES

1. Rich AR: A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 100:173-186, 1957
2. Schachter AD, Harmon WE: Single-center analysis of early recurrence of nephrotic syndrome following renal transplantation in children. *Pediatr Transplant* 5:406-409, 2001
3. Briganti EM, Russ GR, McNeil JJ, et al.: Risk of renal allograft loss from recurrent glomerulonephritis. *N Engl J Med* 347:103-109, 2002
4. Ingulli E, Tejani A: Incidence, treatment, and outcome of recurrent focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation in 42 allografts in children--a single-center experience. *Transplantation* 51:401-405, 1991
5. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al.: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1:575-582, 1998
6. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al.: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24:349-354, 2000
7. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al.: Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 24:251-256, 2000
8. Hoyer JR, Vernier RL, Najarian JS, et al.: Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. 1972. *J Am Soc Nephrol* 12:1994-2002, 2001
9. Hamburger J, Crosnier J, Noel LH: Recurrent glomerulonephritis after renal transplantation. *Annu Rev Med* 29:67-72, 1978
10. Rea R, Smith C, Sandhu K, et al.: Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16:416-417, 2001
11. Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE: Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 344:386-387, 2001
12. Lagrue G, Branellec A, Niaudet P, et al.: [Transmission of nephrotic syndrome to two neonates. Spontaneous regression]. *Presse Med* 20:255-257, 1991
13. Dantal J, Godfrin Y, Koll R, et al.: Antihuman immunoglobulin affinity immunoadsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 9:1709-1715, 1998
14. Dantal J, Bigot E, Bogers W, et al.: Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med* 330:7-14, 1994
15. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, et al.: Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 334:878-883, 1996
16. Bakker WW, Baller JF, van Luijk WH: A kallikrein-like molecule and plasma vasoactivity in minimal change disease. Increased turnover in relapse versus remission. *Contrib Nephrol* 67:31-36, 1988
17. Tanaka R, Yoshikawa N, Nakamura H, et al.: Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats. *Nephron* 60:35-41, 1992
18. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, et al.: Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int* 57:1512-1520, 2000
19. Shalhoub RJ: Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2:556-560, 1974

20. Frank C, Herrmann M, Fernandez S, et al.: Dominant T cells in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 57:510-517, 2000
21. Matsumoto K, Kanmatsuse K: Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients. *Nephron* 88:334-339, 2001
22. Cunard R, Kelly CJ: T cells and minimal change disease. *J Am Soc Nephrol* 13:1409-1411, 2002
23. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, et al.: Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12:1648-1658, 2001
24. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, et al.: Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol* 10:529-537, 1999
25. Tain YL, Chen TY, Yang KD: Implications of serum TNF-beta and IL-13 in the treatment response of childhood nephrotic syndrome. *Cytokine* 21:155-159, 2003
26. Stachowski J, Barth C, Michalkiewicz J, et al.: Th1/Th2 balance and CD45-positive T cell subsets in primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 14:779-785, 2000
27. Florido JF, Diaz Pena JM, Belchi J, et al.: Nephrotic syndrome and respiratory allergy in childhood. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2:136-140, 1992
28. Lagrue G, Laurent J, Rostoker G: Food allergy and idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney Int Suppl* 27:S147-151, 1989
29. Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B, et al.: NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *J Immunol* 172:688-698, 2004
30. Bariety J, Bruneval P, Hill G, et al.: Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12:261-274, 2001
31. de Oliveira JG, Xavier P, Carvalho E, et al.: T lymphocyte subsets and cytokine production by graft-infiltrating cells in FSGS recurrence post-transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 14:713-716, 1999
32. Bas J, Mestre M, Grinyo JM, et al.: Peripheral blood lymphoid subsets and long-term clinical course of kidney recipients: a longitudinal study. *Cytometry* 34:103-112, 1998
33. Wang Y, Wang YP, Tay YC, et al.: Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 59:941-949, 2001
34. Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, et al.: T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci* 7:d1056-1183, 2002
35. Colovai AI, Mirza M, Vlad G, et al.: Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64:31-37, 2003
36. Sakaguchi S: Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458, 2000
37. Shevach EM: Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18:423-449, 2000
38. Balashov KE, Khoury SJ, Hafler DA, et al.: Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis. *J Clin Invest* 95:2711-2719, 1995
39. Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, et al.: Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 166:6452-6457, 2001
40. Kashtan CE, McEnery PT, Tejani A, et al.: Renal allograft survival according to primary diagnosis: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol* 9:679-684, 1995

41. June CH, Ledbetter JA, Linsley PS, et al.: Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11:211-216, 1990
42. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, et al.: Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 113:1390-1397, 2004
43. Hebbar M, Jeannin P, Magistrelli G, et al.: Detection of circulating soluble CD28 in patients with systemic lupus erythematosus, primary Sjogren's syndrome and systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 136:388-392, 2004
44. Seder RA, Ahmed R: Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 4:835-842, 2003
45. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, et al.: Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and antigen specific CD4(+)CD25(+) and CD8(+)CD28(-) T suppressor cells. *Hum Immunol* 65:1297-1306, 2004
46. Dong C, Davis RJ, Flavell RA: MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20:55-72, 2002
47. Conze D, Krahl T, Kennedy N, et al.: c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have distinct roles in CD8(+) T cell activation. *J Exp Med* 195:811-823, 2002
48. Ward SG, Reif K, Ley S, et al.: Regulation of phosphoinositide kinases in T cells. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is not a substrate for T cell antigen receptor-regulated tyrosine kinases. *J Biol Chem* 267:23862-23869, 1992

Legends

Table I. Main clinical characteristics of the patients for the three groups.

CS: Corticosteroids MMF: Mycophenolate Mofetil AZA: Azathioprin ATG: Anti-Thymocyte-Globulin ALG: Anti-Lymphocyte Globulin

Table I. Hervé et al.

Groups	Relapse	Non Relapse	Non-FSGS
Gender	5F/5M	4F/5M	5F/4M
Mean age (years)±S.E	34.5±4.8	40.3±3.7	37.4±4.5
Time after Tx (months) ±S.E	38.9±13	75.1±17.4	76.4±17.6
Serum creatinine (µmol/L)	276.75 ±77	130.13 ±0.06	283.4 ±32
Proteinuria (g/day)	7.39 ±2	0.21 ±0.06	2.49 ± 3.4
Calcineurin inhibitors	10/10	9/9	9/9
CS	6/10	3/9	2/9
MMF	6/10	5/9	4/9
AZA	1/10	4/9	3/9
Polyclonal antibodies (ATG, ALG)	3/10	4/9	4/9

Table II. Probes sequences used for cytokine and protein transcripts quantification

Table II. Hervé et al.

Gene Symbol	Gene Name	Probe Sequence
TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	ATGTTGTAGCAAACCCCTCAAGCTGA
IFNG	interferon, gamma	ATATTTTAATGCAGGTCATTGAGAT
IL4	interleukin 4	GCGGGCTTGAATCCTGTCTGTGA
IL13	interleukin 13	GAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAAT
PRF1	perforin 1 (pore forming protein)	GGAGTGCCGCTTCTACAGTTTCCAT
GZMB	granzyme B	AAGACTTCCTTTAAGGGGGACTCTG
CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	TGCTTCTGCAAAGCAATGCACGTG
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	GATTGTTTGTGCTGCATTTGATACA
FOXP3	forkhead box P3	ATCCGCTGGGCCATCCTGGAGGCTC
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GGTCAAGGTCGCAAGCTTGCTGGTG

Table III. Summary of the different T cell surface markers used and their current associated functions.

Table III. Hervé et al.

T CELL MARKERS		ASSOCIATED FUNCTION
CD4/CD8	CD45RA ⁺ CD62L ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ CD45RA ^{+/-} CD62L ⁻	Naive memory T cells Central memory T cells (1) Effector memory T cells
CD4/CD8	DR ⁺	Activated T cells
CD4 CD8	CD25 ⁺	Regulatory T cells (2,3) Activated T cells (4)
CD4/CD8 CD8	CD28 ⁺ CD28 ⁻	Activated T cells Regulatory T cells (5,6)

1- Dieckmann D., *J Exp Med* Jun 4;193(11):1303-10, 2001

2- Baecher-Allan C., *J Immunol* Aug 1;167(3):1245-53, 2001

3- Sallusto F, *Nature* Oct 14;401(6754):708-12, 1999

4- Hall C., *N Engl J Med* 315: 77-81, 1986

5- Liu Z., *International Immunol* Jun;10(6):775-83, 1998

6- Suciú-Foca N., *Transpl Immunol* Jul-Sep;11(3-4):235-44, 2003

Figure 1. T cells surface markers in the CD4⁺ population of FSGS patients after transplantation. Analysis was performed by flow cytometry on separated CD4⁺ T cells using a negative selection. The CD4⁺ subset associated with the cluster of surface marker used are mentioned in Table III. The results are expressed as the percentage of positive cells \pm S.E. amongst the gated CD4⁺ T cells. The non parametric Mann-Witney test was performed to compare values of the relapsing group (R, n=10) vs. non relapsing group (NR, n=9) and non-FSGS group (n=9). *, $p < 0.05$.

Figure 1. Hervé et al.

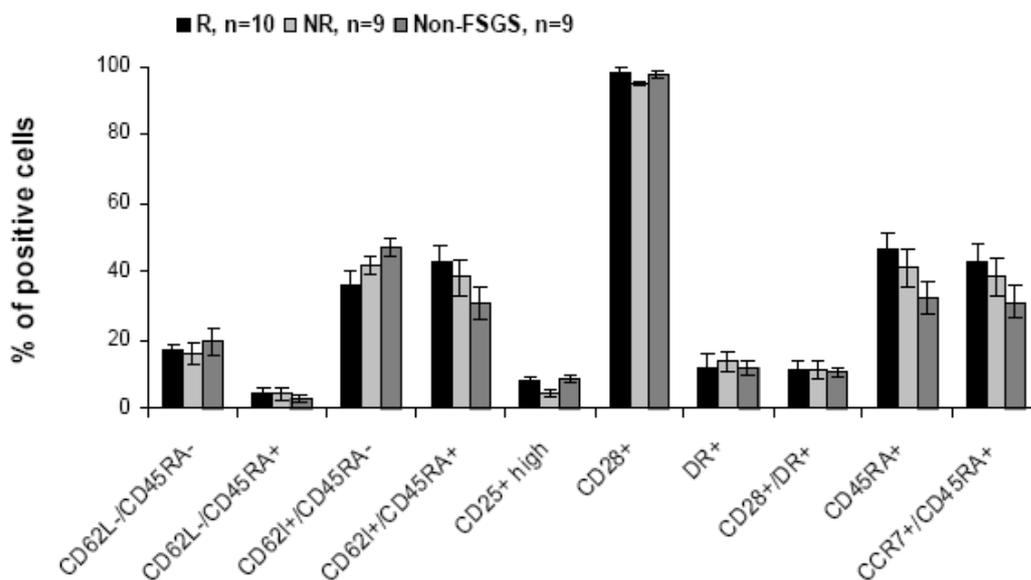


Figure 2. CD8+ memory T cells in FSGS patients and proteinuric control after transplantation. CD8+ T cells were purified from blood from patients of the three groups. A flow cytometry analysis was performed for the CD8, CD45RA and CD62L T cells surface marker. The results are expressed as the percentage of positive cells amongst the gated CD8+ T cells. A bar indicated the median range for each group. The non parametric Mann-Witney test was performed to compare values of the R group (n=10) vs. NR group (n=9) and non-FSGS group (n=9). *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$

Figure 2. Hervé et al.

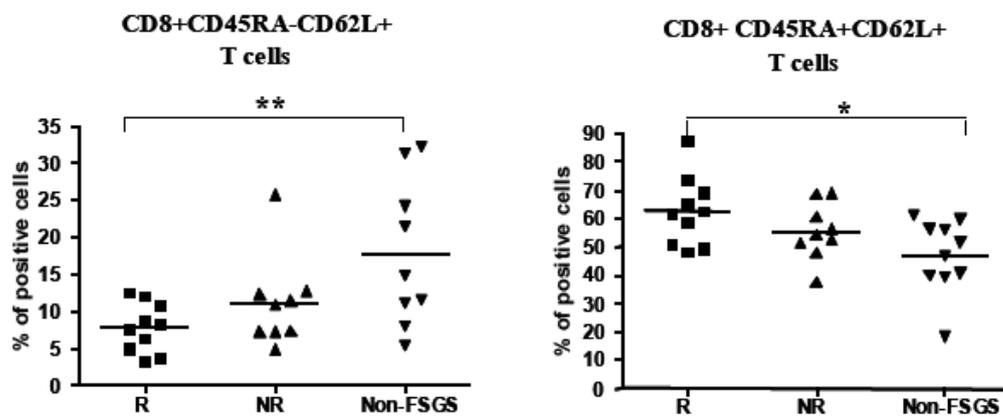


Figure 3. Recurrent patients displayed significantly less peripheral CD8+CD28- T cells after transplantation than Non Recurrent and non-FSGS control groups. PBMC from all the patients were extracted after transplantation and CD8+ were purified with a negative separation. Flow cytometry was then performed on CD8 and CD28 cell surface markers. A: Representation of the CD8 and CD28 distribution for a representative patient in each group. CD8+CD28- T cells are indicated with a black square and the percentage of positive cells is written beside. B: Statistical analysis of the percentage of CD8+CD28- positive T cells in the three groups: R group (n=10) vs. NR group (n=9) and non-FSGS group (n=9). The non parametric Mann-Witney test was performed. *, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$

Figure 3. Hervé et al.

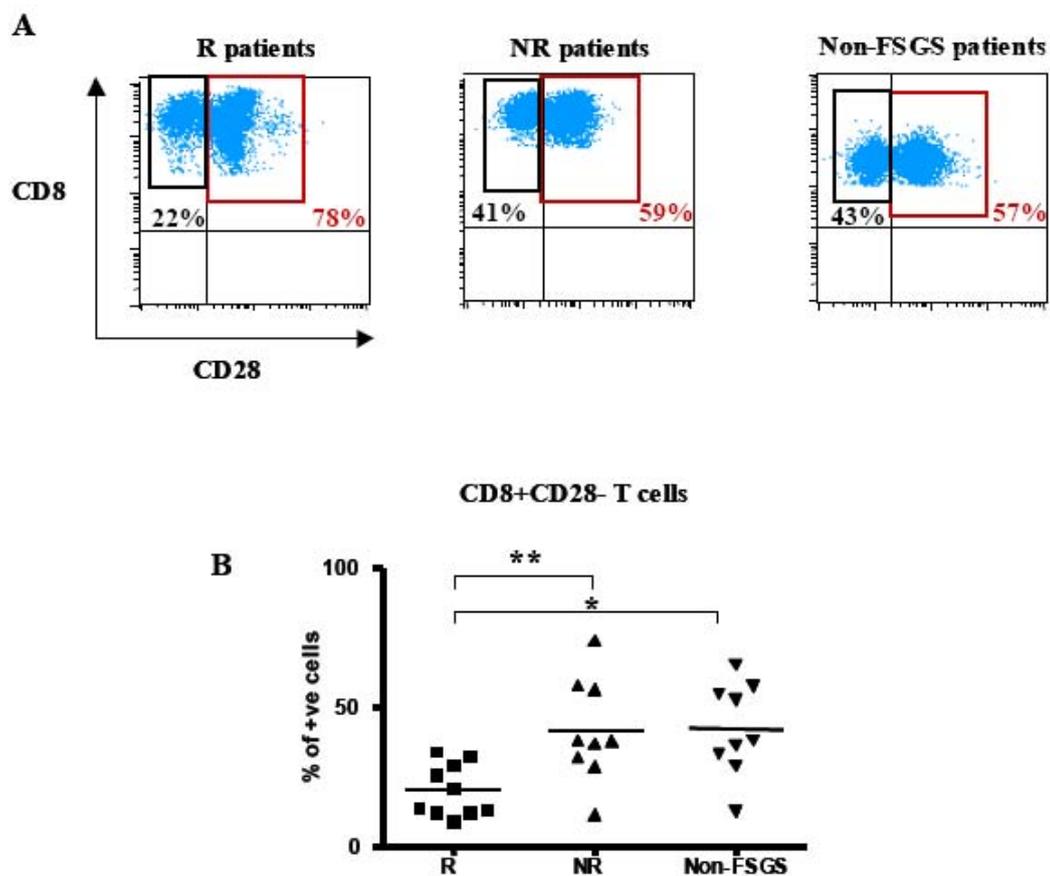


Figure 4. Quantitative mRNA expression of different proteins and cytokines in CD4+ and CD8+ purified T cells in FSGS patients after transplantation. cDNA from purified peripheral CD8+ and CD4+ T cells was synthesized and analyzed with perforin, granzyme, MAPK9 and CTLA-4 primers. A bar indicated the median range for each group. The non parametric Mann-Witney test was performed to compare values of the R group (n=6) vs. NR group (n=6).*, p<0.05 and **, p<0.01.

Figure 4. Hervé et al.

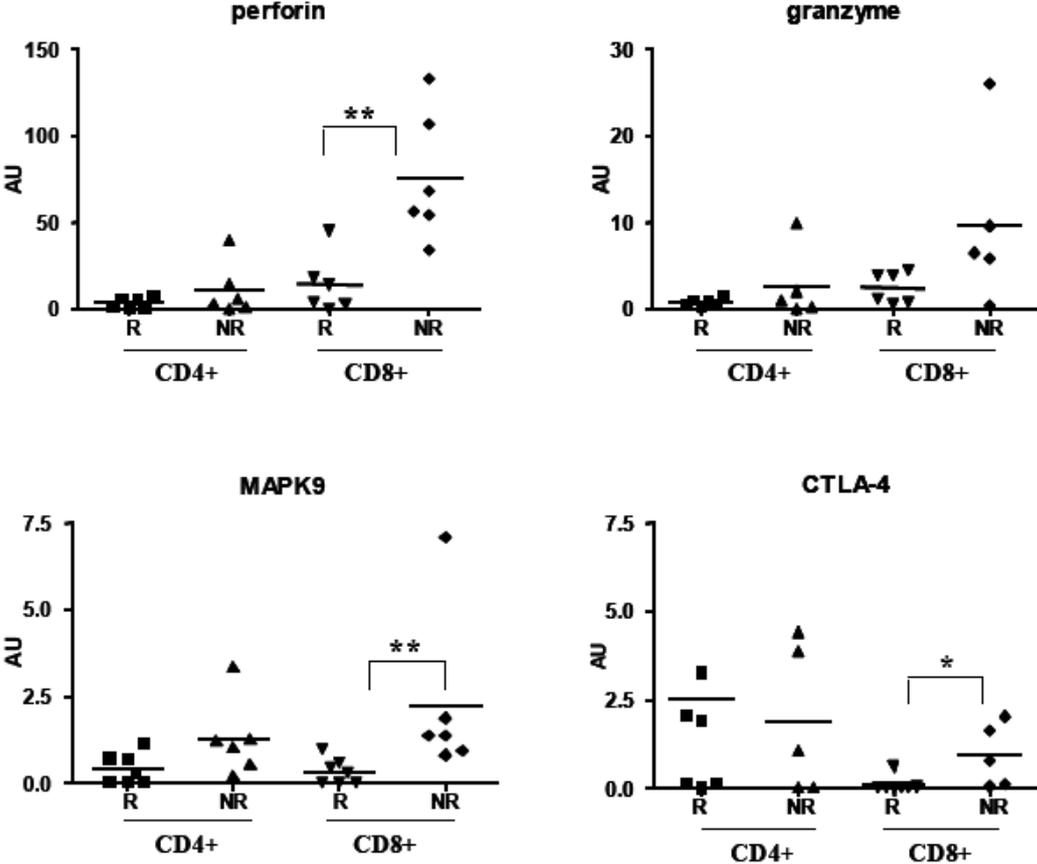
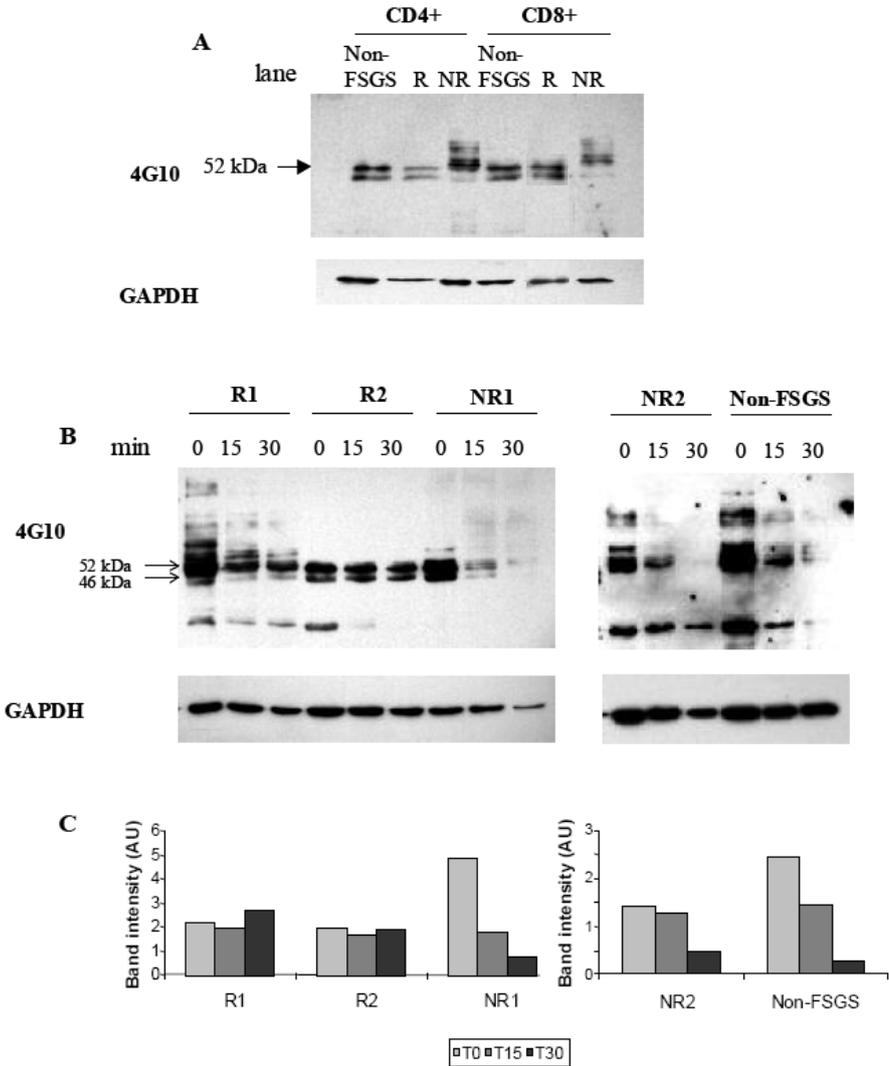


Figure 5. Tyrosine phosphorylation pattern in peripheral cells from FSGS patients and non-FSGS proteinuric patients after transplantation.

A: CD4+ and CD8+ T cells were purified from non-stimulated PBMC and lysed. Protein extracts were separated on a SDS page gel and revealed with an phospho-tyrosine antibody (4G10) or a GAPDH antibody (housekeeping protein). CD4+ and CD8+ T cell extract from non-FSGS patient, R patient and NR patient are represented respectively. **B:** PBMC from representative FSGS patients (2R and 2NR) and one control group (non-FSGS) were stimulated with 50ng/mL PMA and 1mg/mL calcium ionophore for 15 min and 30 min. Protein lysates were separated on a SDS-PAGE gel and revealed with a phospho-tyrosine antibody (4G10) or a GAPDH antibody (housekeeping protein) (representative immunoblot). Non stimulated PBMC (t0) served as control. **C:** Band densities of the 52 kDa protein quantified by using Kodak Digital analysis software (1D version).

Figure 5. Hervé et al.



Etudes d'un protocole clinique de minimisation des corticostéroïdes et de la tolérance opérationnelle chez des patients transplantés rénaux

L'objectif du traitement d'un malade greffé est l'induction d'une tolérance spécifique du donneur ou tout au moins l'amélioration de la survie à long terme des greffons. Deux protocoles cliniques ont ainsi été mis en place. 1) Les stéroïdes engendrant de multiples effets secondaires, un protocole randomisé de traitement sans corticoïdes a été analysé chez des patients recevant une immunosuppression initiale par du sérum anti-lymphocytaire avec ou sans stéroïdes. Un suivi clinique et biologique (phénotype et transcriptome des cellules sanguines) a été réalisé. 2) La tolérance opérationnelle, définie comme l'acceptation à long terme d'un greffon à fonction stable sans immunosuppression, est rare en transplantation rénale. L'étude de ces patients tolérants a permis d'identifier, dans leur sang, un profil phénotypique particulier différent de celui du rejet chronique. Une telle « signature » dans le sang pourrait aider au diagnostic et à l'ajustement thérapeutique des patients greffés.

Mots-clés: corticostéroïdes, sérum anti-lymphocytaire, tolérance, transplantation rénale

Studies of a clinical protocol aimed to avoid corticosteroids and of the operational tolerance in kidney allograft recipients.

The aim of the treatment in transplantation is the induction of a tolerance specific to the donor or, at least, the improvement of long-term graft survival. Thus two clinical protocols were developed. 1) Because corticosteroids induce many side-effects, a randomized protocol without steroids was analyzed in kidney recipients receiving an initial immunosuppression with anti-lymphocyte antibodies associated or not with corticosteroids. A follow-up of clinical and biological data (phenotypical and transcriptional pattern of blood cells) was achieved. 2) Operational tolerance, which is defined as the long-term graft acceptance with a stable function and without immunosuppression, is rare in kidney transplantation. The study of these patients allowed to identify, in their blood, a particular phenotypical profile different from that of the chronic rejection. Such a fingerprint in the blood of kidney recipients may help for the diagnostic and to adjust the treatment in transplanted patients.

Keywords: corticosteroids, antithymoglobulin, tolerance, kidney transplantation