

UNIVERSITE DE NANTES  
FACULTE DE MEDECINE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA TOLERANCE EN ALLOTRANSPLANTATION

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale de CHIMIE BIOLOGIE**

*Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé*

***Spécialité : Immunologie***

Présentée et soutenue publiquement par

***Gwenaëlle ROUSSEY-KESLER***

Le 29 juin 2005, devant le jury ci-dessous

**Président :**

**Rapporteurs**

Pierre COCHAT, Professeur, Lyon

Lionel ROSTAING, Professeur, Toulouse

**Examineurs**

Michel GOLDMAN, Professeur, Bruxelles

Alain MOUZARD, Professeur, Nantes

**Directeur de thèse** Jean-Paul SOULILLOU, Professeur, Nantes

## SOMMAIRE

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABREVIATIONS.....</b>                                                                                                                  | <b>4</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES.....</b>                                                                                                             | <b>5</b>  |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>                                                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>AVANT PROPOS .....</b>                                                                                                                 | <b>6</b>  |
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                                                                                                  | <b>7</b>  |
| 1. L'ALLOTRANSPLANTATION .....                                                                                                            | 7         |
| 2. LA RECONNAISSANCE IMMUNE.....                                                                                                          | 8         |
| 2.1. <i>Le complexe TCR/CMH/Peptide</i> .....                                                                                             | 9         |
| 2.2. <i>L'activation du lymphocyte T</i> .....                                                                                            | 12        |
| 2.3. <i>Les cellules dendritiques</i> .....                                                                                               | 14        |
| 3. L'ALLORECONNAISSANCE .....                                                                                                             | 15        |
| 3.1. <i>L'alloreconnaissance indirecte</i> .....                                                                                          | 16        |
| 3.2. <i>L'alloreconnaissance directe</i> .....                                                                                            | 16        |
| 3.3. <i>Rôle des reconnaissances directe et indirecte dans le rejet d'allogreffe</i> .....                                                | 18        |
| 3.4. <i>Effets de la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur</i> .....                                                 | 22        |
| 4. LE REJET D'ALLOGREFFE .....                                                                                                            | 27        |
| 4.1. <i>Le rejet vasculaire hyperaigu et aigu:</i> .....                                                                                  | 27        |
| 4.2. <i>Le rejet cellulaire aigu</i> .....                                                                                                | 28        |
| 4.3 <i>La dysfonction chronique du greffon ou néphropathie chronique d'allogreffe</i><br><i>(Chronic allograft Nephropathy CAN)</i> ..... | 29        |
| 4.4 <i>L'évolution des traitements immunosuppresseurs</i> .....                                                                           | 31        |
| 5. LA TOLÉRANCE .....                                                                                                                     | 32        |
| 5.1. <i>La tolérance au soi</i> .....                                                                                                     | 32        |
| 5.2. <i>La tolérance en allotransplantation</i> .....                                                                                     | 33        |
| 6. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA TOLÉRANCE.....                                                                                            | 34        |
| 6.1. <i>Délétion clonale et chimérisme</i> .....                                                                                          | 37        |
| 6.2. <i>L'anergie</i> .....                                                                                                               | 38        |
| 6.3. <i>L'ignorance</i> .....                                                                                                             | 38        |
| 6.4. <i>La régulation</i> .....                                                                                                           | 38        |
| 7. LES MODÈLES D'INDUCTION DE TOLÉRANCE EN TRANSPLANTATION .....                                                                          | 45        |
| 7.1. <i>Induction de tolérance sans greffe de moelle osseuse</i> .....                                                                    | 46        |
| 7.2 <i>Induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse</i> .....                                                                     | 52        |
| 8. CONCEPT DE « TOLÉRANCE PARTIELLE» .....                                                                                                | 59        |
| 9. LA TOLÉRANCE SPONTANÉE D'ALLOGREFFE.....                                                                                               | 60        |
| 9.1 <i>Dans les modèles animaux</i> .....                                                                                                 | 60        |
| 9.2. <i>Chez l'homme</i> .....                                                                                                            | 61        |
| 10. LES MARQUEURS DE LA TOLÉRANCE .....                                                                                                   | 64        |
| <b>RESULTATS .....</b>                                                                                                                    | <b>69</b> |

|                                                                                                                                          |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| EXHAUSTIVE DEPLETION OF GRAFT RESIDENT DENDRITIC CELLS: MARGINALLY DELAYED<br>REJECTION BUT STRONG ALTERATION OF GRAFT INFILTRATION..... | 71         |
| <i>DISCUSSION</i> .....                                                                                                                  | 99         |
| CLINICAL OPERATIONAL TOLERANCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION.....                                                                         | 102        |
| HUMORAL AND CELLULAR RESPONSE TO INFLUENZA VACCINATION IN HUMAN RECIPIENTS<br>NATURALLY TOLERANT TO A KIDNEY ALLOGRAFT. ....             | 137        |
| <i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</i> .....                                                                                                  | 167        |
| <b>CONCLUSION</b> .....                                                                                                                  | <b>170</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....                                                                                                               | <b>172</b> |
| <b>ANNEXES</b> .....                                                                                                                     | <b>204</b> |

## ABREVIATIONS

|                                                                                |                                                 |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| ADNc: Acide DexosyriboNucléique complémentaire                                 | IL: Interleukine                                |
| Ac : Anticorps                                                                 | ILT : Immunoglobulin Like Transcript            |
| AICD: Activation-Induced Cell Death : mort cellulaire induite par l'activation | KO : Knock-Out                                  |
| Ag : Antigène                                                                  | LS: Long Survivants                             |
| ARNm : Acide RiboNucléique messenger                                           | MLR : Réaction Mixte Lymphocytaire              |
| ATG: Anti-ThymoGlobulines                                                      | MMF: Mycophenolate Mofetil                      |
| AZA : Azathioprine                                                             | MO: Moelle Osseuse                              |
| CAN: Néphropathie Chronique d'Allogreffe                                       | NK: Natural Killer                              |
| CD : Cluster de Différenciation                                                | NO : Monoxyde d'azote                           |
| CDR : Complement Determining Region                                            | RAG : Gène d'Activation de la Recombinase       |
| CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité                                      | RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction    |
| CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène                                          | SCID : Déficit Immunitaire Combiné Sévère       |
| CTLA4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4                            | TCR: T Cell Receptor: Récepteur du lymphocyte T |
| CS : Corticostéroïdes                                                          | TGF : Transforming Growth Factor                |
| CsA : Ciclosporine A                                                           | TLR : Toll-like Receptor                        |
| DST: Transfusion de sang Spécifique du Donneur                                 | TNF: Tumor Necrosis Factor                      |
| FoxP3 : Forkhead box P3                                                        | Treg : lymphocytes T régulateurs                |
| GITR : Glucocorticoids Induced TNF Related-Receptor                            |                                                 |
| GVH: réaction du Greffon Versus Hôte                                           |                                                 |
| HLA : Antigène Leucocytaire Humain                                             |                                                 |
| HO-1: Heme Oxygenase-1                                                         |                                                 |
| HPRT : Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase                                 |                                                 |
| IDO : Indoléamine 2 ,3 DiOxygenase                                             |                                                 |
| IFN: Interféron                                                                |                                                 |

# **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Représentation d'un complexe TCR/CMH/peptide

Figure 2 : Les principales voies de costimulation

Figure 3 : Implication des voies de présentations directe et indirecte dans le rejet aigu d'allogreffe

Figure 4 : Les mécanismes impliqués dans la tolérance

Figure 5 : La tolérance « infectieuse » ou linked-suppression

Figure 6 : Représentation tridimensionnelle par le TcLandscape du répertoire du récepteur des lymphocytes T chez un patient « opérationnellement tolérant » et chez un volontaire sain.

# **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Effets de la déplétion du greffon en cellules dendritiques du donneur

Tableau 2 : Principales cellules régulatrices décrites chez l'animal et chez l'homme, ayant une implication en allotransplantation

Tableau 3 : Protocoles d'induction de tolérance sans greffe de moelle osseuse chez le primate et chez l'homme

Tableau 4 : Induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse chez le primate

Tableau 5 : Protocoles d'induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse chez l'homme

Tableau 6 : Tolérance opérationnelle en transplantation rénale chez l'homme

## **AVANT PROPOS**

La transplantation rénale est le traitement privilégié en cas d'insuffisance rénale terminale. En effet elle réduit la morbidité et la mortalité liées à cette pathologie et améliore de façon notable la qualité de vie des patients. Elle est particulièrement indiquée chez les enfants car elle assure un meilleur développement psychologique et cognitif ainsi qu'une meilleure insertion sociale et professionnelle que les autres techniques de suppléance rénale. Cependant, une transplantation d'organe implique l'administration de traitement immunosuppresseur au long cours, source de complications infectieuses, tumorales ou métaboliques, et qui ne prévient pas l'apparition et le développement d'une dysfonction chronique du greffon. L'objectif thérapeutique serait donc d'induire un état dit de tolérance opérationnelle, état où le receveur accepterait le greffon sans immunosuppression non spécifique prolongée.

Le thème principal de ce travail porte sur cette tolérance opérationnelle en allotransplantation. La thèse comprend deux parties correspondant en fait à deux périodes interrompues partiellement pour terminer, entre autres, mon internat de pédiatrie. La première partie porte sur le rôle des cellules dendritiques du donneur, impliquées dans l'alloreconnaissance directe, dans un modèle animal d'allotransplantation où elles sont indispensables pour l'induction de tolérance. Désirant ensuite réorienter mon travail vers un thème plus proche d'une application clinique, je me suis intéressée dans la deuxième partie à la tolérance opérationnelle observée chez des rares sujets transplantés rénaux. La description d'une cohorte de patients présentant de telles caractéristiques est ainsi rapportée, à la recherche de caractéristiques cliniques, thérapeutiques ou immunologiques communes. De plus, le statut immunitaire de ces patients « opérationnellement tolérants » est particulièrement important à déterminer afin de préciser si leur état de tolérance est secondaire à une immunodépression globale ou s'il est spécifique du greffon. Un élément de réponse peut être apporté par l'étude de leur réponse à une stimulation immune connue, la vaccination anti-grippale.

# **INTRODUCTION**

## **1. L'allotransplantation**

La transplantation se définit comme le transfert de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu, le donneur, chez un autre individu, le receveur. Dans le cas de cellules ou de tissus, on parle plus volontiers de greffe.

Si le donneur est lui-même le receveur (cas possible lors de greffe de moelle osseuse), on parle d'autogreffe. Lorsque le donneur et le receveur sont deux individus génétiquement différents mais appartenant à la même espèce, il s'agit alors d'allogreffe (cas le plus fréquent en transplantation d'organe chez l'homme). Si les espèces sont différentes, il s'agit alors de xénogreffes.

La transplantation représente le traitement de choix pour la défaillance de nombreux organes, soit parce qu'elle permet une restauration des fonctions vitales en l'absence d'autre traitement de suppléance connu (insuffisance cardiaque, respiratoire ou hépatique terminale), soit parce qu'elle améliore notablement la qualité de vie et le pronostic vital à long terme (cas de la transplantation rénale). Les premières greffes de rein réalisées avec succès ont eu lieu à Boston en 1959 (2) puis en France avec Hamburger. Quelques années plus tard, les greffes de foie en 1967 (3) puis de cœur en 1968 (4,5) ont élargi le champ de la transplantation. Cette modalité thérapeutique s'est développée au fil des ans grâce à la mise en place de structures promouvant le don d'organes et grâce à l'apparition de traitements immunosuppresseurs efficaces. Depuis 1959, plus d'un demi-million de transplantations rénales ont été réalisées à travers le monde (6). En France, en 2003, 3410 greffes d'organes ont été réalisées : 62% d'entre elles sont des transplantations rénales, 24% des transplantations hépatiques et 11% des transplantations cardio-pulmonaires (Rapport d'Activités 2003 de l'Etablissement Français des Greffes).

Un des obstacles à la transplantation est la survenue de rejets en l'absence de traitement adapté, ou même malgré lui, entraînant la destruction de l'organe greffé. Il existe plusieurs types de rejets qui résultent tous de la reconnaissance des

alloantigènes portés par le greffon par le système immunitaire du receveur. Le pronostic de la greffe et donc la « durée de vie » du greffon dépend de la réponse immunologique du receveur, mais aussi de nombreux autres facteurs, tels que la nature du donneur (vivant ou cadavérique), la qualité du greffon, les phénomènes d'ischémie-reperfusion, la récurrence éventuelle de la maladie initiale sur le greffon. Tous ces facteurs étant souvent intriqués et associés, il est difficile de préciser l'impact d'une seule stratégie thérapeutique sur l'évolution des greffons chez l'homme. Les modèles animaux permettent d'apporter des éléments de compréhension en étudiant des situations où peu de paramètres sont modifiés à chaque fois. Les mécanismes immunitaires fondamentaux peuvent alors être appréhendés, même si leur extrapolation chez l'homme doit rester prudente.

## 2. La reconnaissance immune

La réponse immunitaire fait intervenir deux types de mécanismes : l'immunité naturelle (ou innée) et l'immunité acquise adaptative. La première repose principalement sur la reconnaissance de motifs hautement conservés spécifiques d'organismes microbiens (appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns ou PAMPs). Ces motifs sont reconnus par des récepteurs (Pattern Recognition Receptors : PRRs) qui, en présence de leur ligand, vont entraîner une cascade de réactions inflammatoires, où interviennent entre autres la phagocytose et l'activation du complément. Parmi ces récepteurs, les Toll-Like Receptors (TLR) ont fait l'objet d'études approfondies ces dernières années (7). Ils sont exprimés sur les cellules épithéliales (épithélium digestif et pulmonaire notamment), les cellules endothéliales vasculaires, les cellules hématopoïétiques, les cellules dendritiques et les lymphocytes B. Il existe une dizaine de TLR identifiés chez l'homme, chacun reconnaissant des motifs différents (par exemple, les LipoPolySaccharides sont reconnus par le TLR4) (8). La signalisation par les TLR entraîne une activation du système inné avec la production de cytokines inflammatoires (Interleukine IL-1 $\beta$ , IL6, Tumeur Necrosis Factor TNF) et de chemokines (comme MIP1 $\alpha$ , MCP-1) ce qui permet un recrutement de polynucléaires neutrophiles et l'activation des macrophages. La dichotomie entre immunité innée et adaptative n'est pas aussi

tranchée puisque les TLR interviennent dans l'immunité adaptative. De même, les cellules dendritiques, pivot de l'immunité adaptative, les cellules NK (Natural Killer) et NKT participent également à l'immunité innée, mais nous détaillerons leur rôle plus loin.

L'immunité acquise est spécifique de l'antigène ; elle se répartit entre une réponse humorale et une réponse cellulaire. Elle repose surtout sur les lymphocytes T et B et sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). C'est un système complexe où la réponse immune est déclenchée par la présentation et la reconnaissance spécifique d'un antigène. Elle est ensuite maintenue grâce aux cellules mémoires pour pouvoir répondre plus rapidement lors de rencontres ultérieures avec l'antigène initial.

## ***2.1. Le complexe TCR/CMH/Peptide***

Les lymphocytes T reconnaissent par leur récepteur (TCR : T Cell Receptor) des antigènes présentés par des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules présentatrices. Le concept de restriction du TCR par les molécules du CMH a été découvert en 1974 par Zinkernagel et Doherty : les lymphocytes T spécifiques d'un virus lysent préférentiellement les cellules infectées si ces dernières présentent les mêmes molécules de CMH qu'eux (9).

### **2.1.1. Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité**

Les molécules du CMH ont pour fonction de présenter des peptides (correspondants à des antigènes). Elles se répartissent en 2 classes.

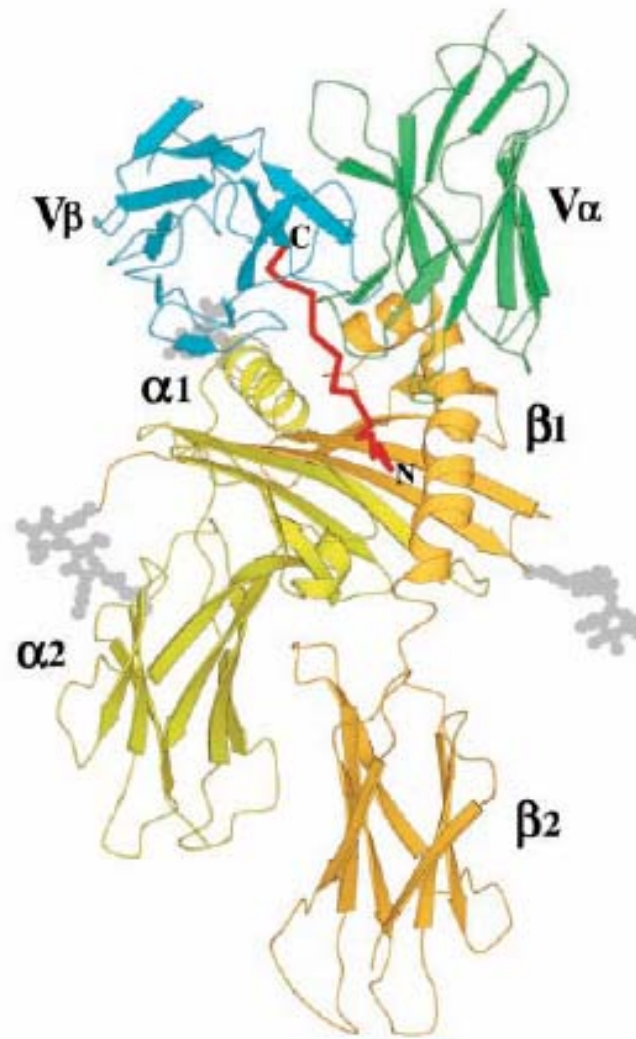
Les molécules du CMH de classe I correspondent aux Antigènes Leucocytaires Humains (HLA) HLA-A, -B, et -C. Elles sont présentes sur presque toutes les cellules nucléées, et présentent classiquement des peptides dérivés de protéines intracellulaires (protéines endogènes, virales ou bactériennes) aux lymphocytes T CD8+. En fait, elles peuvent également être associées à des peptides dérivés de protéines exogènes, grâce au phénomène de présentation croisée. Ceci se produit essentiellement dans les cellules dendritiques (et sera détaillé plus loin).

Les molécules du CMH de classe II correspondent aux HLA -DR, -DQ, et -DP chez l'homme. Leur expression est restreinte à certaines cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, lymphocytes B, monocytes-macrophages) ou

d'autres cellules spécifiques (comme les cellules endothéliales en contexte inflammatoire (10)). Elles présentent des peptides exogènes aux lymphocytes T CD4+.

### **2.1.2. Le Récepteur du Lymphocyte T**

Le récepteur des lymphocytes T est composé de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$  (TCR $\alpha\beta$ ) ou  $\gamma$  et  $\delta$  (TCR $\gamma\delta$ ). Il est associé au complexe CD3 qui est impliqué dans l'expression du TCR à la surface des lymphocytes et dans la transduction du signal. C'est le complexe TCR/CD3/CD8 ou CD4 qui interagit avec les molécules du CMH de classe I ou II respectivement. Les lymphocytes T ont été préalablement sélectionnés au niveau du thymus pour reconnaître les molécules du CMH du soi. Au niveau de certains domaines des TCR il existe des boucles hypervariables CDR1, CDR2 et CDR3 (Complement Determining Region), qui interagissent avec le CMH et le peptide (11). Des études cristallographiques ont montré que la région CDR2 interagit principalement avec les molécules du CMH, alors que la boucle CDR3 forme une poche qui va se lier avec le peptide (12). La région CDR1 peut interagir à la fois avec le peptide et la molécule de CMH (1,11-13) (voir figure 1). De plus, alors que les contacts entre le TCR et la molécule du CMH sont multiples, seul un petit nombre d'acides aminés parmi ceux constituant le peptide antigénique, appelés « résidus d'ancrage », permettent à la fois la discrimination du peptide et l'affinité de l'interaction avec le TCR (14). Ceci explique que la modification d'un seul acide aminé dans le peptide antigénique peut modifier l'affinité de l'interaction du TCR, et donc la réponse du lymphocyte T, si cette modification porte sur un des acides aminés « d'ancrage ». Ainsi existent des agonistes ou des antagonistes peptidiques partiels, qui ne sont différents du peptide antigénique initial que par un acide aminé, mais qui entraînent une activation lymphocytaire T différente (12).



**Figure 1 : Représentation d'un complexe TCR/CMH/Peptide**

Les domaines  $V\alpha$  et  $V\beta$  du TCR sont indiqués respectivement en vert foncé et bleu, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de la molécule de CMH en vert clair et orange. Le peptide est dessiné en rouge. Ceci illustre l'interaction du peptide avec la chaîne  $\beta$  du TCR, alors que la chaîne  $\alpha$  est plus impliquée dans l'interaction avec la molécule du CMH elle-même (Reinherz, Science, 1999,286:1913(1)).

D'autre part, la boucle CDR3 peut modifier sa conformation afin d'entrer en contact avec le peptide, alors que la conformation des parties CDR1 et CDR2, en contact avec la molécule du CMH, ne se transforme pas. Ces ajustements conformationnels donne une flexibilité structurelle aux boucles CDR3 ce qui explique en partie qu'un même TCR peut se lier à plusieurs peptides différents. Cette réactivité croisée est indispensable pour la diversité du répertoire des lymphocytes T. En effet, si un TCR n'était spécifique que d'un seul antigène, il faudrait un nombre extrêmement important de lymphocytes T naïfs pour pouvoir répondre à tous les

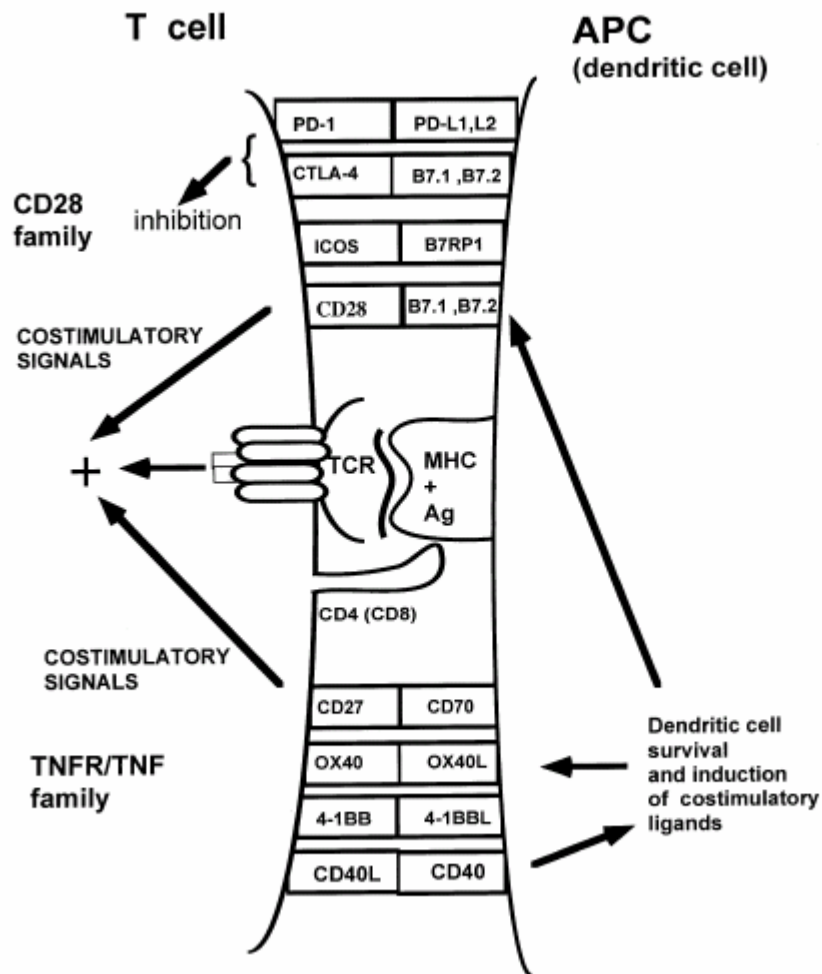
peptides « étrangers » potentiels rencontrés au cours d'une vie. De même un seul épitope peut être reconnu par des lymphocytes portant des TCR différents, afin d'augmenter la réponse immune contre cet épitope (15). Ainsi le nombre de cellules T interagissant avec un complexe CMH-peptide est estimé entre 50 et  $10^5$ , et le nombre de peptide (de 9 acides aminés) pouvant être reconnu par un seul TCR est estimé entre  $10^4$  et  $10^7$  (15). La réactivité croisée permet donc un nombre plus réduit de cellules tout en conservant une grande diversité.

## **2.2. *L'activation du lymphocyte T***

L'activation du lymphocyte T implique tout d'abord la reconnaissance par le TCR du complexe CMH/peptide, formant ainsi une « synapse immune », et nécessite ensuite un second signal. Ce signal de costimulation augmente l'avidité de l'interaction de la cellule T avec la cellule présentant l'antigène (CPA) puis fonctionne comme un amplificateur. Il entraîne des cascades de signaux intracellulaires qui influencent la réponse cellulaire. Ces voies de costimulation mettent en jeu des récepteurs à la surface du lymphocyte T et de la CPA. Elles sont multiples et se répartissent entre la famille CD28 et la famille des TNF-Receptors (cf : figure 2). Les voies les plus étudiées sont les voies CD28/B7, CD40L/CD40, ICOS/ICOS-L.

En l'absence de costimulation efficace, le lymphocyte T naïf ne s'active pas complètement et devient anergique, état transitoire pouvant être levé par l'interleukine 2 (IL2) (16). Si le second signal est en revanche complet, la rencontre de la cellule T avec son antigène spécifique est suivie d'une activation puis d'une prolifération (expansion clonale) et d'une différenciation (en cellule effectrice puis en cellule « mémoire »). L'ampleur de la réponse lymphocytaire est ensuite contrôlée par plusieurs mécanismes dont la délétion par mort cellulaire induite par l'activation (AICD : Activation-Induced Cell Death) (17) et la régulation par des cellules suppressives (ceci sera abordé plus loin).

Ce signal de costimulation n'est pas nécessaire pour l'activation des lymphocytes mémoires lors des rencontres ultérieures avec l'antigène dont il est spécifique (18).



**Figure 2 : les principales voies de costimulation**

Sur la partie gauche est indiqué le lymphocyte T, avec les récepteurs intervenant dans les voies de costimulation. A droite est représentée la cellule présentatrice d'antigène, avec les ligands correspondants. Certaines voies de costimulation sont activatrices et induisent un signal d'activation pour le lymphocyte T. D'autres voies sont inhibitrices et freinent l'activation T. Les molécules de costimulation se répartissent entre la famille CD28 et la famille des TNF-Récepteurs (Bertram, *Semin Immunol*, 2004, 16 :185)(19).

### ***2.3. Les cellules dendritiques***

Les cellules dendritiques sont parmi les acteurs essentiels de la réponse immunitaire, tant innée qu'adaptative. Les cellules dendritiques expriment en surface des TLR, des récepteurs au fragment Fc et au complément. Elles peuvent ainsi être activées par ces récepteurs en jeu dans l'immunité innée (20). Elles produisent alors des cytokines inflammatoires dont l'IL12, et peuvent phagocyter les agents microbiens à l'origine de la stimulation, dans le but, non pas de les éliminer (comme les macrophages), mais de les présenter afin d'enclencher dans un deuxième temps une réponse spécifique.

Par ailleurs, les cellules dendritiques ont un rôle essentiel dans l'immunité adaptative. Ce sont des CPA professionnelles, capables de phagocyter l'antigène, de l'apprêter puis de le présenter en surface en association avec les molécules du CMH de classe I ou de classe II. Elles peuvent ainsi déclencher le premier signal d'activation du lymphocyte T. Les cellules dendritiques expriment également des molécules de costimulation nécessaires pour enclencher le deuxième signal qui permet une activation complète et efficace des cellules T.

Les cellules dendritiques participent donc à la défense anti-infectieuse, mais également au contrôle anti-tumoral et au maintien de la tolérance au soi. Les cellules dendritiques situées dans les plaques de Peyer ou la lamina propria de l'intestin illustrent leur place dans le processus de tolérance : en l'absence de danger et donc d'activation, les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques mésentériques où elles induisent une réponse Th3 avec production de Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), cytokine considérée comme anti-inflammatoire. En revanche, la présence d'un agent pathogène reconnu par les TLR portés par la cellule dendritique va entraîner son activation, conduisant à une réponse inflammatoire.

La présentation croisée de peptides permet aux cellules dendritiques d'élargir leur action. En effet cela lui permet de présenter des antigènes viraux et tumoraux aux cellules CD8+ cytotoxiques, alors même que la cellule dendritique n'est pas elle-même infectée ou tumorale. Classiquement, les molécules du CMH de classe I présentent des peptides issus de protéines intracellulaires aux lymphocytes T CD8+, alors que les molécules du CMH de classe II sont associées aux antigènes dérivés de protéines exogènes et interagissent avec les lymphocytes CD4+. Or la cellule

dendritique peut présenter des antigènes exogènes en association avec des molécules du CMH de classe I, soit de façon constitutionnelle (21) soit après stimulation. Les voies et les mécanismes intracellulaires permettant cette présentation croisée sont multiples et sont étudiés depuis quelques années (22). Les facteurs qui peuvent déclencher une présentation croisée sont nombreux : l'interaction avec le CD40, la rupture de contacts cellulaires (facteur particulièrement important pour la présentation d'antigènes tumoraux) (23), les TLR3 et TLR9 (24). La présentation croisée est également impliquée dans le maintien de la tolérance au soi en entraînant la délétion de clones CD8+ autoréactifs comme cela a été montré chez la souris (25). Les antigènes captés par les cellules dendritiques peuvent provenir de cellules mortes, de cellules en cours de mort cellulaire ou même de cellules vivantes (26). La phagocytose d'une cellule nécrotique déclenche une maturation de la cellule dendritique et la présentation de peptides faisant suite à cette phagocytose s'accompagne de signaux inflammatoires. A l'inverse, la phagocytose d'une cellule apoptotique n'entraîne pas obligatoirement de maturation de la cellule dendritique et la présentation des antigènes dérivés des corps apoptotiques se fait sans notion de « danger ». Le contact avec des cellules apoptotiques n'inhibe cependant pas la possibilité de maturation des cellules dendritiques si elles reçoivent par ailleurs un signal de maturation (27).

### **3. L'alloreconnaissance**

Au début des années 1940, Gibson et Medawar ont mis en évidence que le rejet de tissu correspondait à une réaction immune (28,29). Le rejet implique cependant des facteurs immunologiques et non immunologiques : la nature du tissu greffé, le site de transplantation (avec la notion de « sanctuaires immunologiques » où les greffes sont plus facilement acceptées), la qualité du greffon, l'ischémie-reperfusion, le statut immunologique du receveur, la disparité génétique entre le donneur et le receveur.

Le rejet d'une allogreffe implique la reconnaissance par les cellules T du receveur des molécules allogéniques, et en premier lieu des molécules du CMH du donneur. Cette reconnaissance se déroule au niveau des organes lymphoïdes

secondaires du receveur, car des souris ne possédant pas de telles structures acceptent indéfiniment une allogreffe cardiaque en l'absence de traitement immunosuppresseur, indiquant que la réponse allogénique n'est pas initiée dans le greffon lui-même (30). Cependant une étude plus récente montre que les organes lymphoïdes sont importants mais pas toujours indispensables puisqu'un rejet peut survenir chez une souris sans organes lymphoïdes secondaires (31).

Il est maintenant bien établi qu'il existe deux voies d'alloimmunisation, indépendantes et non exclusives : la reconnaissance directe et la reconnaissance indirecte.

### ***3.1. L'alloreconnaissance indirecte***

C'est un terme employé en immunologie de la transplantation. Cela correspond en fait au processus « classique » de reconnaissance immune. Au cours de la reconnaissance indirecte, les cellules T du receveur vont reconnaître les alloantigènes, dérivés de protéines allogéniques qui auront été phagocytées, puis présentées sous forme de peptides par les CPA du receveur (32-35). Cette reconnaissance indirecte respecte le concept selon lequel les cellules T interagissent par leur récepteur avec des peptides présentés par les molécules du CMH du soi.

### ***3.2. L'alloreconnaissance directe***

Elle fut mise en évidence dans les années 1980 (36,37). Elle est une exception au principe de restriction par le CMH, puisque les cellules T du receveur reconnaissent des peptides présentés par des molécules intactes du CMH du donneur. Cette interaction est possible par des phénomènes de mimétisme et de réactivité croisée entre les molécules de CMH du receveur et du donneur. La réactivité croisée correspond à la reconnaissance par des cellules T d'un complexe CMH-peptide différent de celui dont elles sont spécifiques. Ainsi, une cellule T spécifique d'un peptide « x » présenté par une molécule HLA du soi « A » va réagir avec un peptide « y » présenté par une molécule allogénique HLA « B ». Ceci est possible d'une part car le TCR ne reconnaît que quelques acides aminés sur la chaîne peptidique, et d'autre part car un TCR semble pouvoir accommoder sa structure tridimensionnelle à divers peptides, comme cela a déjà été

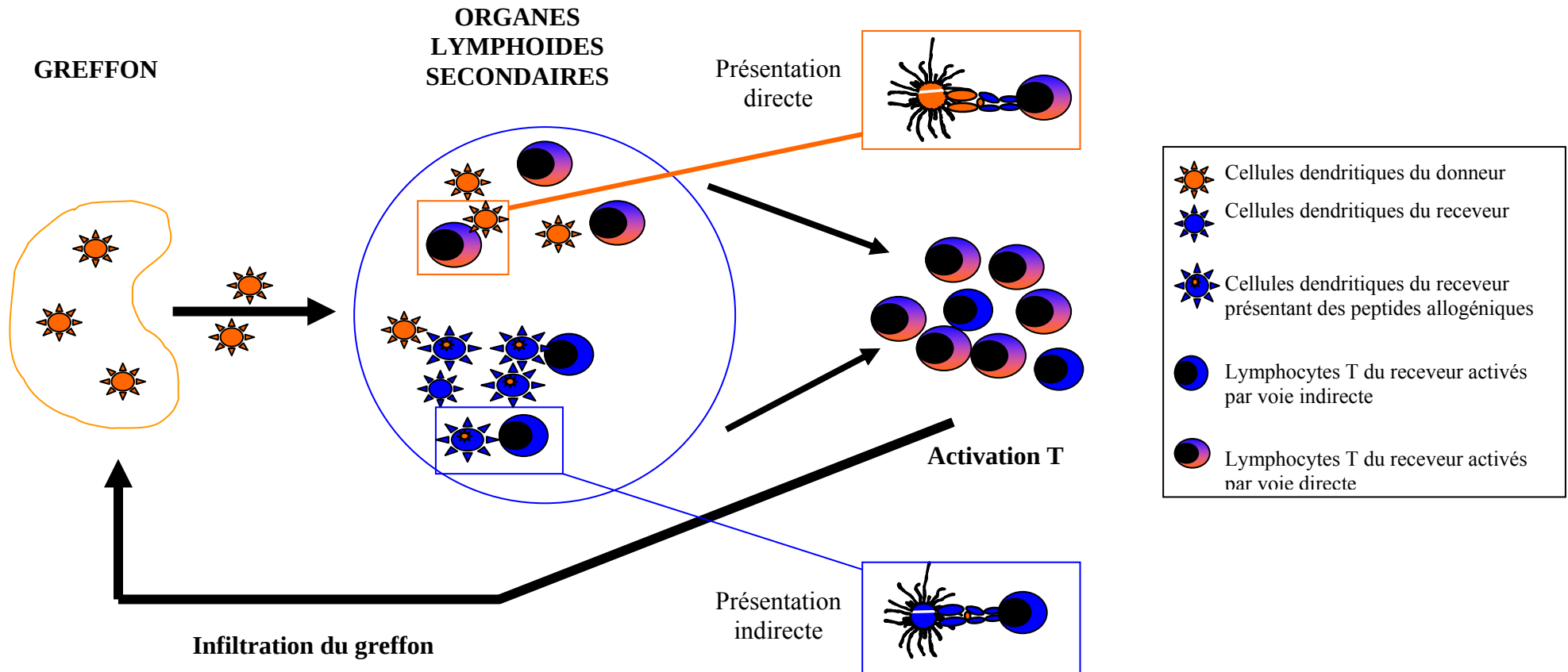
évoqué(13,38,39). De 1 à 10% des cellules T naïves pourraient être activées par cette voie d'alloreconnaissance directe (40-43). Les cellules mémoires peuvent également cross-réagir avec les molécules allogéniques. Elles sont activées et prolifèrent beaucoup plus rapidement que les cellules T naïves (44). De plus, lors d'une stimulation allogénique, la majorité des cellules sont activées par la voie directe (42). La fréquence des précurseurs des cellules T activées par voie directe est la même dans une population de cellules naïves ou de cellules mémoires (44). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette fréquence élevée. La première repose sur la spécificité des cellules alloréactives pour les molécules HLA allogéniques et non pour le peptide, toute molécule HLA allogénique pouvant donc interagir avec des cellules T. Le grand nombre de molécules allogéniques portés par les cellules peut donc recruter beaucoup de cellules alloréactives (45). En fait, il semble que dans l'alloreconnaissance directe, plus les molécules allogéniques sont structurellement proches du CMH du soi, plus le peptide est impliqué dans la reconnaissance. En revanche, si les molécules HLA allogéniques sont très différentes de celles du soi, le peptide intervient alors peu (46). La deuxième hypothèse propose que les peptides, dérivés de protéines « normales », cellulaires ou sériques, mais présentés par des molécules HLA allogéniques sont différents des peptides présentés par des molécules HLA du soi. Ils sont alors reconnus comme allogéniques. Une molécule HLA pouvant présenter un grand nombre de peptides, une seule incompatibilité HLA peut entraîner l'activation d'un nombre important de cellules T alloréactives (45).

L'alloreconnaissance directe semble certes prédominer dans la période immédiate après la greffe en impliquant les CPA du donneur et les lymphocytes CD4<sup>+</sup> du receveur. Cependant, Kreisel et al ont démontré que l'alloreconnaissance directe pouvait aussi mettre en jeu des lymphocytes CD8<sup>+</sup> du receveur activés par des cellules non hématopoïétiques du donneur, comme les cellules endothéliales. Ce processus est d'ailleurs suffisant pour entraîner un rejet aigu d'allogreffe et peut survenir à tout moment après la greffe (47,48).

### ***3.3. Rôle des reconnaissances directe et indirecte dans le rejet d'allogreffe***

Lors d'une allogreffe, les cellules dendritiques résidentes dans l'organe constituent la majorité des « leucocytes résidents » ou « leucocytes passagers » (49,50). Chez les rongeurs, il a été mis en évidence qu'elles quittaient l'organe greffé dès les premiers jours suivant la greffe et migraient rapidement vers les organes lymphoïdes du receveur, dont la rate (51,52). Les signaux moléculaires qui favorisent ou qui freinent cette migration ne sont pas actuellement connus. Après une allogreffe de cœur chez les rongeurs, le nombre de cellules dendritiques du donneur présent dans le greffon diminue au cours des 4 premiers jours par migration vers la rate et les ganglions lymphatiques hépatiques (51,52).

Au niveau des organes lymphoïdes, les cellules dendritiques du donneur présentent les molécules HLA allogéniques (qu'elles portent à leur surface), en association avec des peptides allogéniques, et activent par voie directe les lymphocytes T du receveur. Par ailleurs, elles peuvent également être phagocytées par les CPA du receveur, et sont ainsi la source de peptides allogéniques présentés par des molécules du CMH du soi. Les cellules T sont donc également activées par voie indirecte (cf : figure 3). Les cellules T alloréactives infiltreront ensuite le greffon, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui induisent l'activation de l'endothélium du greffon et attirent alors d'autres cellules inflammatoires. La cascade de la réaction immune est ainsi lancée, aboutissant au rejet du greffon (41).



**Figure 3 : Implication des voies de présentations directe et indirecte dans le rejet aigu d'allogreffe**

Dans les premiers jours suivant la transplantation d'un organe vascularisé, les cellules dendritiques du donneur migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur. Elles peuvent alors d'une part activer les lymphocytes T du receveur en leur présentant des peptides allogéniques avec leur propres molécules HLA, par présentation directe. D'autre part, les cellules dendritiques du donneur peuvent être phagocytées par les cellules dendritiques du receveur. Celles-ci vont ensuite présenter de manière « conventionnelle » des peptides allogéniques, dérivés entre autres des molécules du CMH du donneur, aux lymphocytes du receveur. Cette voie de présentation indirecte entraîne également l'activation des lymphocytes T alloréactifs, mais avec une fréquence moindre que la voie directe. Les cellules T activées vont ensuite être recrutées dans le greffon, d'autant plus facilement que l'endothélium est inflammatoire, initiant ainsi une cascade de réactions inflammatoires, et aboutissant au rejet du greffon.

De façon très schématique, l'allorecognition directe semble plutôt responsable des phénomènes de rejet aigu, alors que la reconnaissance indirecte serait plus impliquée dans les processus de rejet chronique. Plusieurs éléments soutiennent cette conception. Tout d'abord, la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur permet de prolonger leur survie. Cette déplétion peut être réalisée en traitant le donneur plusieurs jours avant la greffe par des agents myélotoxiques ou en plaçant le greffon chez un hôte intermédiaire avant de le greffer. Les cellules dendritiques, qui sont, avec les macrophages, les seuls leucocytes présents au niveau des organes, ont un turn-over rapide au niveau des tissus (environ deux à trois jours) (53). On ne les retrouve donc plus quelques jours après l'administration d'un traitement myélosuppressif, comme le cyclophosphamide ou l'irradiation (53,54). Le greffon peut également être placé chez un receveur intermédiaire (immunodéprimé afin d'éviter un rejet), afin de permettre la migration des cellules dendritiques hors du greffon. Quelques jours après ce « placement », le greffon, ainsi déplété, mais recolonisé par les cellules dendritiques du receveur intermédiaire, peut être greffé chez un deuxième receveur. Une prolongation de survie du greffon a donc été observée après de telle déplétion dans des modèles d'allogreffes d'organes vascularisés chez les rongeurs (49). Ainsi, Hart puis Lechler ont montré dès 1980 que, chez le rat, la survie de greffons rénaux déplétés en cellules dendritiques est prolongée si le donneur est semi-allogénique (36,37,55). Ce phénomène est cependant aboli si le greffon est recolonisé par des cellules dendritiques de même souche que le donneur (quand le receveur intermédiaire devient chimérique après une greffe de moelle osseuse à partir du donneur) ou si des cellules dendritiques du donneur sont injectées au deuxième receveur (36,37).

De même, des souris, présentant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID ou RAG-/-) et reconstituées avec des cellules CD4+, rejettent des greffons cardiaques, quand le donneur possède des molécules du CMH de classe II, mais pas quand il est déficient pour de telles molécules (Knock-out (KO) classe II) (56). Ceci suggère que la présentation directe est suffisante pour entraîner le rejet de greffe. Cependant, dans ce modèle où les donneurs n'ont pas de molécules de classe II, l'alloimmunisation par voie indirecte peut également être affectée par la diminution du nombre d'alloantigènes portés par le greffon. Les molécules du CMH du donneur sont en effet la source de nombreux alloantigènes reconnus par le receveur (57) et le greffon est donc moins « immunogène ».

L'importance relative des 2 types de présentation au cours des premiers jours de la greffe a par ailleurs été établie par Benichou *et al.* Au onzième jour de la greffe, plus de 90% des cellules alloréactives retrouvées au niveau des organes lymphoïdes du receveur interagissent avec des molécules intactes du CMH du donneur (et sont donc activées par voie directe) alors que seules 1 à 5% d'entre elles sont, à ce stade, dirigées contre des peptides du donneur présentés par des molécules HLA du soi (voie indirecte) (42). Les cellules activées par voie indirecte sont essentiellement dirigées contre des peptides dérivés des molécules HLA allogéniques, et dans une moindre mesure contre des antigènes mineurs d'histocompatibilité (58). D'autre part, la fréquence des cellules activées par voie directe diminuent avec le temps, probablement par AICD (59). En revanche, la fréquence de cellules alloréactives activées par voie indirecte augmente, notamment chez les sujets transplantés présentant un rejet chronique (60-65). Tout ceci semble suggérer que la présentation directe prédomine initialement, alors que la présentation indirecte intervient surtout dans les processus de rejet chronique.

Cette séparation artificielle, pour autant qu'elle représente probablement la majorité des phénomènes immunologiques, n'est pas réelle, puisqu'il existe des rejets aigus en l'absence de reconnaissance directe. Ceci est notamment observé chez les rongeurs. Une greffe de peau d'une souris déficiente en molécules de classe II est rejetée chez un receveur, qu'il soit traité par des anticorps anti-CD8 (éliminant ainsi la possibilité de présentation directe par les molécules de classe I aux cellules CD8<sup>+</sup> du receveur) ou non. Le rejet est dans ce cas secondaire à une activation indirecte des cellules du receveur (66). De même, Fangmann *et al* ont montré que des rats immunisés contre des peptides dérivés du CMH de classe I du donneur rejetaient de façon accélérée une greffe de peau, montrant ainsi que l'activation par voie indirecte est suffisante pour entraîner un rejet (67). Par ailleurs, Waaga *et al* ont mis en évidence chez le rat des cellules T alloréactives stimulées par voie indirecte dans les greffons rénaux et dans la rate lors du rejet aigu (35). Enfin, dans des modèles de souris transgéniques (souris ayant un TCR transgénique reconnaissant un peptide donné présenté par une molécule de CMH déterminée), Braun *et al* ont montré que la survie d'une greffe de peau était identique, qu'il y ait activation simultanée par les voies directe et indirecte ou seulement par la voie indirecte (68). La greffe de peau peut ici être rejetée uniquement par des cellules T transgéniques spécifiques d'un antigène mineur d'histocompatibilité activées par voie

indirecte (68). De la même manière, Reed et al ont observé que lors de greffes de peau ou de cœur chez une souris ayant un autre TCR transgénique, l'activation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> est optimale même en l'absence de présentation directe (69). Ces modèles de souris transgéniques permettent certes de mettre en évidence qu'un rejet aigu peut faire suite à la reconnaissance exclusive par voie indirecte d'un seul épitope, mais cette démonstration a cependant quelques limites. En effet, ces souris transgéniques ont un répertoire lymphocytaire très restreint et n'ont que le TCR transgénique présent en très grand nombre, pouvant donc entraîner une forte réponse. La fréquence des cellules alloréactives n'est donc absolument pas la même que dans des modèles plus proches des applications cliniques, n'employant ni animaux transgéniques ni animaux KO.

Enfin, certains auteurs ont proposé une troisième voie d'alloimmunisation : la voie semi-directe. Elle correspond à la présentation, par les CPA du receveur, de molécules intactes du CMH du donneur et présentant alors de façon « directe ». L'acquisition de molécules du CMH entières par des cellules dendritiques à partir d'autres cellules dendritiques et à partir de cellules endothéliales a été observée par Lechler et coll, permettant d'envisager cette 3<sup>ème</sup> voie de présentation (70).

### ***3.4. Effets de la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur***

Nous avons rapporté les expériences de Hart et de Lechler qui mettaient en évidence une prolongation significative de la survie des greffons rénaux lorsqu'ils étaient préalablement déplétés en cellules dendritiques. De même, la survie de greffons cardiaques peut être prolongée quand le donneur est traité par cyclophosphamide ou quand il est irradié (71,72). Cependant cet effet n'est pas constant puisque la survie n'est prolongée, sans tolérance, que dans certaines souches de rongeurs et que pour certaines combinaisons donneur/receveur. En effet, McKenzie *et al.* ont observé que la survie des greffons cardiaques n'est prolongée que dans certains cas et que si la déplétion en cellules dendritiques du donneur est supérieure à 95% (résultat obtenu en associant l'administration au donneur de cyclophosphamide et d'une irradiation) (72). De même, d'autres auteurs ont rapporté que la survie de greffons rénaux ou cardiaques n'est pas ou peu

prolongée chez le rat après déplétion en cellules dendritiques (73,74). Les différences observées selon les souches de rat étudiées peuvent être en rapport avec le nombre et le type des cellules dendritiques résidant dans le greffon. Le nombre et la maturation des cellules dendritiques interstitielles sont en effet différents selon les organes et selon les souches de rat (75-77). De plus, la sensibilité des cellules dendritiques au cyclophosphamide est variable selon leur stade de maturation (78). Enfin, le traitement du receveur intermédiaire peut modifier la survie du greffon chez le deuxième receveur lors des expériences où le greffon est déplété par placement. En effet, certains traitements destinés à éviter le rejet chez l'hôte intermédiaire peuvent entraîner l'infiltration du greffon par des cellules ayant des propriétés régulatrices et qui pourraient transférer la tolérance, ou au moins prolonger la survie, sans que cela soit directement et seulement lié à la déplétion en cellules dendritiques du donneur. Par exemple, un traitement par du sérum anti-donneur ou par Transfusion de sang Spécifique du Donneur (DST) avant la greffe prévient l'apparition du rejet alors qu'il est associé à une infiltration importante du greffon par des cellules « non agressives » qui pourraient avoir des propriétés suppressives (79-81). Ce type de traitement (sérum anti-donneur) a notamment été employé dans les expériences initiales de Lechler où une survie du greffon était prolongée chez le deuxième receveur.

L'absence de cellules dendritiques du donneur dans le greffon peut également être obtenue chez des donneurs « chimériques ». En effet, les cellules dendritiques sont d'origine médullaire. Si les donneurs reçoivent une greffe de moelle osseuse à partir d'un animal de même souche que le receveur, le greffon devient alors chimérique. Les cellules dendritiques interstitielles (ainsi que les autres leucocytes) portent les mêmes molécules du CMH que le receveur. Elles ne feront donc pas de présentation directe. Le parenchyme de l'organe greffé conserve par ailleurs les molécules du CMH du donneur. A partir de ces donneurs chimériques, la survie de greffons cardiaques n'est que peu prolongée chez la souris, et le rejet semble principalement lié à l'action des lymphocytes CD8<sup>+</sup> (82). Chez le rat, la survie de tels greffons est prolongée de façon variable selon les combinaisons, comme cela a été observé précédemment (82-84).

L'utilisation de souris déficiente en molécules du CMH de classe II (Knock-Out (KO) classe II) permet aussi de disposer de modèles où il n'existe pas de présentation directe entre les lymphocytes CD4<sup>+</sup> du receveur et les molécules de

classe II du donneur. Auchinloss et al ont ainsi montré qu'une greffe de peau d'un donneur KO pour les molécules de classe II était rejetée aussi rapidement qu'une greffe de peau d'une souris non déficiente (66). Ceci est même observé après déplétion des lymphocytes CD8<sup>+</sup> du receveur, suggérant qu'une éventuelle présentation directe aux cellules CD8<sup>+</sup> ne participe pas ou peu dans le rejet de greffe d'une peau déficiente en classe II. Dans le cas de greffon cardiaque à partir de souris KO pour les molécules de classe II, si le receveur est une souris SCID reconstituée avec des lymphocytes totaux (reproduisant ainsi un statut immunologique proche de celui d'une souris normale), il survient un rejet aigu (56). Si seuls des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont injectés, alors la survie des greffons cardiaques est prolongée, mais avec la présence d'un rejet chronique (56). Ces modèles KO cependant ne font pas « que » dépléter les greffons en cellules dendritiques, ils diminuent aussi la charge du greffon en molécules allogéniques (puisque'il n'y a pas de molécules du CMH de classe II qui pourraient être présentés par voie indirecte).

Flt3L est un facteur de croissance qui permet l'expansion de cellules dendritiques. Les souris déficientes en Flt3L ne possèdent plus de cellules dendritiques interstitielles au niveau du cœur, alors qu'il en existe toujours au niveau de la peau. Quand les cœurs de ces souris sont transplantés, leur survie est significativement augmentée par rapport à des cœurs normaux (37 jours versus 15j). Cette prolongation est abolie si des cellules dendritiques du donneur sont administrées au receveur le jour de la greffe. La cinétique du rejet de la greffe de peau n'est en revanche pas modifiée (85).

Les effets de la déplétion en cellules dendritiques du donneur sur la prolongation de survie du greffon selon les études sont résumés dans le tableau 1. Toutes ces expériences montrent que la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur ne permet pas d'obtenir une tolérance, et la prolongation de survie du greffon est variable selon l'organe transplanté, les souches d'animaux étudiés et le moyen de déplétion utilisé. En revanche, et « paradoxalement », les cellules dendritiques du donneur sont nécessaires à l'induction de tolérance dans certains modèles animaux.

Ainsi, alors qu'une allogreffe hépatique chez le rat est naturellement tolérée dans certaines combinaisons donneur/receveur, la déplétion des greffons en leucocytes résidents entraîne un rejet aigu. La reconstitution en cellules dendritiques

du donneur en « plaçant » le greffon déplété chez un hôte intermédiaire, syngénique du donneur, pendant 36 heures restaure la tolérance (86,87).

De même, la suppression des cellules dendritiques par l'administration de Cyclophosphamide au donneur 5 jours avant la greffe, rompt la tolérance induite par une DST (88) ou par l'administration de sérum anti-classe II du donneur (81) dans une allogreffe cardiaque ou rénale chez le rat (81,88). A l'inverse, l'injection de cellules dendritiques du donneur au receveur le jour de la greffe restaure la capacité d'induire cette tolérance (88).

## Introduction

| ANIMAUX/SOUCHE       | ORGANE        | DEPLETION EN CELLULES DENDRITIQUES DU DONNEUR                               | PROLONGATION DE SURVIE   | AUTRES EFFETS                                                                                                                              | REFERENCES |
|----------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Rat AS/AUG/F1        | Rein          | Placement chez un receveur intermédiaire (traité par du serum anti-donneur) | Oui                      | Abolition de la prolongation de survie si des cellules dendritiques du donneur sont injectées au receveur                                  | (36)       |
| Rat AS/AUG/F1        | Rein          | Placement chez un receveur intermédiaire                                    | Variable selon la souche | Prolongation si F1->AUG (prolongation abolie si le receveur est rendu chimérique F1). Pas de prolongation si AUG->AS                       | (37)       |
| Rat Fisher/LEW       | Cœur          | Traitement du donneur par cyclophosphamide ou irradiation ou ATG            | Oui                      |                                                                                                                                            | (71)       |
| Rat DA/LEW/F1        | Rein          | Placement chez un receveur intermédiaire (traité par du serum anti-donneur) | Variable selon la souche | Prolongation si F1->LEW et F1->DA.<br>Pas de prolongation si DA->LEW                                                                       | (55)       |
| Rat ACI/LEW          | Cœur          | Placement chez un receveur intermédiaire (rat athymique)                    | Oui                      | Prolongation minimale (10j vs 6j)                                                                                                          | (73)       |
| Rat AS/DA/F1         | Cœur          | Traitement du donneur par cyclophosphamide et/ou irradiation                | Variable selon la souche | Prolongation si F1->DA. Prolongation variable selon le traitement du donneur si AS->DA. Prolongation faible si DA->AS                      | (72)       |
| Rat LEW/ACI          | Cœur et ilots | Traitement du donneur par cyclophosphamide et /ou irradiation               | Variable selon la souche | Prolongation modérée si LEW->ACI.<br>Pas de prolongation si ACI->LEW et si F344->LEW                                                       | (74)       |
| Rat PVG/DA/LEW/AUG   | Cœur          | Donneur chimérique*                                                         | Variable selon la souche | Prolongation si PVG(DA)->DA<br>Prolongation minimale si ACI(LEW)->LEW                                                                      | (82)       |
| Souris Balb/c et B10 | Cœur          | Donneur chimérique*                                                         | Oui                      | Prolongation minimale (13j vs 8j) (rejet cellulaire surtout CD8+)                                                                          | (82)       |
| Rat LEW/BN           | Cœur          | Donneur chimérique*                                                         | Non                      |                                                                                                                                            | (83) (84)  |
| Souris               | Cœur          | Donneur KO pour CMH de classe II                                            | Non                      | Rejet aigu si receveur SCID+injection de lymphocytes totaux.<br>Rejet chronique si receveur SCID+injection de lymphocytes CD4+             | (56)       |
| Souris               | Peau          | Donneur KO pour CMH de classe II                                            | Non                      | Prolongation si le receveur est traité par anti-CD4                                                                                        | (66)       |
| Souris Balb/c        | Coeur et peau | Donneur KO pour Flt3L**                                                     | Oui                      | Prolongation de survie du greffon cardiaque (37j vs 15j). Rejet accéléré si des cellules dendritiques du donneur sont injectés au receveur | (85)       |

**Tableau 1 : Effets de la déplétion du greffon en cellules dendritiques du donneur**

\*: greffe de moelle osseuse du donneur à partir des cellules hématopoïétiques du receveur. Le greffon contient alors des cellules dendritiques de même souche que le receveur. Ainsi, un rat PVG greffé avec la moelle osseuse de rat DA est indiqué PVG(DA).

\*\* : absence de cellules dendritiques au niveau du cœur mais présence au niveau de la peau

## 4. Le rejet d'allogreffe

Plusieurs rejets de mécanismes et de cinétiques différents sont décrits.

### ***4.1. Le rejet vasculaire hyperaigu et aigu:***

Le rejet vasculaire hyperaigu survient très rapidement après la greffe, en quelques minutes à quelques heures. Il est lié à la présence d'anticorps préformés dirigés contre un ou plusieurs antigènes portés par le greffon. Ces anticorps se lient aux antigènes reconnus, notamment situés au niveau de l'endothélium, entraînant l'activation du complément et une coagulation intravasculaire aboutissant à la perte du greffon. Il n'y a pas d'infiltration cellulaire. Ces anticorps préformés sont naturels (comme les anticorps anti- $\alpha$ galactosidase responsables des rejets hyperaigus des xénogreffes, ou les anticorps anti-A et B des groupes sanguins) ou acquis lors de situations immunogènes antérieures (transfusions, grossesses, greffes). Les anticorps acquis reconnaissent notamment des déterminants du CMH (anticorps anti-HLA). Ce type de rejet, impliquant les anticorps et donc caractérisé comme humoral, peut être évité dans la majorité des cas par l'analyse des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur et par la recherche de tels anticorps dirigés contre le donneur avant toute transplantation (épreuve de cross-match). Le rejet vasculaire aigu survient un peu plus tard, avec l'apparition d'anticorps dirigés contre le greffon, anticorps qui n'étaient pas présents au moment de la greffe, mais qui se sont développés les jours suivants. Leurs actions et leurs conséquences sont les mêmes que pour le rejet hyperaigu.

Lorsqu'ils sont déclenchés, ces rejets sont peu sensibles aux traitements immunosuppresseurs et sont difficiles à traiter. Le rejet humoral est caractérisé histologiquement, outre l'existence d'atteintes vasculaires avec thromboses, par des dépôts de C4d (89).

Il faut cependant noter qu'il peut exister des anticorps dirigés contre le donneur sans survenue systématique de rejet vasculaire. Cette situation correspond à une accommodation, et elle a été décrite dans des modèles xénogéniques (90) et allogéniques (91). Chez l'homme, elle peut survenir

notamment lors de greffes ABO incompatibles, où des anticorps dirigés contre des antigènes du groupe sanguin du donneur peuvent être retrouvés alors que le greffon ne présente pas de signes biologiques ou histologiques de rejet (92). Au moment de la greffe, des traitements sont administrés afin de dépléter ces anticorps (échanges plasmatiques, splénectomie, perfusions d'immunoglobulines). Pour autant, lorsqu'ils sont de nouveau détectés, ils ne provoquent pas systématiquement de rejet vasculaire (91). Ceci semble être lié à des modifications au niveau de l'endothélium avec la surexpression de molécules anti-apoptotiques (Bcl-xl, Bcl-2) lors de l'exposition à de faibles taux d'anticorps anti-HLA (91,93).

## ***4.2. Le rejet cellulaire aigu***

Il peut survenir dès la 1<sup>ère</sup> semaine de greffe et le plus souvent dans les 6 premiers mois. Il est devenu moins fréquent actuellement grâce aux traitements immunosuppresseurs. Il est souvent réversible après majoration de l'immunosuppression.

Le rejet cellulaire est dû à l'activation de lymphocytes T spécifiques d'alloantigènes portés par le greffon. Les cellules dendritiques du donneur vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur où elles vont activer les cellules T du receveur par présentation directe et indirecte. Les lymphocytes T ainsi activés prolifèrent puis migrent vers le greffon où ils sont d'autant plus facilement « recrutés » que l'endothélium est inflammatoire, et exprime donc des molécules d'adhésion pour les cellules du système immunitaire. Ces lymphocytes T allospécifiques vont agir selon différents modes. Les lymphocytes T cytotoxiques éliminent les cellules du greffon par contact direct (impliquant la voie Fas-FasL) et par la sécrétion de granzyme et perforine. La survenue d'un rejet aigu est en effet corrélée à l'augmentation d'expression de granzyme B dans le greffon, et l'échec du traitement est associé à une forte expression de FasL (94). D'autres lymphocytes produisent des cytokines pro-inflammatoires (comme l'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), le TNF $\alpha$  et l'IL1) qui attirent alors les macrophages. A leur tour, ces macrophages synthétisent du TNF $\alpha$ , du monoxyde d'azote (NO), des radicaux libres qui activent l'endothélium. Cette cascade aboutit à une infiltration cellulaire massive, la

déstructuration puis la destruction du greffon. Les lymphocytes B peuvent également jouer un rôle dans ce type de rejet, puisque des immunoglobulines spécifiques peuvent cibler certaines cellules du greffon, permettant ainsi la fixation de macrophages et de cellules NK puis la lyse cellulaire.

Des modèles animaux ont mis en évidence que, si le rejet aigu, dans des conditions habituelles, fait plutôt suite à une activation lymphocytaire essentiellement Th1, la maîtrise de cette voie (par exemple par des anticorps anti-IFN $\gamma$ ) n'empêche absolument pas le rejet. En fait, si une voie du système immunitaire semble bloquée, d'autres voies, non classiques, sont alors mises en jeu, et le rejet surviendra de même (95). Ainsi, lors d'allogreffe cardiaque chez la souris, des receveurs déficients en IFN $\gamma$  rejettent le greffon, avec infiltration de polynucléaires éosinophiles et accumulation d'IL5 (96). De même, en cas de déplétion CD8+, l'activation lymphocytaire suit la voie Th2 avec accumulation d'IL9 et infiltration majoritaire de polynucléaires éosinophiles. Le même traitement chez des receveurs déficient en IL9 montre l'absence d'infiltration par des cellules éosinophiles, mais le rejet survient tout de même (97). Ceci explique qu'il n'est actuellement pas possible de prévenir efficacement le rejet aigu en ciblant une molécule ou une voie d'activation, mais qu'il faut associer, au moins dans les premiers mois suivant la greffe, plusieurs types traitements non spécifiques ayant des actions sur plusieurs cellules du système immunitaire.

### ***4.3 La dysfonction chronique du greffon ou néphropathie chronique d'allogreffe (Chronic Allograft Nephropathy CAN)***

Elle est un des principaux problèmes en allotransplantation puisqu'elle est responsable de la perte à long terme du greffon dans 50 à 80% des cas (en excluant les décès des patients) (98,99). De plus, les traitements immunosuppresseurs n'ont que peu ou pas d'action sur son évolution (100). Il est caractérisé histologiquement par une vasculopathie, avec un épaississement intimal et une prolifération des cellules musculaires lisses, et par une fibrose interstitielle. Dans le cas de la greffe rénale, il existe en outre une glomérulopathie (avec un dédoublement des membranes basales) et une

atrophie tubulaire (101). Ces altérations sont classées selon le score de Banff qui permet de graduer l'importance et le type des lésions (102). Cette classification prend en compte des lésions aiguës mais aussi des lésions chroniques glomérulaires (cg), interstitielles (ci), tubulaires (ct), vasculaires (cv), artériolaires (ah) et mésangiales (mm) avec un score de 0 à 3 selon l'importance des lésions. En fonction de ce score, la néphropathie chronique du transplant est classée en grade I, II ou III .

Des facteurs immunologiques (antigène-dépendants) et non immunologiques (non-antigène-dépendants), sont responsables du développement de telles lésions. Parmi les facteurs non immunologiques, la mort cérébrale du donneur et les phénomènes d'ischémie-reperfusion activent l'endothélium et augmentent l'expression des molécules du CMH et des molécules d'adhésion (103,104). Des facteurs immunologiques sont également en cause : le risque de développer un rejet chronique est lié en partie au nombre et à la sévérité des épisodes de rejets cellulaires aigus antérieurs (98). Ces facteurs sont probablement en jeu à différents moments de la greffe, avec le rôle initial de l'ischémie-reperfusion, facilitant une réaction immunologique locale plus ou moins intense. D'une part, une orientation préférentielle Th2, avec production d'IL4, IL5, IL10 et de TGF $\beta$ , facteur pro-fibrosant, contribue à l'augmentation de la production matricielle et donc à la fibrose (101). D'autre part, l'IFN $\gamma$ , cytokine Th1, semble être impliqué dans la survenue de lésions vasculaires chroniques, en diminuant l'activité de certains médiateurs (comme le NO) au niveau de l'endothélium (105). Les alloanticorps (dirigés contre des déterminants des molécules HLA ou des antigènes spécifiques de tissu) jouent également un rôle puisqu'il est observé des dépôts de C4d dans 60% des rejets chroniques en transplantation rénale (100).

L'histoire « naturelle » de la néphropathie d'allogreffe a été étudiée notamment par Nankivell sur des biopsies séquentielles des greffons rénaux chez 120 patients (106). Ceci a permis de distinguer deux périodes pendant lesquelles les lésions observées sont différentes. Ainsi, au cours de la première année, et surtout au cours des trois premiers mois, les lésions prédominantes sont les lésions tubulo-interstitielles liées à l'ischémie-reperfusion ainsi qu'au rejet cellulaire aigu et subaigu. La fréquence du rejet

subaigu est importante initialement et diminue au cours du temps : il est détectable dans près de 68% des biopsies à 1 mois, 45,7% à 3 mois et 18% après 1 an (107). Le tacrolimus et le MMF ont un effet indépendant et synergique sur la prévention de l'apparition de telles lésions (107). Après la première année de greffe, ce sont les lésions correspondant à la néphropathie chronique du transplant qui sont observées, avec des altérations surtout glomérulaires et vasculaires. Le rejet chronique, défini ici par la persistance d'un rejet subaigu pendant plus de 2 ans, est seulement présent chez 5,8% des patients. A 10 ans de la greffe, des lésions de néphrotoxicité des anticalcineurines sont toujours présentes (108) et des lésions sévères de CAN sont observées chez 58,4% des patients (106).

#### ***4.4 L'évolution des traitements immunosuppresseurs***

La transplantation d'organe a connu un essor important au cours des 30 dernières années. D'une part, une meilleure connaissance des réactions immunologiques a permis de réduire la survenue de rejet vasculaire hyperaigu. D'autre part, le développement de thérapeutiques immunosuppressives de plus en plus efficaces assurent un meilleur contrôle des rejets cellulaires. Lors des premières greffes, dans les années 1960, une irradiation lymphoïde totale était appliquée au receveur afin d'éviter le rejet de la greffe. Les propriétés immunosuppressives de l'azathioprine (AZA), agent anti-prolifératif, ont été découvertes à la fin des années 1950 (109,110), et cette molécule a été administrée comme traitement anti-rejet au long cours à partir des années 1962-1963. Les corticostéroïdes ont dans le même temps montré leur efficacité pour traiter les rejets survenant chez les patients traités par azathioprine (111). Quelques années plus tard, les sérums anti-lymphocytaires furent utilisés en traitement d'induction (112). La découverte de la ciclosporine A (CsA), un inhibiteur des calcineurines, à la fin des années 1970, représente un tournant dans le domaine de la transplantation (113) : elle permet une nette amélioration des survies des patients et des greffons, en diminuant notamment l'incidence des rejets aigus (114). Par la suite de nouveaux immunosuppresseurs vinrent agrandir l'arsenal thérapeutique : le

mycophenolate mofétil (MMF), le tacrolimus (autre inhibiteur des calcineurines), puis la rapamycine.

De nombreux anticorps, déplétants ou non, sont également disponibles et sont employés soit en traitement d'induction (anti-CD3, anti-CD52) (115-119) soit lors de rejets sévères (120,121). Malgré l'amélioration de ces traitements, les risques liés à l'immunosuppression persistent (122). L'incidence cumulée de certaines néoplasies est estimée entre 40 et 60% après 20 ans de greffe (123-126). D'autre part, les immunosuppresseurs ont des effets métaboliques délétères (hyperlipémie, diabète..) et les drogues anti-calcineurines ont une importante néphrotoxicité (127,128), en partie responsable de la néphropathie chronique du transplant (108). En raison de ces effets néfastes, de la contrainte d'un traitement au long cours et de l'inefficacité sur la prévention et le traitement du rejet chronique, l'objectif thérapeutique serait d'induire une tolérance spécifique du greffon sans immunosuppression globale prolongée.

## **5. La tolérance**

### ***5.1. La tolérance au soi***

La « tolérance au soi » est nécessaire pour éviter les désordres auto-immuns. Elle repose sur des mécanismes centraux et périphériques. La tolérance centrale est initiée au niveau du thymus où les lymphocytes T sont « éduqués » pour reconnaître d'une part les molécules du CMH du soi (sélection positive) et d'autre part pour que la présentation des antigènes du soi n'entraîne pas leur activation (sélection négative correspondant à l'élimination des lymphocytes T reconnaissant des peptides auto-antigéniques). En fait, trois types de situations sont possibles selon l'affinité du TCR pour le complexe CMH/peptide du soi (129) : une faible affinité sélectionne les lymphocytes « classiques », une forte affinité entraîne la délétion des clones auto-réactifs. Enfin, une affinité moyenne génère les cellules régulatrices naturelles CD4+CD25+ responsables de la tolérance périphérique (ceci sera détaillé plus loin).

## ***5.2. La tolérance en allotransplantation***

Elle est définie par l'absence de destruction du greffon par une réponse immunologique, avec par ailleurs une immunocompétence globale. Elle correspond à l'absence de rejet aigu et chronique et la survie « indéfinie » du greffon chez un hôte immunocompétent (130). La fonction du greffon reste satisfaisante avec un aspect histologique normal en l'absence de tout traitement immunosuppresseur (131). Les définitions diffèrent chez l'animal et chez l'homme.

Dans les modèles d'allotransplantation chez l'animal, la tolérance est souvent assimilée à une survie du greffon supérieure à 100 jours, avec l'absence de signes histologiques de rejet chronique, une réponse anti-donneur diminuée, caractérisée par l'acceptation d'une 2<sup>ème</sup> greffe issue du même donneur (ou d'un donneur de même souche) et le rejet d'une greffe d'un donneur de souche différente, dit « tierce partie » (130).

Chez l'homme, l'état de tolérance opérationnelle correspond à une survie prolongée d'une allogreffe d'organe avec une fonction stable en l'absence de traitement immunosuppresseur (132). Cette définition ne prend pas en compte l'aspect histologique du greffon. De plus, elle ne permet pas de distinguer la tolérance systémique (correspondant plutôt à une immunodéficience globale) de la tolérance spécifique du greffon (où les réponses immunitaires sont par ailleurs complètement conservées). Certains critères sont parfois retenus pour compléter la définition de tolérance : l'absence d'anticorps anti-donneur (même s'ils peuvent être retrouvés chez certains receveurs sans dégradation de la fonction du greffon dans le cadre de l'accommodation), l'absence d'infiltration du greffon par des lymphocytes agressifs et une faible réponse dirigée contre le donneur in vitro, alors que la réponse contre les cellules d'une autre personne est conservée (6).

En transplantation rénale, les critères retenus varient selon les études. Aux Etats-Unis, l'Immune Tolerance Network (ITN) regroupe plusieurs études concernant la tolérance dans le cadre de maladies auto-immunes ou en transplantation. Les sujets greffés rénaux sont considérés comme tolérants sur les critères suivants : une fonction rénale normale et stable est définie par une clairance de la créatinine calculée supérieure à 40ml/min et une variation de

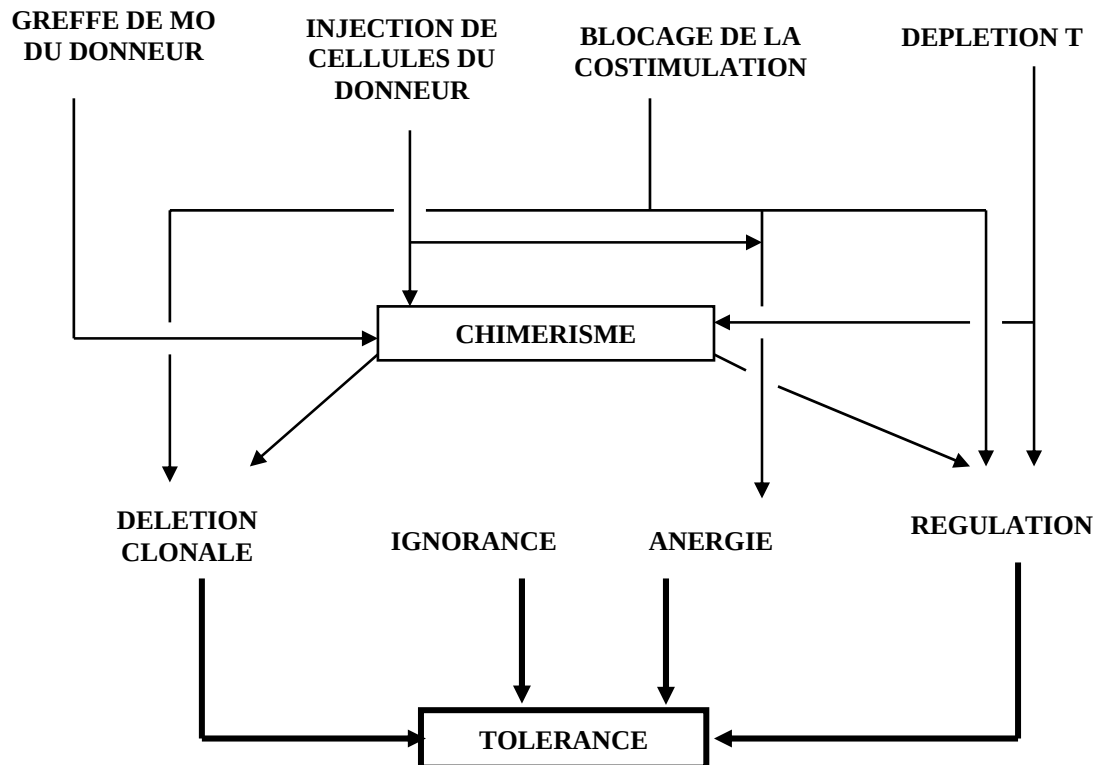
moins de 50% de la créatininémie entre la valeur lors de l'arrêt de l'immunosuppression et la valeur à l'entrée dans l'étude. L'immunosuppression doit être arrêtée depuis au moins 1 an. Une étude européenne, Indice of Tolerance, prend en compte les patients greffés rénaux « tolérants » si leur fonction rénale est caractérisée par une créatininémie inférieure à 120  $\mu\text{mol/l}$  avec une ascension de la créatininémie de moins de 10% au cours des 12 derniers mois. L'arrêt de l'immunosuppression doit être effectif depuis au moins 6 mois. A noter qu'aucune de ces deux études ne tient compte de la protéinurie pour les critères d'inclusion. Pour l'étude conduite à Nantes, la tolérance opérationnelle a été définie par une créatininémie inférieure à 150  $\mu\text{mol/l}$ , une protéinurie inférieure à 1g/24h après l'arrêt de tout immunosuppresseur depuis plus de 1 an.

## 6. Mécanismes impliqués dans la tolérance

Différents mécanismes sont en jeu dans l'induction et le maintien d'un état de tolérance en transplantation : la délétion centrale (souvent associée à un macrochimérisme) et périphérique, l'anergie, l'ignorance et la suppression (cf :figure 4). Ils sont pour la plupart complémentaires et non exclusifs. Certains mécanismes agissent plutôt lors de la phase d'induction de la tolérance, et d'autres dans le maintien de cet état. D'autre part, une seule stratégie thérapeutique peut avoir plusieurs conséquences. Ainsi, le blocage de la costimulation entraîne une délétion périphérique, une anergie et une régulation par des cellules suppressives (6). Un exemple de l'intrication de ces différents mécanismes est illustré par la tolérance néonatale.

Cette tolérance « acquise » a été décrite pour la première fois, en 1953, dans le cas d'allogreffe de splénocytes ou de cellules hématopoïétiques chez la souris en période neonatale (133). Cette greffe n'est alors pas rejetée et s'accompagne de chimérisme. Une greffe de peau, issue d'un donneur de même souche que le donneur initial, est également tolérée, même lorsqu'elle est réalisée dans un second temps. Par ailleurs, la réponse anti-donneur est

diminuée in vitro, lors de Réactions Mixtes Lymphocytaires (MLR) (134). Depuis, le modèle de tolérance néonatale a été étudiée par de nombreuses équipes. Elle semble secondaire à une costimulation non optimale, puisqu'elle est rompue si on ajoute un anticorps activateur du CD40. L'administration de cet anticorps entraîne une activation lymphocytaire d'orientation Th1 (135). Lors de la greffe de cellules allogéniques en période néonatale, l'activation lymphocytaire avec une déviation vers la voie Th2 est par ailleurs suggérée par le développement d'un syndrome hyperéosinophilique dépendant de l'IL4 (136). Par ailleurs, la tolérance néonatale ne dépend pas exclusivement d'une délétion clonale (137) mais implique également des cellules régulatrices (138), qui semblent induire l'anergie de cellules CD8+ alloréactifs (139).



**Figure 4 : Les mécanismes impliqués dans la tolérance**

Différentes stratégies thérapeutiques peuvent être employées pour entraîner la tolérance en allotransplantation : la réalisation d'une greffe de moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques du donneur, l'injection d'autres cellules du donneur, le blocage de la costimulation et la déplétion lymphocytaire T initiale. Ces actions thérapeutiques mettent en jeu le plus souvent plusieurs mécanismes qui sont parfois transitoires, souvent complémentaires. La délétion clonale, centrale ou périphérique, l'ignorance immunologique, l'anergie et la régulation par l'action des cellules suppressives peuvent être impliquées dans l'induction et le maintien d'un état de tolérance en transplantation.

## **6.1. Délétion clonale et chimérisme**

La délétion centrale implique la présentation d'antigènes du donneur au niveau thymique et la délétion des clones T réactifs.

L'induction d'un macrochimérisme, par la réalisation d'une greffe de moelle osseuse allogénique permet d'observer la tolérance ultérieure de greffes d'organes (ou de peau) à partir du même donneur (140). Ceci repose sur l'établissement de lignées hématopoïétiques du donneur, produisant des cellules qui vont coloniser le thymus du receveur. Cela va ainsi entraîner une délétion centrale des lymphocytes reconnaissant les antigènes du donneur par le processus de sélection négative (141,142).

Cette stratégie a montré des résultats encourageants en terme de tolérance en allotransplantation chez l'animal, mais les risques de réactions du Greffon contre l'Hôte (GVH) et de complications liées au conditionnement initial sont importants, rendant son application clinique limitée.

D'autres protocoles visant à obtenir un macro ou un microchimérisme ont ainsi été développés. L'injection de cellules ou d'antigènes du donneur au niveau du thymus a ainsi montré une certaine efficacité chez les rongeurs, en entraînant une délétion centrale (143). L'injection de cellules du donneur (sang, splénocytes, cellules dendritiques) avant la greffe peut également faciliter l'induction de tolérance (144,145).

De plus, un microchimérisme, défini par un faible nombre de cellules du donneur dans l'organisme du receveur (132,146) peut être observé après toute greffe d'organe. Il est lié principalement à la persistance des « leucocytes passagers » présents dans le greffon au moment de la transplantation. Ils migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur et peuvent y persister. Ils permettraient d'entraîner une délétion périphérique des clones alloréactifs (par AICD et mort cellulaire passive) (147). Chez l'homme, un microchimérisme peut être détecté après une transplantation d'organe (148), mais les cellules du donneur diminuent rapidement et deviennent souvent indétectables après 30 à 60 jours (149,150). Cependant elles peuvent parfois être retrouvées à long terme (151).

Le chimérisme est associé dans certains modèles à la tolérance, mais il n'est cependant ni nécessaire ni suffisant car le greffon peut être rejeté malgré la persistance de cellules du donneur dans l'organisme (152-155).

### **6.2. *L'anergie***

L'anergie correspond à l'incapacité des cellules immunes à élaborer une réponse immunitaire contre un antigène après stimulation. Elle fait suite au blocage de la costimulation alors que le lymphocyte T a rencontré un antigène spécifique présenté par les molécules du CMH. L'anergie persiste lors de rencontres ultérieures avec le même antigène, mais peut cependant être levée par l'adjonction d'IL2 (16). Ce mécanisme a permis d'induire une tolérance dans des modèles d'allogreffes chez des rongeurs, comme nous le verrons plus loin.

### **6.3. *L'ignorance***

C'est le mécanisme en jeu quand les antigènes du donneur ne peuvent atteindre le système lymphoïde du receveur (absence de drainage lymphatique) (30) ou quand les cellules immunes du receveur ne peuvent entrer dans le greffon comme cela se voit pour les organes non vascularisés (comme la cornée).

### **6.4. *La régulation***

La première description de cellules régulatrices est attribuée à Gershon en 1975 (156). Ce sont des cellules qui ont une activité suppressive sur les autres cellules T ou sur les CPA et contrôlent ainsi le déclenchement et/ou l'intensité d'une réponse immune. Les différentes cellules régulatrices qui ont été caractérisées sont indiquées dans le tableau 2.

|                  |                       | Phénotype                      | Expression FoxP3 | Sécrétion de cytokines | Mécanismes d'action          |
|------------------|-----------------------|--------------------------------|------------------|------------------------|------------------------------|
| <b>CD4+CD25+</b> | <b>Naturelles</b>     | CD4+ CD25++<br>GITR++ CTLA4+++ | +                | +/-                    | contact cellulaire           |
|                  | <b>Tr1</b>            | CD4+CD25+ CTLA4+               | -                | IL10+++,<br>TGFβ+      | IL10, TGFβ                   |
|                  | <b>Th3</b>            | CD4+CD25+CTLA4++               | ?                | IL10+,<br>TGFβ+++      | TGFβ                         |
| <b>Autres</b>    | <b>T suppressives</b> | CD8+ CD28-                     | +                | ?                      | Induction de CPA tolérogènes |
|                  | <b>NKT</b>            | CD3+ Vα24+ Vβ11+               | ?                | ?                      | ?                            |
|                  | <b>Double négatif</b> | CD3+CD4-CD8-                   | ?                | ?                      | ?                            |
|                  | <b>CD4+CD25-</b>      | CD4+CD25-                      | ?                | ?                      | ?                            |

**Tableau 2 : Principales cellules régulatrices décrites chez l'animal et chez l'homme, ayant une implication en allotransplantation.**

#### **6.4.1. Les cellules T CD4+CD25+**

Ces cellules ont tout d'abord été mises en évidence chez la souris (157) puis plus récemment chez l'homme (158-160). Un déficit quantitatif et/ou qualitatif de ces cellules est associé à des pathologies auto-immunes chez l'animal (157,161) comme chez l'homme (162-165). Ces cellules régulatrices ont surtout pour fonction de maintenir la tolérance au soi mais leur rôle a été évoqué dans la tolérance en transplantation.

On distingue actuellement des cellules T régulatrices (Treg) CD4+CD25+ « naturelles » et « acquises » (pour revue (166-169)).

##### ***6.4.1.1. Les Treg « naturelles » CD4+CD25+***

Elles représentent 5 à 10% des thymocytes CD4+ CD8- (170) et près de 10% des lymphocytes CD4+ en périphérie mais leur nombre diminue avec l'âge (171). Elles proviennent du thymus où elles sont sélectionnées non

seulement pour leur reconnaissance des molécules du CMH du soi mais aussi pour une affinité moyenne envers le complexe Antigène du soi/CMH (129,166). L'interaction CD28-B7 est indispensable dans le thymus pour la génération de ces cellules régulatrices (172). Le CD28 est également important dans le maintien du pool de cellules régulatrices en périphérie, tout comme la présentation répétée des autoantigènes et l'IL2 (172).

Il n'existe pas de marqueur phénotypique discriminant permettant d'identifier précisément ces cellules. Le CD25 correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL2. Il est inductible après l'activation d'un lymphocyte CD4<sup>+</sup> naïf et ne permet donc pas de distinguer une cellule activée d'une cellule régulatrice. Chez l'homme, les cellules exprimant fortement le CD25 (CD25<sup>hi</sup>) possèderaient des propriétés suppressives (173), alors qu'un niveau d'expression intermédiaire correspondrait aux cellules activées, mais cette distinction n'est pas absolue (171). Elles expriment par ailleurs fréquemment les marqueurs CD45RO (marqueur « mémoire ») (173), CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL2) (170), CD62L (L-sélectine). Elles sont caractérisées également par une expression constitutive de CTLA4 (CD152, ligand « régulateur » des molécules de costimulation B7) et de GITR (Glucocorticoid-Induced- TNFR) (171,174). Le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) semble être également un marqueur de ces cellules régulatrices (164). Il jouerait un rôle dans la génération des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> au niveau thymique, mais interviendrait également dans les fonctions suppressives. Cependant des travaux récents montrent que l'expression de FoxP3 n'est pas limitée aux seules cellules régulatrices chez l'homme (175). De plus, l'hème oxygénase 1 (HO1) est exprimé constitutivement par les cellules régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (176). Il semblerait que ce soit FoxP3 qui induirait l'expression de HO1, qui interviendrait ensuite dans le mécanisme de suppression de ces cellules (177).

Ces cellules sont activées par leur TCR, et nécessite l'IL2 pour exercer leurs propriétés suppressives (178). Par la suite leur action suppressive n'est pas dépendante de l'antigène qui les a stimulées. Cette action régulatrice s'exerce en inhibant la transcription d'IL2 dans les autres cellules T et elle nécessite un contact cellulaire (159,179). Après leur activation, les cellules

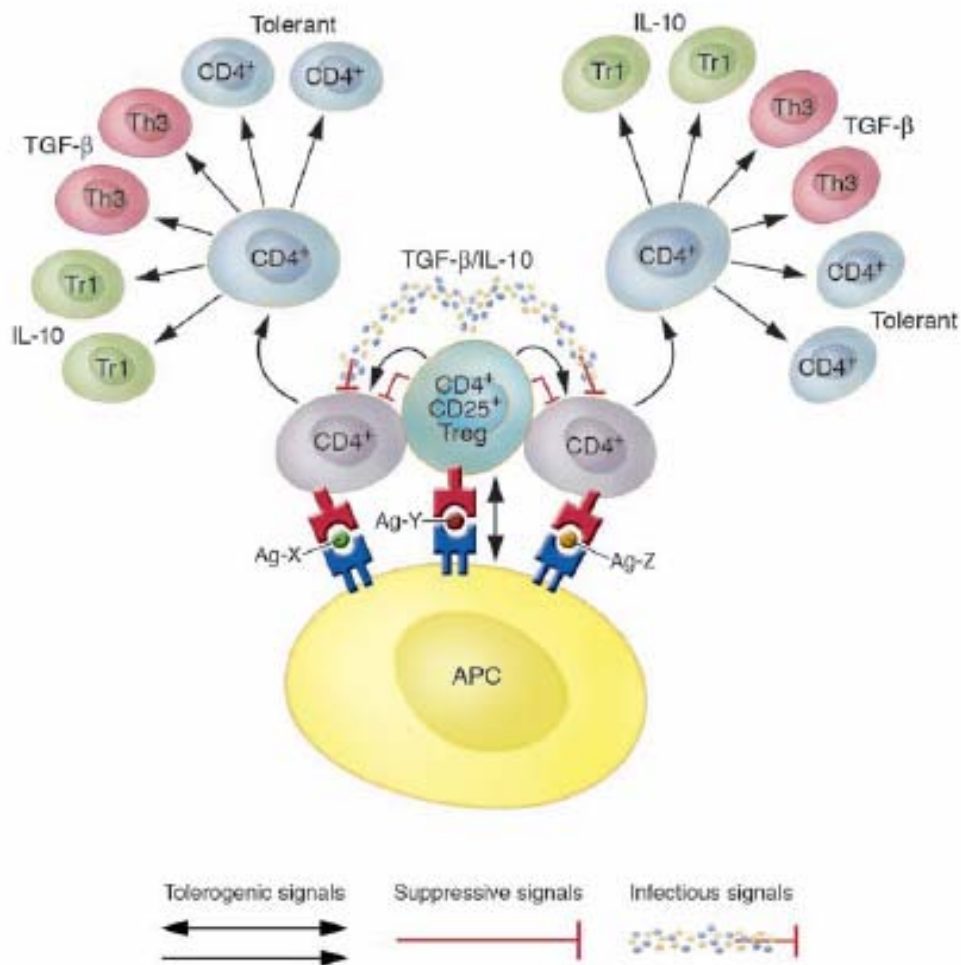
régulatrices produisent du TGF $\beta$  (180), un peu d'IL10 et d'IL4 (159,181). Cependant l'action suppressive ne dépend pas directement de la sécrétion de cytokines comme l'IL10 et le TGF $\beta$ , puisque par exemple un anticorps anti-IL10 n'annule pas l'effet supprimeur (182-184). En plus de l'action sur les autres lymphocytes CD4+, les Treg CD4+CD25+ inhibent la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules NK (184), des cellules T CD8+ (184,185), des cellules NKT (186), des monocytes-macrophages (187) et la maturation des cellules dendritiques (188).

#### **6.4.1.2. Les Treg « acquises » CD4+CD25+**

Deux types cellulaires ont été décrits : les cellules Th3 (189) et les cellules Tr1 (190). Leur mode d'action ne dépend pas du contact cellulaire, comme les Treg naturelles, mais est lié à l'action de cytokines, TGF $\beta$  pour les cellules Th3 (189) et IL10 pour les cellules Tr1 (191,192).

Ces cellules ne sont pas caractérisées par des marqueurs phénotypiques spécifiques. FoxP3 semble induit lors de la conversion des cellules CD4+CD25- en CD4+CD25+ aux propriétés régulatrices par le TGF $\beta$  (167,193,194). Les cellules dendritiques immatures peuvent également générer ces cellules régulatrices « acquises » (166). Ceci a également été observé après stimulation par des cellules dendritiques plasmacytoïdes immatures (195) ou même des cellules dendritiques matures (196).

Les cellules régulatrices semblent pouvoir induire elles-mêmes d'autres cellules régulatrices. Des clones T alloréactifs pourraient être régulés par des Treg de même spécificité si l'alloantigène en question est présenté par la même CPA (197). Ils deviennent à leur tour eux-mêmes régulateurs, grâce à l'action de cytokines comme l'IL10 ou le TGF $\beta$  (cf : figure 5). Les cellules régulatrices peuvent donc transmettre leur propriété régulatrice; ce phénomène est appelé la « linked immunosuppression » ou « by-stander suppression ». C'est probablement ce mécanisme qui est en jeu dans la « tolérance infectieuse » qui permet le transfert d'une tolérance d'allogreffe d'un receveur tolérant à un deuxième receveur sans autre traitement immunosuppresseur, par simple transfert de cellules (198).



**Figure 5 : La tolérance « infectieuse » ou linked-suppression**

Les Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> peuvent exercer leur activité régulatrice sur des cellules CD4<sup>+</sup> allo-réactives soit par contact direct soit par la sécrétion de cytokines (IL10 et TGFβ) soit en agissant sur la CPA. On parle de linked-suppression quand la tolérance induite contre un antigène spécifique (Ag-Y) entraîne une tolérance à d'autres alloantigènes (Ag-X et Ag-Z) présentés par la même CPA. (Walsh, JCI, 2004, 114,10: 1398)

#### ***6.4.1.3. Implications des cellules régulatrices CD4+CD25+ dans la tolérance en allotransplantation***

Les cellules CD4+CD25+ décrites ci-dessus ne sont pas seulement impliquées dans le maintien de la tolérance au soi, même si cela reste leur fonction principale. Elles sont également retrouvées dans des modèles de tolérance en transplantation. Ceci est suggéré dès 1985 car des cellules « régulatrices » sont mises en évidence dans le pool de cellules CD4+ après une greffe cardiaque chez le rat « tolérant ». Ces cellules CD4+ peuvent transférer la tolérance à un deuxième receveur (199). Par la suite, différents travaux ont montré que les cellules CD4+CD25+ étaient indispensables pour l'induction et/ou le maintien de la tolérance aux alloantigènes dans certains modèles chez les rongeurs (200-203). Ces Treg sont générées au niveau des organes lymphoïdes secondaires mais elles sont également présentes dans le greffon puisque celui-ci peut transférer lui-même la tolérance dans un modèle de greffe de peau (204).

Le rôle de ces cellules régulatrices a encore été souligné par la rupture de tolérance ou par l'accélération de la survenue du rejet lors de greffe de peau si les cellules CD4+CD25+ sont déplétées chez le receveur avant la greffe (205). Cette étude montrait en outre que les cellules naturelles CD4+CD25+ pouvaient exercer leur activité régulatrice sur des cellules portant des molécules de CMH allogéniques par réactivité croisée (205).

Chez l'homme, les cellules CD4+CD25+ peuvent exercer une action régulatrice sur des clones alloréactifs. Cette régulation a été mise en évidence pour des alloantigènes présentés par voie indirecte chez des patients greffés rénaux stables. 40% d'entre eux, qui n'avaient jamais eu de rejet aigu, présentaient en effet une telle régulation des cellules CD25+ contre les peptides du CMH de classe II du donneur (206). En revanche seulement 12,5% des patients qui avaient présenté un rejet aigu avaient une telle régulation. De plus, Jiang et coll. ont montré que des cellules qui exercent une activité suppressive sur des cellules spécifiques d'un alloantigène peuvent également inhiber la prolifération d'autres cellules T interagissant avec un autre peptide allogénique présenté par la même CPA (207). Ceci est un exemple de la « linked immunosuppression » que nous avons évoqué. En

revanche, les cellules régulatrices CD4+CD25+ ne semblent pas impliquées dans l'alloréactivité par voie directe. Une étude menée chez 12 patients greffés rénaux a montré que la déplétion en cellules CD4+CD25+ ne modifie la réponse directe contre le donneur in vitro (208).

Les cellules régulatrices CD4+CD25+ n'empêchent pas pour autant l'apparition d'un rejet chronique. Ainsi, dans les modèles de DST chez le rongeur, la survie du greffon est prolongée (plus de 100 jours) avec une faible réponse contre le donneur in vitro et in vivo (la greffe de peau issue d'un donneur de même souche est acceptée alors que celle d'un autre donneur est rejetée). Des cellules régulatrices sont en jeu et la « tolérance » peut être transférée avec l'injection de splénocytes chez un autre receveur. Il existe cependant histologiquement un rejet chronique (209) (210), suggérant que la présence des cellules régulatrices ne s'accompagne pas d'une tolérance vraie dans ce modèle.

#### **6.4.2. Les autres cellules régulatrices**

Les cellules suppressives CD8+CD28- reconnaissent les molécules du CMH de classe I exprimées par les CPA et entraîneraient leur différenciation en CPA tolérogènes (211) en induisant notamment ILT3 et ILT4 (212,213). Elles inhibent également l'expression de CD40L à la surface des lymphocytes CD4+ helper (214). Les CPA ne peuvent donc plus activer complètement le lymphocyte T CD4+, les voies de costimulation étant inhibées. Elles induisent ainsi leur anergie (215). Ces cellules suppressives expriment FoxP3 (216). Leur rôle en transplantation a également été soulevé. Une augmentation de ces cellules CD8+CD28- est retrouvée chez des sujets transplantés cardiaques par rapport à des sujets normaux non greffés, et cette population cellulaire ne présente pas de cytotoxicité envers les antigènes du donneur (217). Plus récemment, ces cellules régulatrices CD8+CD28- ont été retrouvées après DST chez le rat (218).

Certaines cellules NKT semblent avoir un rôle régulateur notamment pour la prévention des maladies auto-immunes, à médiation Th1 (215). Elles semblent également en jeu dans des modèles de tolérance en allotransplantation, notamment dans la tolérance néonatale (219), lors du

blocage de la costimulation (220) ou après un traitement non-myéloablatif et une greffe de moelle osseuse chez la souris (155). Chez l'homme, les cellules NKT auraient également des propriétés régulatrices, et des déficits quantitatif et/ou qualitatif ont été corrélés à certaines pathologies auto-immunes, comme la sclérose en plaques (221) et le diabète (222).

Des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> possèderaient aussi une activité régulatrice : elles sont capables de transférer la tolérance dans un modèle de greffe de peau chez la souris (223) et de greffe cardiaque chez le rat après DST (Degauque *et al*, soumis).

Les cellules T doubles négatives TCR  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> représentent chez l'homme environ 1% des lymphocytes CD3<sup>+</sup>. Elles peuvent réguler l'action de cellules T spécifiques d'un antigène donné chez l'homme (224). En transplantation, elles sont impliquées dans la tolérance après DST dans des modèles de greffe de peau (225) et de cœur (226) chez la souris en entraînant la délétion de clones CD8<sup>+</sup> alloréactifs.

## **7. Les modèles d'induction de tolérance en transplantation**

L'identification des mécanismes impliqués dans la tolérance au soi et dans certains modèles d'allogreffe permet de concevoir des stratégies thérapeutiques d'induction de tolérance. Plusieurs types de protocoles ont été étudiés chez l'animal et parfois chez l'homme. Un des premiers objectifs a été de créer un état de macrochimérisme, obtenu après un traitement myéloablatif et une greffe de moelle osseuse du donneur. Cependant ce type d'approche, qui permet d'observer une tolérance lors d'allogreffes chez les rongeurs, a donné des résultats plus mitigés chez les primates. En outre, le conditionnement initial peut entraîner des complications graves, notamment sur le plan infectieux ou tumoral, mettant en jeu le pronostic vital du patient. Ceci n'est éthiquement pas acceptable pour une transplantation d'organe pour laquelle il existe un autre traitement de suppléance. De plus les immunosuppresseurs actuels ont permis d'augmenter de façon notable la

survie des greffons (et des patients), et on ne peut pas envisager des essais thérapeutiques avec des traitements comportant un risque vital plus élevé que l'immunosuppression actuelle.

Nous allons décrire les différentes approches qui ont été conduites afin d'induire la tolérance en allotransplantation, en insistant sur les résultats observés chez les primates et chez l'homme. Les modèles animaux ne peuvent pas tous être reproduits car il est difficile d'envisager une irradiation ou une greffe de moelle avant la transplantation rénale, quand le donneur (quand il est cadavérique) et la date de la transplantation ne sont pas connus. De plus les résultats observés chez les rongeurs, où la tolérance à une allogreffe est relativement « facile » à induire, sont loin d'être toujours transposables aux primates et à l'homme. Ceci s'explique en partie par l'exposition répétée des hommes et des primates à différents pathogènes et donc par une immunité plus souvent et plus largement stimulée, contrairement aux rongeurs élevés en animalerie et donc relativement protégés des infections extérieures. Ceci compte particulièrement pour l'alloréactivité liée à la réactivité croisée que nous avons évoquée plus tôt. C'est par ailleurs suggéré par le lien entre certaines infections virales et la survenue de rejet (227,228), les cellules T anti-virales pouvant, par réactivité croisée, exercer leurs fonctions cytotoxiques sur les cellules du greffon.

### ***7.1. Induction de tolérance sans greffe de moelle osseuse.***

Plusieurs stratégies reposant sur la déplétion lymphocytaire, le blocage de la costimulation ou l'injection d'antigènes du donneur ont été employées, soit seule soit en association. Nous reprenons les résultats observés mais l'induction de tolérance n'a pas, jusqu'à présent, été obtenue de façon reproductible avec l'application de ces protocoles. Les études réalisées chez le primate et chez l'homme sont indiquées dans le tableau 3.

| Action                                                         | Traitement                                                     | Sujets       | Organe | Effet                                                                                                         | Références |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Déplétion lymphocytaire                                        | Irradiation lymphoïde+ anti-CD3 (ou anti-CD4)                  | Primates     | Rein   | Tolérance dans 50% des cas                                                                                    | (229)      |
| Déplétion lymphocytaire                                        | Immunotoxine anti-CD3                                          | Primates     | Rein   | Survie prolongée mais rejet chronique                                                                         | (230,231)  |
| Déplétion lymphocytaire+ blocage de la production cytokinique  | Immunotoxine anti-CD3+ deoxyspergualine                        | Primates     | Rein   | Tolérance dans 75% des cas                                                                                    | (232,233)  |
| Déplétion lymphocytaire+ blocage de la production cytokinique  | Immunotoxine anti-CD3+ rapamycine                              | Primates     | Rein   | Survie prolongée mais rejet chronique                                                                         | (234)      |
| Déplétion lymphocytaire                                        | Irradiation lymphoïde totale + ATG+ CS                         | Homme (n=28) | Rein   | Tolérance 10%<br>Pas de rejet aigu 40%<br>Mortalité élevée 21%<br>7/25 ont une faible réactivité anti-donneur | (235-238)  |
| Déplétion lymphocytaire                                        | Anti-CD52                                                      | Homme        | Rein   | Rejet aigu 100%<br>Tolérance 0%                                                                               | (239)      |
| Blocage de la costimulation                                    | anti-CD80+anti-CD86                                            | Primates     | Rein   | Prolongation de survie sans tolérance                                                                         | (240)      |
| Blocage la costimulation                                       | anti-CD154                                                     | Primates     | Rein   | Survie prolongée mais rejet chronique                                                                         | (241)      |
| Blocage de la costimulation                                    | anti-CD154                                                     | Primates     | Cœur   | Prolongation de survie sans tolérance                                                                         | (242)      |
| Blocage de la costimulation                                    | anti-CD154                                                     | Primates     | Ilots  | Survie >100j mais rejet chronique                                                                             | (243)      |
| Blocage de la costimulation                                    | blocage CD28 et CD154                                          | Primates     | Rein   | Survie >150j dans 50% des cas                                                                                 | (244)      |
| Blocage de la costimulation                                    | blocage B7(anti-CD80+86) et CD154                              | Primates     | Rein   | Survie très prolongée (>300j) mais sans tolérance                                                             | (245)      |
| Blocage de la costimulation                                    | blocage CD28 et CD40                                           | Primates     | Rein   | Survie prolongée sans tolérance                                                                               | (246)      |
| Blocage de la costimulation                                    | anti-CD154+MMF+CS                                              | Homme        | Rein   | Rejet aigu 3/4<br>Thromboses 4/4                                                                              | (247)      |
| Blocage de la costimulation + Injection de cellules du donneur | DST+Anti-CD154                                                 | Primates     | Peau   | Prolongation de survie sans tolérance                                                                         | (248)      |
| Blocage de la costimulation + Injection de cellules du donneur | DST+Anti-CD154                                                 | Primates     | Rein   | Pas de prolongation de survie                                                                                 | (249)      |
| Injection de cellules du donneur + déplétion lymphocytaire     | Immunotoxine anti-CD3+ lymphocytes du donneur en intrathymique | Primates     | Rein   | Survie prolongée mais rejet chronique                                                                         | (250)      |

**Tableau 3 : Protocoles d'induction de tolérance sans greffe de moelle osseuse chez le primate et chez l'homme**

### **7.1.1. La déplétion lymphocytaire**

Celle-ci doit avoir lieu au moment de la greffe, afin de prévenir l'activation de cellules alloréactives et l'infiltration du greffon. Elle pourrait également faciliter la survenue d'un microchimérisme en permettant la survie de cellules circulantes du donneur. Ces dernières entraîneraient ensuite une délétion clonale des lymphocytes alloréactifs et la génération de cellules régulatrices. La déplétion lymphocytaire peut être obtenue par irradiation lymphoïde totale (associée éventuellement à une irradiation thymique supplémentaire) qui, en plus de la déplétion, entraîne une activation lymphocytaire principalement Th2 (251) et l'induction de cellules suppressives (252). Slavin et al ont montré que l'irradiation lymphoïde totale, seule ou associée à une irradiation thymique ou à une splénectomie, permet une prolongation de survie d'une greffe de peau chez la souris, mais sans tolérance (253,254). Chez le primate, l'association d'une irradiation lymphoïde à un anticorps anti-CD3 ou anti-CD4 entraîne une tolérance chez 50% des animaux (229).

Des anticorps mono ou polyclonaux ont également été largement utilisés. L'administration seule de Globulines Anti-Thymocytes (ATG) ne permet jamais d'induire la tolérance.

Une immunotoxine anti-CD3 administrée chez le primate lors d'une transplantation rénale entraîne une survie prolongée du greffon (230), mais il survient un rejet chronique (231) ; il ne s'agit donc pas de tolérance. La déplétion lymphocytaire par cette même immunotoxine anti-CD3 associée à la deoxyspergualine, des corticostéroïdes (CS) et de l'aspirine a été réalisée chez le primate (STEALTH approach) (233) : 75% des animaux traités présentaient une bonne fonction de leur greffon à 1 an, sans signes histologiques de rejet chronique, et sans traitement immunosuppresseur au long cours (232). La tolérance dans ce modèle semble liée à des cellules régulatrices plutôt qu'une délétion clonale (255). L'immunotoxine anti-CD3 combinée à la rapamycine a également été étudiée chez le primate, mais elle n'a pas permis de produire un état de tolérance vraie : la survie du greffon est prolongée mais il se développe un rejet chronique (234).

Chez l'homme, une étude reposant sur une intense déplétion lymphocytaire initiale a été menée chez 28 patients ayant reçu une irradiation lymphoïde totale avant la greffe, de l'ATG puis des corticostéroïdes seuls en traitement d'entretien (235). Une mortalité importante est observée puisque 6 patients sont décédés (2 d'entre eux suite à des complications infectieuses, les 4 autres suite à des complications cardiovasculaires). La survie à 1 an est de 87% pour les patients et 76% pour le greffon (2 pertes de greffon pour des raisons immunologiques) (237). La survie du greffon est meilleure que celle d'un groupe contrôle n'ayant pas reçu d'irradiation avant la greffe mais avec un traitement d'entretien par ciclosporine (235). En fait 11 patients seulement sur 28 n'ont pas présenté de rejet aigu au cours de la première année. Trois patients seulement ont été sevrés en corticostéroïdes en 31 mois (238). Des études complémentaires ont été réalisées chez certains patients ayant une fonction rénale satisfaisante : une faible réactivité contre le donneur était parfois mais pas systématiquement retrouvée (236), suggérant que la délétion clonale n'est pas le (seul) mécanisme ici en jeu (256). Quelques remarques découlent de cette étude: d'une part la tolérance ne peut être obtenue de façon reproductible avec un tel protocole de déplétion. D'autre part la morbidité et la mortalité liées à un tel traitement sont très lourdes et difficilement acceptables. Il faut rappeler que cette étude a été conduite au début des années 1980, à une époque où la ciclosporine faisait tout juste son apparition.

Un autre essai chez l'homme a été conduit avec un anticorps anti-CD52 (Campath-1H). Il entraîne une déplétion des lymphocytes T massive et prolongée (jusqu'à 6 mois) et une déplétion des lymphocytes B plus transitoire. Son administration seule sans autre traitement immunosuppresseur, a été entreprise chez 7 patients greffés rénaux. Tous ont présenté un rejet aigu, nécessitant la reprise d'un traitement immunosuppresseur au long cours (239). Ceci illustre encore que la déplétion lymphocytaire T seule ne permet pas d'induire une tolérance chez l'homme.

### **7.1.2 Le blocage de la costimulation**

Ce sont les blocages des voies CD28/B7 et CD40/CD40L(CD154) qui ont principalement été étudiés chez le primate et l'homme. Chez le primate,

l'administration d'anticorps anti-CD80 et anti-CD86 permet de prolonger la survie de greffons rénaux, mais cela n'entraîne pas de tolérance (survenue d'un rejet, production d'alloanticorps) (240).

Les mêmes résultats sont observés après l'administration d'anticorps anti-CD40L (anti- CD154). Chez le primate, la survie des greffons rénaux est prolongée (241,246) mais une néphropathie chronique d'allogreffe se développe et des alloanticorps apparaissent. Le même effet est retrouvé après greffe d'îlots pancréatiques (243) ou de cœur (242). Le blocage simultané des voies CD28/B7 et CD40/CD40L permet une survie très prolongée (supérieure à 150 jours) lors de greffes rénales dans 50% des cas, sans rejet aigu et sans traitement immunosuppresseur au long cours (244,245), mais sans véritable tolérance. La synergie du blocage de ces 2 voies n'est pas toujours observée puisque la même prolongation de survie d'un greffon rénal est obtenue chez le primate par traitement avec un anticorps anti-CD40 seul ou en association avec du CTLA4-Ig. En revanche, des complications infectieuses (infections sévères à CMV) sont survenues (246). Les résultats prometteurs du blocage de la voie CD40/CD40L ont encouragé son application chez l'homme. Un essai a été conduit avec un anticorps anti-CD154, associé à du MMF et des corticostéroïdes. Quatre patients greffés rénaux ont ainsi été traités, mais 3 patients sur 4 ont présenté un rejet aigu, et surtout ils ont tous eu des accidents thromboemboliques, conduisant à l'interruption de l'essai (247). La molécule CD154 est en effet présente sur les plaquettes activées (257,258) et l'administration de l'anticorps a entraîné la formation de thromboses.

Le blocage de la voie CD28/B7, en association avec d'autres traitements immunosuppresseurs, est en cours d'évaluation chez l'homme, avec la molécule CTLA4-Ig (LEA29Y). Douze centres de transplantation rénale participent aux essais cliniques de phase II et III. De plus, des molécules ciblant spécifiquement le CD28, qui ont l'avantage de laisser libre l'interaction B7/CTLA4, sont en cours de développement (259). L'une d'elles, Sc28AT, est actuellement étudiée chez le babouin ; sa cross-réactivité avec l'homme est établie, ce qui permet d'envisager des protocoles de transplantation chez le primate.

L'interaction LFA1-ICAM est une autre voie de costimulation, pouvant être bloquée par un anticorps anti-LFA1. Cet anticorps a été administré lors

d'essais cliniques chez l'homme, en association avec d'autres immunosuppresseurs (Ciclosporine, corticostéroïdes, sirolimus ou MMF). Les résultats étaient encourageants en terme de rejet, mais le risque de développer un syndrome lymphoprolifératif semble plus important (6) .

### **7.1.3 L'injection d'antigènes du donneur**

L'injection d'antigènes ou de cellules du donneur avant la greffe pourraient entraîner une délétion des clones alloréactifs, mais surtout une anergie et le développement de cellules régulatrices (260). La Transfusion de sang Spécifique du Donneur a donné des résultats encourageants chez les rongeurs (144). Des protocoles de transfusions sanguines (pas toujours à partir du sang du donneur d'organe) avant la greffe, associées à un traitement immunosuppresseur (azathioprine ou ciclosporine), ont été largement employés dans les années 1970-1980. Une diminution de la réponse cytolytique contre le donneur était alors observée (261,262), si au moins un antigène HLA était commun entre le donneur (de la transfusion) et le receveur (263). De plus, les patients ayant reçu plusieurs transfusions avant la greffe semblaient présenter une meilleure survie actuarielle du greffon et un risque plus faible de rejet aigu (264). Cependant ces transfusions sanguines pouvaient entraîner une immunisation, notamment la production d'anticorps anti-HLA, rendant la transplantation ultérieure difficile chez certains sujets. Ainsi, devant ce risque d'immunisation (261), l'efficacité inconstante (265), même en cas de transfusion avec le sang du donneur (266), et l'introduction de nouveaux immunosuppresseurs efficaces dans les années 1980, ces protocoles de transfusions systématiques ont été abandonnés.

Chez le primate, des protocoles de DST associées à l'administration d'anticorps anti-CD154 prolongent la survie d'une greffe de peau (sans tolérance) (248) mais pas d'une greffe de rein (249).

Une tolérance par délétion centrale peut être observée après la déplétion des cellules T du receveur par une immunotoxine anti-T associée à l'injection intrathymique de lymphocytes du donneur lors de greffes rénales chez les primates (230). Cependant, il existe un rejet chronique, et des alloanticorps sont détectés (250).

Des résultats intéressants ont été obtenus en transplantation rénale pédiatrique avec l'injection au moment de la greffe de cellules mononucléées du sang du donneur vivant apparenté (267). La première injection était réalisée par voie portale, et pouvait être complétée par 1 à 2 autres injections par voie systémique. Un traitement immunosuppresseur comportant de la ciclosporine A et des corticostéroïdes était ensuite administré. Avec 18 mois de recul, aucun épisode de rejet aigu n'a été constaté chez les 24 enfants traités. La survie du greffon est de 100%, supérieure à celle du groupe contrôle ayant reçu une triple immunosuppression conventionnelle (CsA+CS+AZA) sans injection de cellules du donneur (survie 80%). Cette procédure était de plus bien tolérée, sans réaction de GVH et avec une incidence de maladie à cytomégalo virus plus faible (267). Il ne s'agit certes pas de tolérance dans ce cas, puisqu'il n'y a eu aucune tentative d'arrêt de l'immunosuppression, mais l'injection des cellules du donneur semble améliorer la survie de la greffe.

## ***7.2 Induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse***

Ces protocoles reposent sur la présence de cellules du donneur, issues de la moelle osseuse (MO), au niveau du thymus du receveur, entraînant ainsi une délétion centrale. Ils ont été étudiés chez les rongeurs pour des allogreffes d'organes vascularisés ou de peau, permettant d'observer le plus souvent une tolérance. Ainsi une greffe de peau chez la souris est tolérée après une irradiation lymphoïde et une greffe de moelle osseuse allogénique (253,254).

Les études réalisées chez le primate sont résumées dans le tableau 4. Une tolérance à une allogreffe rénale est obtenue chez des primates à partir de donneur HLA-incompatible après un conditionnement associant une irradiation corporelle totale non myéloablatrice, une irradiation thymique, l'administration d'ATG, une splénectomie, l'injection de moelle osseuse du donneur et un traitement par ciclosporine A pendant 1 mois. L'ensemble de cette procédure est indispensable à l'induction de tolérance (268). Cette tolérance s'accompagne d'un macrochimérisme (transitoire) et d'une faible réactivité anti-donneur lors de MLR. Ce protocole, quand il est appliqué aux

greffes cardiaques, n'entraîne pas de tolérance, mais une prolongation de survie avec la survenue d'un rejet aigu lors de l'arrêt de la ciclosporine ou d'un rejet chronique à distance (269).

La réalisation d'un même type de stratégie de conditionnement et de greffe de moelle osseuse, non pas avant mais après la greffe, a également été envisagée. Chez le primate, l'administration d'ATG pendant 10 jours suivie soit d'une injection de moelle osseuse du donneur au 12<sup>ème</sup> jour, soit d'une irradiation lymphoïde totale dès J1 (associée de plus à une splénectomie lors de la greffe) permet de prolonger la survie des greffons rénaux, sans traitement immunosuppresseur au long cours (270,271).

| Sujets         | Donneur          | Traitement                                                                                             | Organe | Délai entre la greffe de MO et la greffe d'organe | Effet                                               | Complications | Références |
|----------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------|------------|
| Primates       | HLA incompatible | Irradiation corporelle totale non myéloablative + irradiation thymique+ ATG+splénectomie+ CsA (1 mois) | Rein   | Simultané                                         | Tolérance                                           |               | (268)].    |
| Primates       | HLA incompatible | irradiation corporelle totale non myéloablative + irradiation thymique+ ATG+splénectomie+ CsA (1 mois) | cœur   | Simultané                                         | Prolongation de survie mais rejet aigu ou chronique |               | (269)].    |
| Primates       | HLA incompatible | ATG 10j                                                                                                | Rein   | Moelle osseuse 12 jours après                     | Tolérance 15% (médiane de survie: 70j)              | Infections    | (270)].    |
| Primates (n=5) | HLA incompatible | ATG+irradiation lymphoïde+splénectomie                                                                 | Rein   | Moelle osseuse 13 jours après                     | Tolérance 60%                                       | Infections    | (271)].    |

**Tableau 4 : Induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse chez le primate**

Chez l'homme, plusieurs essais d'induction de tolérance avec réalisation d'une greffe de moelle osseuse ont été conduits. Ils sont représentés dans le tableau 5. Quelques greffes combinées rein et moëlle osseuse ont été réalisées à partir du même donneur HLA-identique, pour des patients présentant une insuffisance rénale terminale secondaire à un myélome. Après un traitement par ciclosporine pendant près de 3 mois, le greffon rénal est toléré sans signes de rejet chronique (272,273). Plusieurs cas de patients traités par allogreffe de moelle osseuse pour une hémopathie maligne, à partir des membres de la fratrie, HLA-identique ou non, ont été rapportés. Quelques années plus tard, en raison d'une insuffisance rénale terminale, ils furent transplantés à partir d'un rein du même donneur, sans traitement immunosuppresseur (ni d'induction, ni d'entretien). Ces greffons rénaux ont alors été « tolérés », avec plusieurs années de recul (274-280). Avant d'envisager cette transplantation sans traitement immunosuppresseur, une greffe de peau du donneur a été réalisée chez certains patients, afin d'objectiver une éventuelle tolérance au donneur. Cette greffe n'étant pas rejetée, la transplantation rénale a été entreprise (276,278,280).

Il est également rapporté deux cas de patients ayant reçu un transplant, l'un rénal l'autre hépatique, d'un donneur vivant apparenté. Ils ont présenté secondairement une hémopathie maligne et ont alors été traités par une greffe de moelle osseuse issue du même donneur que le greffon initial. L'immunosuppression a ensuite été arrêtée avec le maintien d'une bonne fonction du greffon, sans rejet (281,282). Dans ces deux cas, la prise de greffe de moelle osseuse a été effective, malgré le risque potentiel d'immunisation contre le donneur lié à la greffe antérieure.

Un protocole de greffe combinée rein-moelle osseuse a également été mené chez 4 patients qui n'avaient pas d'hémopathie maligne (2 donneurs n'étaient pas HLA-identiques). Le traitement consistait en un conditionnement non myéloablatif puis des corticostéroïdes pendant 6 à 9 mois et de la ciclosporine A pendant 12 mois. Aucune réaction de GVH ou de complications infectieuses graves n'ont été notées (283). Le traitement d'entretien était ensuite arrêté si les trois critères suivants étaient réunis : macrochimérisme détecté au cours des 3 premiers mois (3 patients sur 4), absence de rejet et faible réactivité contre le donneur lors de MLR. L'arrêt du traitement a été

effectif pour 2 patients sur 4 (283). Ils ont ensuite présenté un rejet, réversible avec la reprise du traitement immunosuppresseur (131,284). Une tolérance vraie n'est donc pas obtenue avec ce protocole.

Une autre équipe a évalué le bénéfice de l'injection de cellules de moelle osseuse du donneur chez des patients greffés rénaux recevant un traitement par des anticorps anti-CD3 puis par tacrolimus, MMF et corticostéroïdes. Des cellules issues de la moelle osseuse étaient injectées dans les 11 jours suivant la greffe chez 63 patients (aucune injection pour les 219 sujets contrôles). Le risque de rejet chronique est significativement diminué dans le groupe de patients ayant reçu des cellules du donneur (3% vs. 19%), la survie du greffon est également supérieure (94% vs. 79%) et le degré de chimérisme est corrélé avec l'absence de perte du greffon (285,286). Cette stratégie de greffe d'organe combinée à une greffe de moelle osseuse du même donneur a été rapportée récemment dans le cas de transplantation hépatique à donneur vivant apparenté (287,288). Dans le premier cas, la fonction hépatique est satisfaisante en l'absence de tout traitement immunosuppresseur et il n'y a pas de récurrence du cancer hépatique primitif (287). Deux autres patients porteurs de tumeurs hépatiques ont été traités par cette stratégie. L'immunosuppression a été arrêtée 28 ou 90 jours après la greffe. Un des patients est décédé par récurrence tumorale, le deuxième présentait des marqueurs biologiques évoquant une reprise du processus tumoral (288). Enfin une greffe combinée foie-moelle osseuse, pratiquée en raison d'un cancer hépatique, a également été rapportée à partir d'un donneur cadavérique (289). Quelques mois plus tard, le receveur présentait bien un macrochimérisme et une bonne fonction du greffon. Ce patient a néanmoins aussi présenté une réaction de GVH et est décédée 5 mois après la greffe d'une infection opportuniste illustrant les risques de tels protocoles (289).

Ainsi le développement d'une tolérance durable à une allogreffe n'a pas été actuellement obtenu chez l'homme de manière reproductive. Le concept actuel pour l'induction d'une tolérance repose pour l'essentiel sur une réduction profonde et initiale des cellules T et sur l'apparition secondaire d'une régulation active. Cependant les stratégies thérapeutiques visant à appliquer

ce concept doivent trouver l'équilibre entre les risques liés à la déplétion immunitaire initiale et le maintien à long terme d'un état de tolérance spécifique.

| Sujets       | Donneur                                   | Traitement                                                        | Organe | Délai entre la greffe de MO et la greffe d'organe         | Effet                                         | Complications                                                  | Références |
|--------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------|
| Homme (n=1)  | HLA-identique                             | ATG+ Cyclophosphamide+ Irradiation Thymique + CsA (3mois)         | Rein   | Simultané (myélome+IRT)                                   | Tolérance                                     |                                                                | (272)      |
| Homme (n=2)  | HLA-identique                             | ATG+ Cyclophosphamide+ Irradiation Thymique + CsA (3mois)         | Rein   | Simultané (myélome+IRT)                                   | Tolérance                                     |                                                                | (273)      |
| Homme        | HLA incompatible                          |                                                                   |        |                                                           | Tolérance                                     |                                                                | (275)      |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté HLA-identique            | greffe de peau du donneur pour évaluer la tolérance spécifique    | Rein   | Greffe de MO antérieure (hémopathie maligne)              | Tolérance                                     |                                                                | (276)      |
| Homme (n=3)  | Vivant apparenté                          |                                                                   | Rein   | Greffe de MO antérieure (hémopathie maligne)              | Tolérance                                     |                                                                | (277)      |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté HLA-identique            | greffe de peau du donneur pour évaluer la tolérance spécifique    | Rein   | Greffe de MO antérieure (hémopathie maligne)              | Tolérance                                     |                                                                | (278)      |
| Homme (n=6)  | Vivant apparenté                          |                                                                   | Rein   | Greffe de MO antérieure                                   | Tolérance                                     | Infections                                                     | (279)      |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté HLA-identique            | greffe de peau du donneur pour évaluer la tolérance spécifique    | Rein   | Greffe de MO antérieure (hémopathie maligne)              | Tolérance                                     |                                                                | (280)      |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté HLA-identique            |                                                                   | Rein   | Greffe rénale puis de MO (hémopathie maligne)             | Tolérance après greffe de MO                  | Pas de GVH                                                     | (281)      |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté HLA haploidentique       | Busulfan+ Cyclophosphamide+ thiohepa+ATG                          | Foie   | Greffe hépatique puis de MO (hémopathie)                  | Tolérance                                     |                                                                | (282)      |
| Homme (n=4)  | Vivant apparenté (HLA compatible ou non)  | Irradiation lymphoïde+ ATG+ CS (6-9 mois) + CsA (12 mois)         | Rein   | Simultané                                                 | Pas de tolérance                              | Déplétion CD4+ prolongée, pas de GVH, pas d'infections sévères | (283,284)  |
| Homme (n=63) | Cadavérique (au moins 1 compatibilité DR) | Anti-CD3+ FK+MMF+CS                                               | Rein   | Cellules de MO dans les 11 jours suivant la greffe rénale | Pas de tolérance, Meilleure survie du greffon | Pas de GVH ni d'infections sévères                             | (285,286)  |
| Homme (n=1)  | Vivant apparenté                          | Irradiation Chimiothérapie                                        | Foie   | Greffe de MO antérieure                                   | Tolérance                                     |                                                                | (287)      |
| Homme (n=2)  | Vivant apparenté                          | ATG+ Cyclophosphamide                                             | Foie   | Greffe de MO 40 à 55 jours avant                          | Tolérance                                     | Récidive tumorale (1/2 décès)                                  | (288)      |
| Homme (n=1)  | Cadavérique (HLA incompatible)            | irradiation corporelle + irradiation lymphoïde + Cyclophosphamide | Foie   | Greffe MO 12 jours après                                  | Tolérance                                     | GVH, infection opportuniste, décès                             | (289)      |

**Tableau 5 : Protocoles d'induction de tolérance avec greffe de moelle osseuse chez l'homme**

## 8. Concept de « tolérance partielle »

Les risques d'un conditionnement, même non-myéloablatif, sont loin d'être négligeables, et les cellules de la moelle osseuse du donneur ne sont pas toujours disponibles. La difficulté de ces protocoles a amené certains auteurs à rechercher, non pas un état de tolérance strict, mais une fonction du greffon satisfaisante avec un traitement immunosuppresseur minimal, diminuant ainsi le risque de toxicité médicamenteuse et les complications infectieuses et tumorales. Calne *et al.* a ainsi développé le concept de tolérance partielle ou *a minima* ou « *prope tolerance* » (290) et l'a appliqué pour 31 patients transplantés rénaux. Le traitement d'induction reposait sur l'administration d'anticorps anti-CD52 précédée d'une injection de prednisone. Une monothérapie par ciclosporine A a été ensuite maintenue à faible dose (291). Six rejets aigus ont été observés, tous réversibles avec la majoration du traitement immunosuppresseur. Deux infections opportunistes sont survenues. Avec un recul de 5 ans, 93% des patients avaient une fonction rénale satisfaisante, 90% d'entre eux sont toujours sous ciclosporine seule à faible dose (119). Cette même stratégie utilisant la rapamycine à la place de la ciclosporine s'est cependant accompagnée d'un fort taux de rejet (27%), en particulier de rejet humoral (17%) (292). Avec un recul de 6 à 12 mois, 72% des sujets ont une bonne fonction rénale, sans signes histologiques de rejet, et il n'y eut pour aucun d'eux d'infections systémiques sévères ou de pathologies tumorales (292). Les taux de rejet observés sont cependant supérieurs à ceux rencontrés actuellement avec une immunosuppression conventionnelle. Enfin, l'association d'un traitement par ATG puis par sirolimus en monothérapie a été étudiée chez 12 patients : ils présentent tous une fonction du greffon satisfaisante (malgré 3 rejets aigus), mais le recul est encore limité (293).

Cette recherche de tolérance « *a minima* » a également été appliquée chez une cohorte plus importante de patients par l'équipe de Starzl. Quatre-vingt deux patients ayant reçu une greffe d'organe (rein, foie, pancréas ou intestin) ont été traités par de l'ATG puis par tacrolimus en monothérapie. Des cellules de moelle osseuse du donneur ont été injectées dans certains cas. Après 4 mois de greffe, l'administration de tacrolimus est progressivement

espacée si aucun rejet n'est observé. A 1 an, les survies des patients et des greffons sont respectivement de 95% et 89%. 60% des patients reçoivent des doses réduites de tacrolimus (294). La même équipe a traité 150 patients après une transplantation rénale par ATG (et corticostéroïdes initialement) puis par tacrolimus seul en traitement d'entretien (295). La prise de celui-ci est progressivement espacée au bout de 4 mois en l'absence de complication. Des épisodes de rejets aigus ont été observés dans 37% des cas, ce qui n'est pas négligeable. La survie du greffon à 1 an est cependant satisfaisante (92%) avec seulement 7% des patients recevant plus d'un immunosuppresseur, et 63% des patients ayant des prises espacées de tacrolimus. Ces résultats rejoignent donc ceux donnés précédemment même en l'absence d'injection de cellules du donneur.

Ces études sont donc encourageantes pour envisager une réduction progressive des traitements immunosuppresseurs, pour des patients à faible risque immunologique. Cependant il n'existe pas actuellement de marqueur prédictif de réussite lors de la réduction ou l'arrêt du traitement, comme nous le verrons plus loin.

## **9. La tolérance spontanée d'allogreffe**

### ***9.1 Dans les modèles animaux***

Une tolérance spontanée à une allogreffe peut parfois être observée, notamment en transplantation hépatique chez certains rongeurs (296-298) et porcs (299). Il survient en fait au départ un rejet aigu qui se résout spontanément sans traitement et qui fait ensuite place à une tolérance de l'organe (300). C'est un phénomène actif, avec une activation immunitaire importante, impliquant les « leucocytes passagers ». Ces cellules permettraient l'activation puis la délétion (par AICD) des cellules alloréactives (301). Le rejet dans ce cas n'est pas délétère pour le greffon, mais le foie est un organe qui peut se régénérer, ce qui n'est pas le cas des autres organes vascularisés (cœur, rein, poumon).

## 9.2. Chez l'homme

Comme chez l'animal, le foie est l'organe pour lequel une « tolérance » s'observe le plus souvent. Certaines équipes mettent même en place une diminution progressive des traitement immunosuppresseurs chez des patients greffés depuis plus de 2 ans et sans épisode de rejet aigu dans l'année précédente. Ce protocole permet de mettre en évidence qu'environ un tiers de ces patients est tolérant à leur greffon (154,302). Quand un rejet survient au cours de la décroissance thérapeutique, il est dans la plupart des cas réversible avec la reprise du traitement immunosuppresseur ou avec des bolus de corticostéroïdes (302). Un chimérisme est retrouvé chez 39% des patients, mais sans corrélation claire avec l'état de tolérance (154).

Il existe quelques rares descriptions dans la littérature de patients qui « tolèrent spontanément » une greffe rénale (cf : tableau 6). Dans les années 1960, parmi 49 patients greffés traités initialement par azathioprine, 15% ont conservé une bonne fonction rénale 3 à 38 ans après l'arrêt de l'immunosuppression (303). Lors de l'autopsie de l'un de ces patients, le greffon avait un aspect histologique normal (303). Zoller *et al* a rapporté une cohorte de 48 patients (parmi 6000 greffés) qui avaient arrêté leur traitement immunosuppresseur depuis plus de 5 jours. Parmi eux, 23 (soit 43%) ont dégradé leur fonction rénale dans les semaines suivant l'arrêt de l'immunosuppression. Seuls 6 patients conservent une fonction rénale stable en l'absence d'immunosuppresseurs depuis plus de 3 ans. Tous étaient greffés à partir d'un donneur vivant apparenté (304). D'autres cas anecdotiques ont été rapporté dans les années 1970 (305) (306).

Burlingham *et al*. ont décrit le cas d'un patient greffé avec un rein de sa mère et présentant une fonction rénale correcte en l'absence de traitement immunosuppresseur. Une biopsie rénale réalisée au moment de l'arrêt de l'immunosuppression a montré un infiltrat focal lymphocytaire, des zones de fibrose interstitielle, une hyperplasie intinale artériolaire. Les tubes et les glomérules étaient normaux (307). Un microchimérisme est retrouvé au niveau des lymphocytes sanguins et de la peau. Des cellules régulatrices spécifiques et une anergie semblent en jeu dans le maintien de cette tolérance puisqu'il

existe une faible réactivité contre le donneur in vitro, pouvant être restaurée par l'adjonction d'IL2 et de CPA du donneur (307).

Christensen *et al.* rapportent le cas d'un autre patient, greffé une première fois avec un greffon d'origine maternelle, puis une deuxième fois avec un greffon d'origine paternelle. Après cette deuxième greffe, le traitement immunosuppresseur a été arrêté en raison d'un syndrome lymphoprolifératif. Le patient a néanmoins maintenu une bonne fonction rénale. Les études in vitro ont révélé une faible réactivité en MLR contre les cellules du père (et de la mère) avec une diminution de la production des cytokines Th1 (IL2, IFN $\gamma$ ) (308). Il existe encore quelques cas isolés, comme celui de cette patiente ayant présenté un rejet aigu précoce. Elle a arrêté son traitement immunosuppresseur après 9 ans de greffe et a conservé par la suite une fonction rénale correcte (309).

| Patients | Donneur                                    | Incompatibilités HLA           | Traitement Immunosuppresseur                                                  | Arrêt de l'immunosuppression   | Période de tolérance | Histologie                                                                                           | Mécanismes                                                          | Références |
|----------|--------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 1        | Vivant apparenté                           | ?                              |                                                                               | Non compliance                 | ?                    |                                                                                                      |                                                                     | (305)      |
| 6        | Vivant apparenté                           | 0                              |                                                                               | Non compliance                 | 3 à 8 ans            |                                                                                                      |                                                                     | (304)      |
| 7        | Vivant apparenté                           | ?                              | AZA (+CS si rejet aigu)                                                       |                                | 3 à 38 ans           | normal                                                                                               |                                                                     | (303)      |
| 1        | Vivant apparenté                           | 3 ?<br>(haplo-identique)       | DST puis<br>CsA+AZA+CS                                                        | Non compliance                 | 5 ans                | infiltrat lymphocytaire et<br>fibrose interstitielle<br>focale, hyperplasie<br>intimale artériolaire | microchimérisme,<br>régulation, anergie                             | (307)      |
| 1        | Vivant apparenté                           | 3 ?<br>(haplo-identique)       |                                                                               | Syndrome<br>lymphoprolifératif | plus de 3 ans        |                                                                                                      | faible réactivité anti-<br>donneur (anergie ?<br>Délétion clonale?) | (308)      |
| 1        | Cadavérique                                | 6                              | Irradiation lymphoïde<br>totale et ATG+ CS                                    | Protocole                      | 12 ans               |                                                                                                      | pas de<br>microchimérisme,<br>réactivité anti-donneur<br>restaurée  | (131)      |
| 2        | Vivant apparenté (1)<br>et cadavérique (1) | 2 pour l'un<br>0 pour l'autre  | Traitement d'induction<br>(OKT3) pour l'un<br>Pas d'induction pour<br>l'autre | Non compliance                 | 5 et 27 ans          |                                                                                                      | régulation                                                          | (310)      |
| 1        |                                            | 1 (classe II non<br>déterminé) | AZA+CS                                                                        | Non compliance                 | 9 ans                |                                                                                                      |                                                                     | (309)      |

**Tableau 6 : Tolérance opérationnelle en transplantation rénale chez l'homme**

## 10. Les marqueurs de la tolérance

Un des obstacles à la réduction progressive voire à l'arrêt des traitements immunosuppresseurs chez l'homme est l'absence de marqueurs fiables et prédictifs d'un état de tolérance. Le chimérisme, la faible réactivité contre le donneur in vitro, l'identification de cellules régulatrices spécifiques ne sont pas constants. En outre, la présence de cellules régulatrices n'empêche pas le développement d'un rejet chronique (210).

Les patients greffés rénaux présentant une « tolérance clinique opérationnelle » c'est-à-dire une fonction rénale stable sans traitement immunosuppresseur sont particulièrement intéressants à étudier. Ils peuvent aider d'une part à comprendre quels sont les mécanismes en jeu et d'autre part à mettre en évidence des caractéristiques d'un état de tolérance.

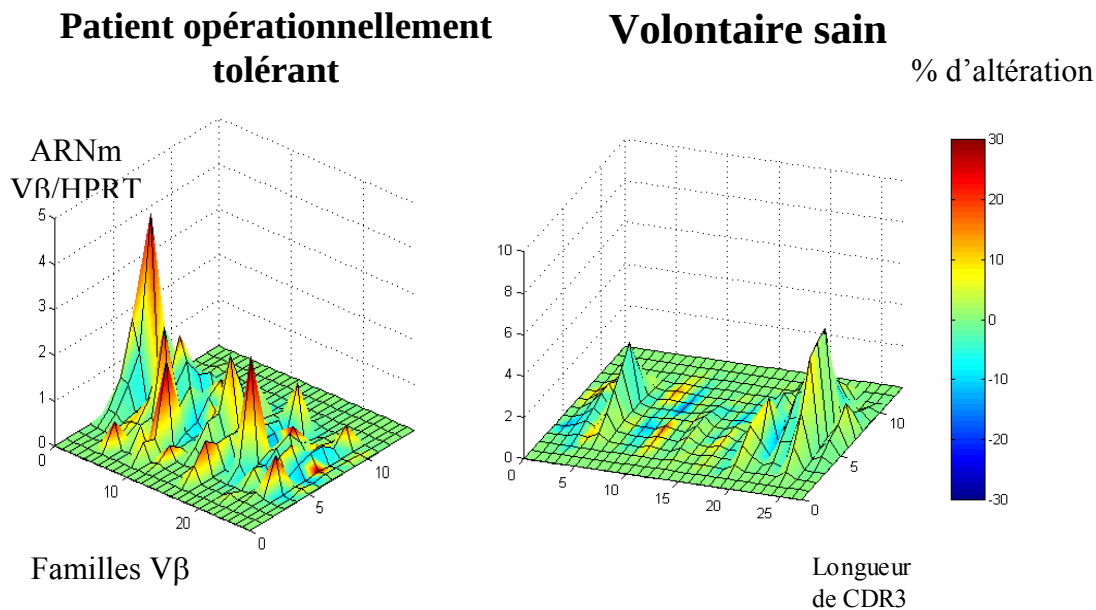
Quelques études phénotypiques ou fonctionnelles ont été entreprises chez des patients « tolérant » leur greffe. Elles sont cependant rares étant donné le faible nombre de patients répondant à de telles caractéristiques. L'analyse du phénotype des cellules mononucléées sanguines de patients « tolérant » un greffon hépatique montre un plus grand nombre de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> que les patients greffés sous immunosuppresseurs (311). VanBurskirk *et al.* ont analysé la réponse de 4 patients tolérants (greffés hépatiques ou rénaux) par un test d'hypersensibilité à médiation cellulaire étudiant la réponse soit contre les antigènes du donneur, soit contre d'autres antigènes (antigènes dérivés d'allèles HLA différents de ceux du donneur). Un des patients a présenté un rejet 7 ans après l'arrêt de l'immunosuppression et le test retrouvait une forte réponse contre le donneur. Les 3 autres patients conservent une bonne fonction du greffon 4, 5 et 28 ans après l'arrêt de l'immunosuppression. Ils ont tous une faible réponse contre les antigènes du donneur alors que la réponse contre les autres antigènes est conservée (310). L'IL10 et le TGFβ sont impliqués dans cette régulation spécifique (310).

Des travaux récents menés dans le laboratoire ont cherché à mettre en évidence de telles caractéristiques phénotypiques ou fonctionnelles chez des patients tolérant leur greffe rénale, en l'absence de tout traitement immunosuppresseur. Ces patients sont rares, et moins de 10 sujets ont pu

êtres recrutés avec la participation de plusieurs centres de transplantation rénale en France. Les critères de tolérance opérationnelle retenus sont une fonction rénale correcte définie par une créatininémie inférieure à 150  $\mu\text{mol/l}$  et une protéinurie inférieure à 1 g/24h, avec un arrêt de l'immunosuppression depuis plus de 1 an. Ces études ont porté sur les cellules mononucléées du sang, car une signature de la tolérance serait particulièrement intéressante à identifier dans des prélèvements biologiques facilement accessibles. En effet, le suivi et le dépistage d'un tel état de tolérance serait envisageable sur des prises de sang répétées, mais beaucoup plus difficile sur des biopsies du greffon, en raison des contraintes de réalisation et des complications possibles d'un tel geste.

Ces travaux ont tout d'abord porté sur l'analyse du répertoire du récepteur des lymphocytes T des patients greffés rénaux « opérationnellement tolérants » et des patients présentant un rejet chronique. Elle a révélé des altérations qualitatives notables, particulièrement pour les lymphocytes CD8+, chez certains sujets « opérationnellement tolérants » comme chez les patients en rejet chronique par rapport à des sujets normaux ou des patients transplantés sous immunosuppresseurs ayant une fonction rénale stable. De plus, des fortes accumulations des messagers V $\beta$ , codant pour la chaîne  $\beta$  du TCR, sont observées chez quelques patients « opérationnellement tolérants » (cf : figure 6) (312). Les lymphocytes T exprimant une famille V $\beta$  au TCR altéré et/ou au transcrit (V $\beta$ /HPRT) accumulé chez les sujets « opérationnellement tolérants » ont été isolés avec des anticorps anti-V $\beta$  correspondants. Leur étude a montré une faible transcription de cytokines par rapport aux patients greffés ayant développé un rejet chronique (diminution significative pour l'IL2 et l'IL13), se rapprochant des niveaux transcriptionnels des lymphocytes T des sujets normaux. Ceci évoque plutôt un état d'anergie (312). Ces résultats suggèrent qu'une sélection clonale des cellules CD8+ est présente chez les sujets « opérationnellement tolérants » et chez les sujets présentant un rejet chronique, mais avec un mécanisme inhibiteur opérant chez les patients tolérants. Des altérations qualitatives dans le répertoire des récepteurs des lymphocytes T sanguins ont également été retrouvées par Alvarez *et al* (313). L'étude de la distribution des tailles du CDR3 dans chaque

famille V $\beta$  de trois patients « opérationnellement tolérants » montrent des profils oligoclonaux voire des délétions de certaines famille V $\beta$  plus fréquents que chez des sujets contrôles (sujets sains, sujets en dialyse, patients transplantés depuis moins de 3 ans, patients transplantés présentant une rejet aigu). En revanche, ils ne retrouvent pas fréquemment ces altérations chez les patients transplantés présentant un rejet chronique (313).



**Figure 6 : Représentation tridimensionnelle par le TcLandscape du répertoire du récepteur des lymphocytes T chez un patient « opérationnellement tolérant » et chez un volontaire sain.**

Cette représentation donne une vue globale du répertoire des récepteurs des lymphocytes T. En abscisse sont les 24 familles V $\beta$ , en profondeur les 13 longueurs de CDR3 possibles, et en ordonnée la quantité de transcrits (ARNm) V $\beta$  rapportée à la quantité de transcrits d'un gène non régulé (HPRT, Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transferase). Le code couleur indique le pourcentage d'altération dans la distribution des longueurs du CDR3 dans une famille V $\beta$  par rapport à une distribution gaussienne. L'analyse du répertoire du récepteur des cellules T des patients « opérationnellement tolérants » (à gauche) et des patients en rejet chronique a mis en évidence des altérations dans la distribution de la taille des CDR3 et des accumulations des transcrits V $\beta$ , qui sont rarement retrouvées chez des sujets volontaires sains (à droite).

Le phénotype des lymphocytes sanguins de ces patients a également été comparé à celui de patients greffés, avec ou sans rejet chronique, et à celui de sujets non greffés. La proportion de cellules CD4+CD25<sup>hi</sup> et CD4+CD25<sup>lo</sup>,

exprimant des marqueurs associés aux cellules régulatrices, n'est pas différente de celle des volontaires sains, mais est augmentée par rapport aux patients transplantés présentant un rejet chronique (Louis *et al*, soumis). Ces derniers ont également un niveau de transcription de FoxP3 plus faible (tant dans les cellules CD4+ que CD8+) que les patients « opérationnellement tolérants ». La réponse proliférative et la production cytokinique après une stimulation polyclonale est en revanche identique pour les volontaires sains, les patients « opérationnellement tolérants » et les sujets transplantés avec un rejet chronique (Louis *et al*, soumis).

Les altérations du répertoire des lymphocytes étant plus marquées dans les cellules CD8+, cette population a fait l'objet d'études plus approfondies (Baeten *et al*, soumis). D'une part, les patients « opérationnellement tolérants » ont plus de cellules CD8+ « mémoire centrale » (CD45RA-CCR7+) et moins de cellules CD8+ effectrices (CD45RA-CCR7-) que les sujets avec un rejet chronique, mais ils présentent un profil semblable à celui des sujets normaux (Baeten *et al*, soumis). Ceci suggère que ces cellules CD8+ effectrices soient impliquées dans le processus de rejet chronique. D'autre part, les sujets transplantés développant un rejet chronique possèdent plus de cellules CD8+CD28- : ces cellules présentent des propriétés cytotoxiques (granzyme, perforine, CD57) et elles sont moins sensibles à l'apoptose. Elles ne semblent donc pas correspondre aux cellules régulatrices CD8+CD28- décrites chez les patients greffés cardiaques, rénaux et hépatiques (217,314,315).

Par ailleurs, une signature caractéristique de la tolérance est recherchée à l'aide de puces à ADNc sur les cellules mononucléées du sang. Un profil a ainsi été identifié, composé de 49 gènes, parmi les 893 gènes différentiellement exprimés, entre les sujets tolérants et les patients présentant un rejet chronique. Des transcrits codant pour des molécules régulant la fonction du TGF $\beta$  et pour des molécules d'adhésion sont sur-exprimés chez les sujets « opérationnellement tolérants ». Des transcrits codant pour des molécules d'activation des lymphocytes T ou de cytotoxicité sont en revanche peu exprimés (Brouard *et al*, soumis). Ce profil a été déterminé à partir de 5 patients tolérant leur greffon rénal et 11 patients en rejet chronique, et validé chez 3 autres sujets « opérationnellement tolérants ». Par ailleurs, parmi 12 patients greffés rénaux traités par immunosuppresseurs et ayant une fonction

rénale stable, un sujet (soit 8% de l'effectif initial) présente un profil similaire à celui des patients « opérationnellement tolérants », ce qui pourrait évoquer que ce sujet soit potentiellement « tolérant » (Brouard *et al*, soumis).

Il pourrait donc exister une signature de l'état de tolérance mais pour l'instant aucun marqueur n'est encore validé pour prédire, parmi les patients greffés, quels sont ceux qui peuvent bénéficier sans risque d'une réduction voire d'un arrêt de l'immunosuppression. Seule la tentative d'arrêt, en maintenant une surveillance clinique et biologique rigoureuse, permet de mettre en évidence une tolérance, mais elle expose au risque de rejet aigu, lit du rejet chronique, et peut donc difficilement être recommandée, sans sélection préalable des sujets.

D'autre part, il est légitime de s'interroger sur le statut immunitaire global de ces patients tolérants : présentent-ils une tolérance spécifique de leur greffon en maintenant une réponse immunitaire normale par ailleurs, ou sont-ils immunodéprimés malgré l'arrêt des traitements immunosuppresseurs ? L'évolution clinique, avec la survenue ou non d'infections opportunistes ou de pathologies tumorales, nous apporte quelques informations. La réponse à une stimulation immunitaire connue peut également aider à déterminer si ces sujets ont une immunocompétence comparable à celle de sujets sains.

## **RESULTATS**

La première partie de cette thèse porte sur l'effet de la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur. Ceci a été étudié dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, où les donneurs et les receveurs ont le même fond génétique et ne diffèrent que par leurs molécules du CMH. Cette combinaison LEW.1W (donneur)/LEW.1A (receveur) est celle qui est fréquemment étudiée dans le laboratoire. C'est notamment avec ce modèle d'allogreffe qu'une survie très prolongée des greffons cardiaques est obtenue après traitement par DST du receveur et qu'une tolérance des greffons rénaux est observée après l'injection au receveur le jour de la greffe d'anticorps dirigés contre les molécules du CMH de classe II (sérum anti-classe II) du donneur. Lors de ces situations, les cellules dendritiques du donneur sont indispensables à la prolongation de survie des greffons puisque leur déplétion entraîne l'abolition du phénomène observé.

La déplétion des greffons en cellules dendritiques a des effets variables selon l'organe transplanté, les moyens de déplétion utilisés et les combinaisons étudiées. Nous avons donc voulu déterminer quelles seraient les conséquences d'une telle déplétion dans le modèle d'allogreffe habituellement étudié dans le laboratoire, non seulement en terme de survie mais aussi de caractéristiques du rejet.

Nous avons choisi de dépler les cœurs des donneurs en cellules dendritiques par deux méthodes différentes. Ceci n'entraîne pas ou peu de prolongation de survie du greffon. Cependant l'infiltrat leucocytaire des greffons 5 jours après la greffe est fortement diminué par rapport à des greffons non déplétés. L'étude de la transcription cytokinique au niveau des greffons retrouve également une cinétique du rejet un peu retardée par rapport aux greffons non déplétés. Enfin, le dépôt d'anticorps IgG au moment du rejet des greffons déplétés en cellules dendritiques du donneur suggère une participation humorale dans ce rejet, et probablement une activation lymphocytaire T par la voie indirecte de présentation. Ainsi, dans un modèle d'allogreffe où elles sont indispensables lors de certains protocoles d'induction de tolérance, les cellules dendritiques du donneur ne semblent pas nécessaires à la survenue du rejet aigu.

La deuxième partie comporte deux manuscrits au sujet de patients greffés rénaux « opérationnellement tolérants ». Nous avons tout d'abord décrit une cohorte de patients qui présentent les caractéristiques cliniques d'une « tolérance opérationnelle », c'est-à-dire qu'ils conservent une fonction rénale correcte malgré l'arrêt des traitements immunosuppresseurs depuis au moins 6 mois. Nous avons tenté d'identifier des facteurs associés à cet état de tolérance. Certains paramètres sont particulièrement intéressants à souligner, comme l'arrêt progressif de l'immunosuppression et comme l'absence d'infections opportunistes ou de tumeurs viro-induites après l'arrêt de l'immunosuppression, suggérant que ces patients ne sont pas sévèrement immunodéprimés. De plus, certains patients maintiennent une fonction rénale stable malgré l'existence d'anticorps anti-donneur.

Afin de préciser si ces patients présentent une tolérance spécifique de leur greffon rénal, ou s'ils restent en fait relativement immunodéprimés malgré l'arrêt des traitements et l'absence de signes cliniques d'immunosuppression, nous avons analysé leur réponse face à une stimulation immune déterminée. L'étude de la réponse cellulaire et humorale après une vaccination anti-grippale a donc été réalisée chez des patients « opérationnellement tolérants » et comparée à celle des patients greffés rénaux traités par immunosuppression conventionnelle et à celle de volontaires sains. Nous avons observé que les patients « opérationnellement tolérants » présentent une réponse humorale et cellulaire non significativement différente de celle des volontaires sains. En revanche les patients traités par immunosuppresseurs ont une réponse humorale significativement plus faible que les volontaires sains, alors qu'ils semblent avoir une réponse cellulaire conservée. Ces résultats suggèrent que le statut de « tolérance opérationnelle » ne soit pas lié à une immunodéficience globale. Ces résultats portent cependant sur une petite cohorte de patients « opérationnellement tolérants », devant rendre l'interprétation prudente.

## **Exhaustive depletion of graft resident dendritic cells: marginally delayed rejection but strong alteration of graft infiltration**

**Gwenaëlle Roussey-Kesler<sup>1</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup>, Caroline Ballet<sup>1</sup>, Frederique Moizant<sup>1</sup>, Anne Moreau<sup>2</sup>, Marina Guillet<sup>1</sup>, Helga Smit<sup>1</sup>, Claire Usal<sup>1</sup> and Jean-Paul Soulillou<sup>1</sup>.**

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

<sup>2</sup> Department of Anatomopathology, CHU-HOTEL DIEU, 44 093 Nantes Cedex 01, France.

Keywords: Leucocytes passenger, Direct, Rat, Allograft.

Word count : 3881

Word count Abstract : 202

Address correspondence to Pr. Jean-Paul Soulillou, I.N.S.E.R.M U643, CHU-HOTEL DIEU, 30 Bd Jean Monnet, 44035 Nantes Cedex 01, France. Tel: +33.2.40.08.74.10, Fax:+33.2.40.08.74.11, e.mail:jps@nantes.inserm.fr

Abbreviations:

CDR3: Complementary Determining Region 3

CsA: Cyclosporin A

CyP: Cyclophosphamide

DDC: Donor Dendritic Cells

DST: Donor Specific Transfusion

HPRT: Hypoxanthin PhosphoRibosyl Transferase

KO: Knock-Out

LD: Length Distribution

LEW: Lewis.

**Abstract**

**Background:** Donor dendritic cells (DDC) are believed to sustain direct recognition leading to acute allograft rejection. However, DDC are also required for tolerance induction in various models. **Methods:** We studied the effect of DDC depletion on MHC mismatched rat heart allografts in a strain combination characterized by a DDC-dependant tolerance induction. Grafts were depleted of DDC either by pretreating donors with cyclophosphamide (CyP) or by being « parked » in an intermediate recipient treated with cyclosporin A (CsA). **Results:** CyP depleted 95% of resident DC and no specific donor MHC class II staining was observed in parked grafts. Parked grafts survived significantly but only moderately longer than untreated grafts (10.8 $\pm$ 1.9 days vs. 6.5 $\pm$ 0.5days;  $p<0.05$ ). Compared to unmodified grafts, on day 5 after transplantation, the magnitude of the graft infiltrate was dramatically decreased in DDC-depleted grafts, with IgG deposition within the grafts at the time of rejection. In parallel, the cytokine transcript levels were also lower in these grafts on day 5, but reached levels similar to those of unmodified grafts by day 7, indicating a delayed pattern of rejection. **Conclusion:** Taken collectively, these data suggest that DDC depletion has a greater effect on the capacity of tolerance induction than the rejection process.

## Introduction

The T cell immune response to an allograft requires two types of antigen recognition: the indirect and direct pathways. The indirect pathway of allopeptide presentation, where allogenic proteins are processed and presented by self Antigen Presenting Cells (APC) to the recipient T cells [1, 2], is restricted by the recipient's Major Histocompatibility Complex (MHC) [3, 4]. In the direct pathway, cross-reactive naïve and memory T cells interact with donor class II and class I molecules on graft APC [5, 6]. Whereas both contribute to acute rejection, chronic rejection is mostly controlled by the indirect pathway [7-13]. Despite several convincing lines of evidence that the indirect pathway can trigger the sub-acute or acute rejection of a vascularized allograft, particularly in pre-immunized recipients [14, 15], the direct pathway is almost certainly instrumental in early acute allograft rejection in unmodified recipients [16, 17]. Experimental transplantations performed using Class I or Class II Knock-Out (KO) donors have shown a moderately delayed rejection time, partly supporting this concept [15, 16, 18]. However, in the latter model, the indirect pathway is also affected (lack of donor MHC-derived peptides) and the role of resident Dendritic Cells (DC) or other MHC positive graft cells in the rejection process cannot be discriminated.

Because professional APC mobilize naïve T cells to differentiate into effector cells, bone marrow-derived dendritic cells resident within a transplanted organ (formerly referred to as “passenger leucocytes” [19, 20]) are considered to sustain the direct pathway of recognition which drives acute rejection. The role of these cells in acute rejection is suggested by the effect of their depletion before transplantation, in rodent models. In the rat for example, tolerance can be achieved by kidney graft parking prior to transplantation, which depleted the graft in donor dendritic cells [21, 22], and can be reversed by donor dendritic cell infusion into the recipient [5, 6]. Prolongation of cardiac allograft survival has also been observed in rats after DDC depletion [23, 24] or in mice when donors lacking Flt3 ligand were used [25]. However, these effects, which appear to suggest a “universal” mechanism of early acute graft rejection, are restricted to only certain strains [23, 26], indicating that the actual role of donor APC in acute rejection should be interpreted with caution. Moreover, recent studies from our laboratory [27, 28] and from others groups [29, 30] have shown that graft resident APC are required for tolerance induction in several models. This was the case in rat liver transplantation [29, 30], in cardiac transplantation [31] following Donor Specific Transfusion (DST) [27], and in kidney transplantation after injection of anti-donor MHC class II antibodies on the day of transplantation [28]. Because the resident dendritic cells were needed

for tolerance induction in the MHC mismatch combination, we analysed the role of these cells on the occurrence of acute rejection in the same strain combination. In addition, the effect of DDC depletion had never been studied in detail at the level of the graft infiltrate.

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

## Materials and Methods

### *Animals and surgical procedure*

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

### *Experimental groups*

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

### *Immunohistology*

Spleen and heart tissue samples were collected from untreated LEW.1W rats, from cyclophosphamide-treated LEW.1W rats 5 days after the CyP injection, and from

intermediate recipients in which LEW.1W hearts were « parked » for 20 to 40 days. Grafts were also collected from the recipients 5 days after the transplantation (whether they were previously depleted of DDC or not) and during rejection (on day 7 for CyP-depleted grafts and on day 13 for parked grafts). For immunohistochemical analyses, samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound ; Bayer Diagnostics, Puteau, France), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Five micrometer cryostat sections were cut, air-dried and fixed in acetone for 10 minutes at room temperature. All sections were then labeled using a three-step indirect immunoperoxidase technique using either the monoclonal Abs OX1+OX30 (anti-CD45, all leucocytes), OX6 (anti-MHC class II) or OX3 (specific for the MHC classII RT1<sup>u</sup> antigen). Graft sections were also studied using R7.3 (recognizing the  $\beta$ chain of the TCR  $\alpha\beta$ , specific for T cells), OX33 (recognizing the CD45 isoform only present on B cells), OX8 (anti-CD8), ED2 (specific for macrophages) and 3.2.3 (specific for NK cells) . Non specific staining was checked by omission of the first antibody.

The area of each section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis. Sections were examined at a magnification of 5400. Positively stained cells were counted using point counting analysis, with a 121 intersection squared grid in the eyepiece of the microscope. The percentage of the area of each section occupied by cells labeled by a particular antibody was calculated as follows: (number of positive cells under grid intersection/ 121 (= the total number of grid intersections)) $\times 100$ .

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

For histological studies, the 4 micrometer-thick sections obtained from paraffin embedded hearts were colored with HPS (Hematoxylin Phloxin Safran).

### ***Intra-graft anti-donor-specific antibody deposition***

The presence of anti-donor-specific IgM and IgG isotypes within the heart grafts of LEW.1A rats was evaluated on day 5 following transplantation and at rejection for DDC depleted grafts. Deposition of the various rat Ig isotypes was studied by immunochemistry. Ungrafted hearts were used as controls. Heart grafts harvested on day 5 post transplantation were sectioned, snap frozen, embedded in Tissue Tek (OCT compound; Bayer Diagnostics, Puteaux, France), cut into 5  $\mu\text{m}$  sections and fixed in acetone for 10 min at room temperature.

Sections were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and incubated with mouse anti-rat IgM-FITC (MARM-4) or IgG-FITC (MARG1) (University of Louvain, Brussel, Belgium) monoclonal antibodies for 45 minutes. Sections were then rinsed 3 times with PBS, conserved at 4°C and examined in the following hours with a fluorescent microscope.

### ***RNA extraction, cDNA synthesis, TCR repertoire analysis and cytokine transcript quantification***

- Total RNA was extracted with Trizol solution (Gibco, Life Technology, South America) according to the manufacturer's instructions. RNA (2µg) was reverse transcribed using a cDNA synthesis kit (Roche, Indianapolis, IN) and diluted to a final volume of 75µl, as previously described [33].

- TCR repertoire analysis : cDNA was amplified by PCR using a Cβ primer and one of the 21 Vβ-specific primers, as previously described [34]. Each amplification product was used for an elongation reaction using a dye-labeled Cβ primer, then heat-denatured, loaded onto a 6% acrylamide-8M urea gel, and electrophoresed for 5h using an Applied Biosystems 373A DNA sequencer (PerkinElmer). Immunoscope® software provides distribution profiles of CDR3 lengths of the amplified and elongated products [35]. For each sample, the CDR3 length profile was compared with those obtained in naive rats.

TcLandscape© top views were then obtained : the x-axis displays the 21Vβ families, the y-axis gives the 13 possible CDR3 lengths of a gaussian pattern and the color indicates the percentage of alterations.

- Relative quantification of cytokine transcripts: cDNA was amplified with primers specific for Cβ, IL2, IL6, IL10, IFNγ, TGFβ and HPRT, as previously described in details [28]. To normalize the levels of the target sequences, the number of copies of each cytokine was related to the quantity of HPRT transcripts obtained for the same sample.

### ***Statistical analysis***

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

## Results

*Donor pretreatment or « parking » of heart grafts before transplantation differentially depletes resident class II-positive cells.*

Because heart dendritic cells live for a few days [36], donor pretreatment with cyclophosphamide inhibits bone-marrow dendritic cell production and depletes hearts of such cells. Administration of cyclophosphamide (300 mg/kg IP) five days prior to collection of LEW.1W hearts depleted 94.4% of class-II<sup>+</sup> cells and 95.7% of CD45<sup>+</sup> cells (figure 1). Because this depletion might not be functionally sufficient, we also utilized LEW.1W hearts “parked” in intermediate LEW.1A recipients treated with Cyclosporin A. An immunohistological study performed on day 19 following the parking procedure showed CD45 (OX1-OX30) and MHC class II molecules (OX6) expression only on infiltrating recipient cells. No staining of donor MHC RT1<sup>u</sup> class II (OX3) molecules was detected (figure 1). Interestingly however, this procedure significantly increased the number of recipient newly “resident” dendritic cells in the graft compared to the number of donor type dendritic cells in a “naive heart” before grafting. A histological evaluation of grafts parked in an intermediate recipient treated with CsA showed a subnormal myocard, with no vascular lesions and only mild infiltration of the myocard and fibrosis (figure 3A). Because parking seemed to be the most efficient procedure for depleting DDC, parked grafts were used in most of the subsequent experiments.

*Exhaustive DDC depletion of LEW.1W hearts is associated with a significant but borderline prolongation of graft survival.*

Heart graft survival in unmodified LEW.1W rats was 6.5 $\pm$ 0.5 days. When DDC were depleted with cyclophosphamide before transplantation, graft survival was not significantly increased (7.3 $\pm$ 0.5 days) compared to the control group. Because DDC depletion was exhaustive following parking in an intermediate host, parked LEW.1W grafts were then used. Grafts parked for more than 20 days in an intermediate immunosuppressed LEW.1A host exhibited a moderate but significant survival prolongation (10.8 $\pm$ 1.9 days) compared to that of unmodified grafts ( $p < 0.05$ ) (figure 2), confirming that graft survival was only (slightly) affected after highly efficient depletion of donor class II + cells. However, because a possible carry-over of Cyclosporin A remaining within the parked graft could contribute to this borderline effect, control grafts were performed where hearts from LEW.1W donors were treated in a similar way to the intermediate LEW.1A recipients during parking. However,

following 10 to 21 days of CsA treatment, graft survival was  $7.7 \pm 3.3$  days (22 - 24 ng/ml of residual circulating cyclosporinemia 24 hours following re-transplantation), a non significant difference compared to the survival of parked grafts and unmodified grafts. Taken together, these data do not confirm that the borderline graft prolongation was due to CsA carry-over.

*Donor Dendritic Cell Depletion strongly decreases graft cellular infiltration by day 5 post-transplantation, but no longer by day 7.*

Histological studies were performed on day 5 for unmodified grafts and on day 5 as well as at time of rejection when modified donors were used. Grafts from untreated donors showed widespread mononuclear cell infiltrate, associated in one case with focal necrosis of myocardial fibers and mild inflammatory endarteritis (figure 3B). In contrast, previously parked graft showed no signs of vascular rejection on day 5, only a mild mononuclear cell infiltrate and no myocardial fiber necrosis (figure 3C). The cell infiltrate was then quantified in graft sections of normal hearts or following DDC depletion (figure 3B and 3C). The mononuclear infiltrate in grafts from untreated donors represented  $25.9 \pm 11.7\%$  of the surface area, whereas it was only  $5.9 \pm 7\%$  (78% less) in grafts from cyclophosphamide pre-treated donors ( $p < 0.05$ ), and only  $1.7 \pm 2\%$  (96% less) in grafts « parked » in an intermediate recipient ( $p < 0.05$ ). Moreover, the infiltrate not only changed in magnitude but also in composition. The infiltrate in normal donor grafts was composed of 37% macrophages, 52% T cells, 12% CD8+ cells, 1.6% B cells and 8% NK cells. In contrast, grafts from cyclophosphamide-treated donors were mainly infiltrated by macrophages; with only 31% T cells and 4% B cells. Parked grafts were also mainly infiltrated by macrophages, with only 10% T cells and no B or NK cells. Of note, no donor class II expression were observed in DDC-depleted grafts on day 5, in contrast to unmodified grafts.

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

A delayed kinetics in TCR C $\beta$  transcript accumulation (quantitative PCR) was also observed on days 5 and 7 following transplantation in the grafts depleted of passenger leucocytes. The

C $\beta$ /HPRT ratios were significantly decreased on day 5 in grafts from cyclophosphamide-injected donors and in parked grafts, as compared to untreated donors ( $0.2 \pm 0.14$ ,  $0.3 \pm 0.5$  and  $1.5 \pm 0.5$  respectively,  $p < 0.05$ ). In parallel to the infiltration scores, the C $\beta$ /HPRT ratios also increased on day 7 ( $1.09 \pm 0.37$  in grafts from cyclophosphamide-pre-treated donors,  $0.8 \pm 0.66$  in parked grafts on day 7, compared to  $1.5 \pm 0.5$  in grafts from unmodified donors on day 5,  $p > 0.05$ ) (figure 4).

***In DDC-depleted grafts, cytokines transcription decreases by day 5, but reaches unmodified graft values by day 7.***

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

***Effect of Donor Dendritic Cells depletion on antibody response***

Because no peripheral humoral response (measured in the serum) could be observed despite the presence of Ig deposition in graft tissues, attention was paid to the IgM and IgG deposits within the grafts of the various experimental groups. On day 5 following transplantation, no IgG deposition was observed in any graft, irrespective of donor resident dendritic cell depletion. IgM staining, which was present in all grafts, was less pronounced in DDC-depleted grafts. However, at the time of rejection of parked grafts, a marked IgG deposit was observed, with a weak IgM staining (figure 6).

***Graft infiltrating T cell repertoire patterns are unaffected by donor dendritic cell depletion.***

The maximal accumulation of C $\beta$  RNA occurred on day 5 following transplantation when both donors and recipients were untreated. In agreement with a previous report [34], the global CDR3 length pattern was only poorly altered during acute rejection of hearts from unmodified donors ( $16.6 \pm 2.7\%$  variation in CDR3 length distribution (LD) from the

normality reference). As a shift towards a more altered TCR repertoire usage could reflect low frequency dominant clones and a more pronounced role of the indirect pathway, TCR repertoires were analyzed in both situations. Grafts from Cyclophosphamide-pretreated donors and parked grafts presented a similar level of CDR3 length distribution alteration on day 5 ( $17\pm 2.5\%$  and  $16.5\pm 3.5\%$  variation in CDR3 LD from the normality reference, respectively) which did not significantly differ from that of the unmodified grafts.

## DISCUSSION

The fine mechanisms of acute allograft rejection are still not fully understood [37], particularly the role of resident graft dendritic cells, which has long been considered as central in the initiation of rejection [5, 6, 19, 20]. These professional APC are believed to directly present donor MHC/peptide complexes to cross-reactive naïve and memory recipient T cells [38, 39]. Indeed, experimental depletion of donor dendritic cells by bone marrow toxic agents [23] or the use of grafts from animals with chimeric bone marrow [40] or lacking MHC genes [15], delays rejection in rodent models. Furthermore, long term survival has been reported using F1 transplants [5, 6], a characteristic potentially allowing graft targeting by recipient regulatory T cells [41]. However, the exact role for resident DC in the rejection of fully MHC mismatched grafts is tempered by several additional observations, including a strain-dependant effect [20, 23, 24, 26] and a modest effect of donor class II gene invalidation [16]. The survival of DDC-depleted grafts is generally prolonged in F1 to parent combinations [5, 6, 26]. Strain-dependent differences in resident dendritic cell numbers [42, 43] have been proposed to partly explain this strain-dependent effect of graft dendritic cell depletion [23]. In addition, some treatments or manipulations, such as “passive enhancement”, to inhibit the immune response of the intermediate recipient during a “parking” phase, aimed at depleting allogenic resident dendritic cells [5, 6], may affect the “antigenicity” of the transplant and favor ‘carry-over’ of regulatory cells (see below). Finally, recent studies using different experimental strain combinations [29, 30], including studies by our own laboratory [27, 28], have demonstrated that donor dendritic cells are “paradoxically” required for tolerance, particularly in spontaneous liver tolerance induction [29, 30] and when using Donor Specific Transfusion [27] or anti-donor class II antibodies [28].

In this paper, we revisited the effects of donor dendritic cell depletion on subsequent graft survival in a rat model of MHC incompatible cardiac allotransplantation and extended the study to an analysis of graft infiltration. We found that Cyclophosphamide was neither able to

totally deplete resident dendritic cells (4-5% of donor class II positive cells remained within the hearts on day 5 after injection) nor to delay graft rejection. Since the sensitivity of dendritic cells to toxic agents may vary according to the rat strain used [23] and since minute amounts of dendritic cells have been shown to efficiently stimulate naïve T cells in Mixed Lymphocyte Reactions, we also investigated parking of LEW.1W hearts in LEW.1A intermediate recipients. This procedure was associated with a lack of donor class II staining in hearts at the time of organ collection. This was not surprising given that DDC are known to migrate into host lymphoid organs within the first few days following transplantation [44, 45]. However, interestingly, this parking procedure resulted in a significant accumulation of intermediate recipient dendritic cells. Whether this increase may or may not influence the fate of the subsequent graft, and to what extent, is questionable because of the effect of “forced” dendritic cell infiltration in murine transplant models [46, 47]. Conditioning the intermediate host with anti-donor MHC-antibody [5, 6] is associated with an abundant inflammatory infiltrate in the “enhanced” graft [28] which may interfere with the mechanisms of subsequent graft survival prolongation. Moreover DST-induced tolerance is associated with regulatory cells within the graft itself [48, 49]. Cyclosporin A has thus been preferentially used in our experiments to maintain the graft in a viable state in the intermediate host during the parking procedure. Cyclosporin A has been shown to down-regulate class II expression in rat tissues [50-52]. Furthermore, donor interstitial dendritic cells disappear after the second week of transplantation in CsA treated recipients [53]. Finally, we checked that treating LEW.1W donors with a dosing schedule of CsA similar to that given to the intermediate host in the parking experiments did not affect, per-se, the occurrence of rejection.

Despite a roughly similar graft survival in recipients of LEW.1W hearts lacking any donor class II positive cells, the procedure affected the magnitude and kinetics of the infiltrate and the transcriptional cytokine pattern within the graft. Indeed, on day 5 post-transplantation, dendritic cells depletion was associated with a decrease in both macrophage and T cell infiltration, with a more profound effect on T cells, particularly when parked hearts were used. Such quantitative data are not available in other reports on DDC depletion in the literature, although a dominant macrophage infiltrate was reported in the case of chimeric bone marrow donors [40]. This observation is strengthened by a decrease in inflammatory / potentially “regulatory” Th1/Th2 cytokines (IL2, IL6, IL10, IFN $\gamma$ ), in immunosuppressive cytokine TGF $\beta$  and in macrophage/monocyte-related cytokines (IL6 and IL10). Similarly, whereas IgM deposits were only observed on day 5, IgG was present on day 13 in parked hearts. These data suggest that although the resident dendritic cells are not required for

rejection, they condition the kinetics of graft infiltration, probably by rapidly recruiting recipient naïve T cells to the graft, with little effect on macrophages. However, as suggested by the modest effect on graft survival and by the immunohistochemical study performed at the time of rejection, the infiltrate was mostly affected in its temporal kinetics, in that its composition and magnitude at rejection a few days later was similar to that observed in unmodified grafts.

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

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

### **Acknowledgements**

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

## REFERENCES

1. Benichou, G., P.A. Takizawa, C.A. Olson, M. McMillan, and E.E. Sercarz, Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med*, 1992. 175(1): 305-8.
2. Waaga, A.M., A. Chandraker, M. Spadafora-Ferreira, A.R. Iyengar, S.J. Khoury, C.B. Carpenter, et al., Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation*, 1998. 65(7): 876-83.
3. Sayegh, M.H. and C.B. Carpenter, Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol*, 1996. 13(3): 221-9.
4. Gallon, L., B. Watschinger, B. Murphy, E. Akalin, M.H. Sayegh, and C.B. Carpenter, The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation.*, 1995. 59(4): 612-6.
5. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med*, 1982. 155(1): 31-41.
6. Lechler, R.I. and J.R. Batchelor, Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med*, 1982. 156(6): 1835-41.
7. Vella, J.P., M. Spadafora-Ferreira, B. Murphy, S. Alexander, W. Harmon, C.B. Carpenter, et al., Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation.*, 1997. 64(6): 795-800.
8. Baker, R.J., M.P. Hernandez-Fuentes, P.A. Brookes, A.N. Chaudhry, H.T. Cook, and R.I. Lechler, Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol*, 2001. 167(12): 7199-206.
9. Game, D.S. and R.I. Lechler, Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol*, 2002. 10(2-3): 101-8.
10. Lee, R.S., K. Yamada, S.L. Houser, K.L. Womer, M.E. Maloney, H.S. Rose, et al., Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(6): 3276-81.

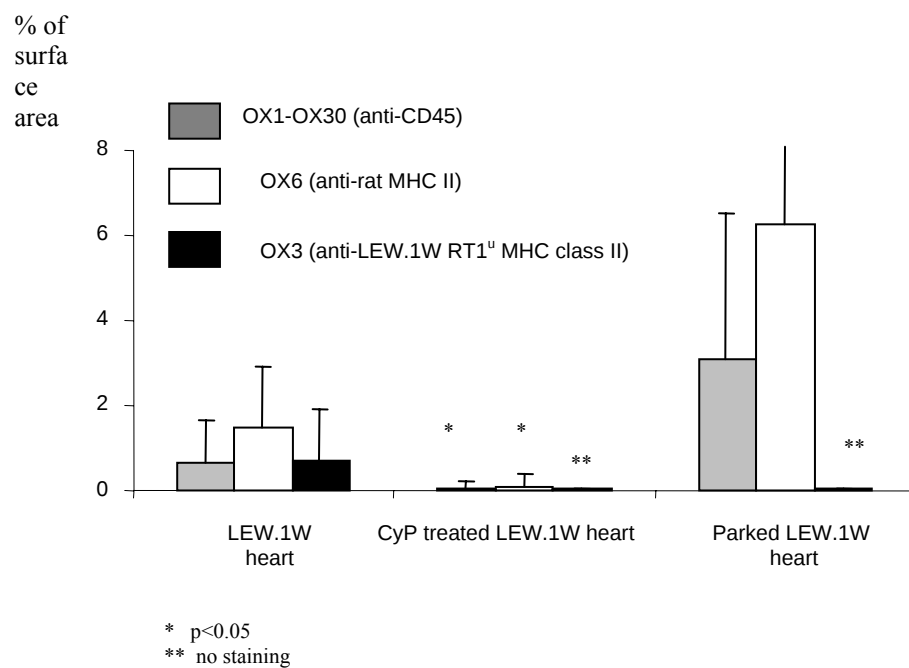
11. Szeto, W.Y., A.M. Krasinskas, D. Kreisel, A.S. Krupnick, S.H. Popma, and B.R. Rosengard, Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*, 2002. 73(7): 1116-22.
12. Stanford, R.E., S. Ahmed, M. Hodson, N.R. Banner, and M.L. Rose, A role for indirect allorecognition in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant*, 2003. 3(6): 736-42.
13. Ensminger, S.M., B.M. Spriewald, O. Witzke, O.E. Pajaro, M.H. Yacoub, P.J. Morris, et al., Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation*, 2002. 73(2): 279-86.
14. Benichou, G., R.C. Tam, L.R. Soares, I.A. Popov, M.R. Garovoy, and E.V. Fedoseyeva, The influence of two distinct alloresponse pathways on the design of peptide-based strategies for allograft tolerance. *Res Immunol*, 1996. 147(6): 377-87.
15. Auchincloss, H., R. Lee, S. Shea, J.S. Markowitz, M.J. Grusby, and L.H. Glimcher, The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(8): 3373-7.
16. Pietra, B.A., A. Wiseman, A. Bolwerk, M. Rizeq, and R.G. Gill, CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest*, 2000. 106(8): 1003-10.
17. Braun, M.Y., I. Grandjean, P. Feunou, L. Duban, R. Kiss, M. Goldman, et al., Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells. *J Immunol*, 2001. 166(8): 4879-83.
18. Qian, S., F. Fu, L. Lu, A.S. Rao, T.E. Strazl, A.W. Thomson, et al., Impact of donor MHC class I or class II antigen deficiency on first- and second-set rejection of mouse heart or liver allografts. *Immunology*, 1996. 88(1): 124-9.
19. Talmage, D.W., G. Dart, J. Radovich, and K.J. Lafferty, Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science*, 1976. 191(4225): 385-8.
20. Fabre, J. and P. Morris, The role of passenger leucocytes in the rejection of renal allografts in the rat. *Transplantation*, 1973. 15(6): 631-3.
21. Batchelor, J.R., K.I. Welsh, A. Maynard, and H. Burgos, Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. *J Exp Med*, 1979. 150: 455.

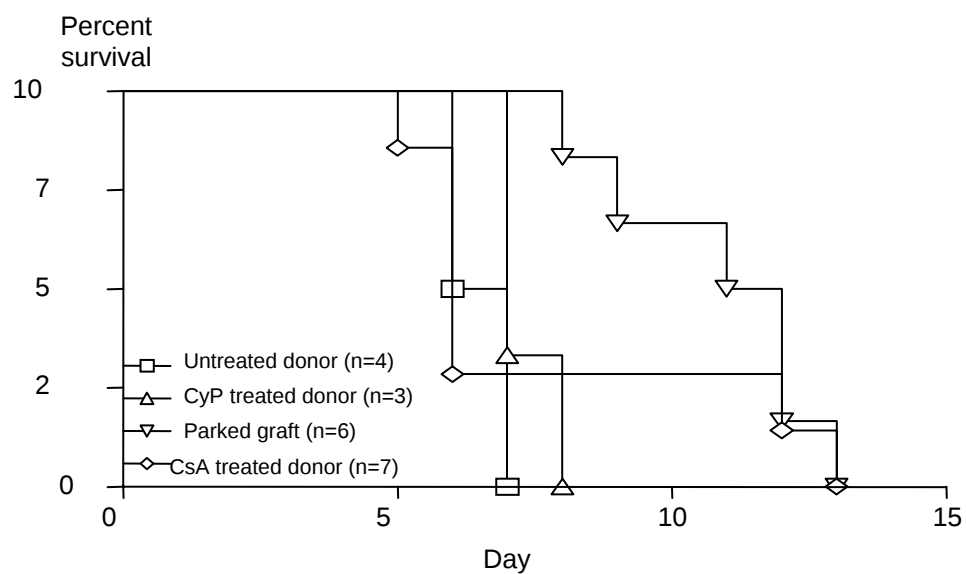
22. Welsh, K.I., J.R. Batchelor, A. Maynard, and H. Burgos, Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke T-dependent alloimmunity. II. Retransplantation of (ASxAUG)F1 kidneys from AS primary recipients into (ASxWF)F1 secondary hosts. *J Exp Med*, 1979. 150: 465.
23. McKenzie, J.L., M.E. Beard, and D.N. Hart, The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival. *Transplantation*, 1984. 38(4): 371-6.
24. Stegall, M.D., K. Tezuka, S.F. Oluwole, K. Engelstad, M.X. Jing, J. Andrew, et al., Interstitial class II-positive cell depletion by donor pretreatment with gamma irradiation. Evidence of differential immunogenicity between vascularized cardiac allografts and islets. *Transplantation*, 1990. 49(2): 246-51.
25. Wang, Z., A. Castellaneta, A. De Creus, W.J. Shufesky, A.E. Morelli, and A.W. Thomson, Heart, but not skin, allografts from donors lacking Flt3 ligand exhibit markedly prolonged survival time. *J Immunol*, 2004. 172: 5924-30.
26. Hart DN, W.C., Fabre JW., Graft adaptation: studies on possible mechanisms in long-term surviving rat renal allografts. *Transplantation*, 1980. 30(1): 73-80.
27. Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J.P. Soulillou, and M.C. Cuturi, Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood*, 1998. 92(12): 4539-44.
28. Gagne, K., S. Brouard, M. Guillet, M.C. Cuturi, and J.P. Soulillou, 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.
29. Sun, J., G.W. McCaughan, N.D. Gallagher, A.G. Sheil, and G.A. Bishop, Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation*, 1995. 60(3): 233-6.
30. Sriwatanawongsa, V., H.S. Davies, and R.Y. Calne, The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nat Med*, 1995. 1(5): 428-32.
31. Ko, S., A. Deiwick, M.D. Jager, A. Dinkel, F. Rohde, R. Fischer, et al., The functional relevance of passenger leukocytes and microchimerism for heart allograft acceptance in the rat. *Nat Med*, 1999. 5(11): 1292-7.
32. Ono, K. and E. Lindsey, Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1967. 57: 225-229.

33. Gagne, K., S. Brouard, M. Giral, F. Seville, A. Moreau, M. Guillet, et al., Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol*, 2000. 164(3): 1553-63.
34. Guillet, M., S. Brouard, K. Gagne, F. Seville, M.C. Cuturi, M.A. Delsuc, et al., Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol*, 2002. 168(10): 5088-95.
35. Seville, F., K. Gagne, M. Guillet, A. Pallier, S. Brouard, B. Vanhove, et al., Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilises specific Vb families without skewing of the CDR3 length distribution. *Journal of Immunology*, 2001. 167(6): 3082-8.
36. Hart DN, F.J., Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med*, 1981. 154(2): 347-61.
37. Rogers, N.J. and R.I. Lechler, Allorecognition. *Am J Transplant.*, 2001. 1(2): 97-102.
38. Lechler, R.I., G. Lombardi, J.R. Batchelor, N. Reinsmoen, and F.H. Bach, The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today*, 1990. 11(3): 83-8.
39. Morelli, A.E. and A.W. Thomson, Role of dendritic cells in the immune response against allografts. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 2000. 9(6): 607-13.
40. Krasinskas, A.M., S.D. Eiref, A.D. McLean, D. Kreisel, A.E. Gelman, S.H. Popma, et al., Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation*, 2000. 70(3): 514-21.
41. Mirenda, V., I. Berton, J. Read, T. Cook, J. Smith, A. Dorling, et al., Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(4): 987-97.
42. Darden, A.G., R.D. Clarke, and R.D. Guttman, Rat cardiac dendritic cells: frequency in inbred and congenic rats. *Transplant Proc*, 1987. 19(1 Pt 1): 208.
43. Darden, A.G., R.D. Forbes, P.M. Darden, and R.D. Guttman, The effects of genetics and age on expression of MHC class II and CD4 antigens on rat cardiac interstitial dendritic cells. *Cell Immunol*, 1990. 126(2): 322-30.
44. Larsen, C.P., P.J. Morris, and J.M. Austyn, Donor dendritic leukocytes migrate from cardiac allografts into recipients' spleens. *Transplant Proc*, 1990. 22(4): 1943-4.

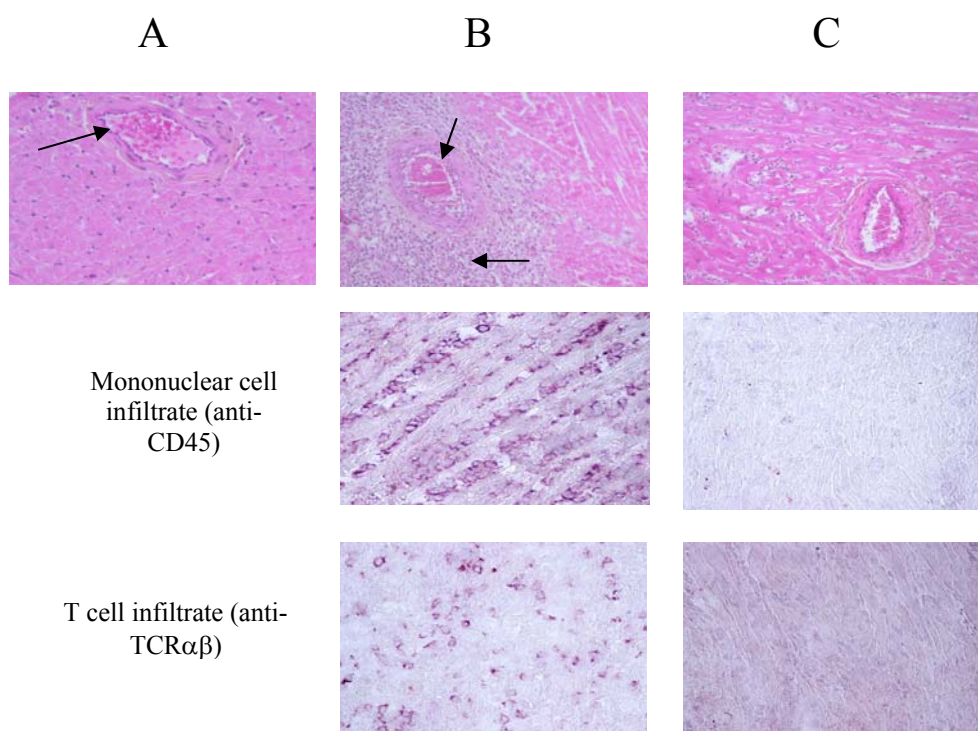
45. Saiki, T., T. Ezaki, M. Ogawa, and K. Matsuno, Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation*, 2001. 71(12): 1806-15.
46. Fu, F., Y. Li, S. Qian, L. Lu, F. Chambers, T.E. Starzl, et al., Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*, 1996. 62(5): 659-65.
47. Coates, P.T., F.J. Duncan, B.L. Colvin, Z. Wang, A.F. Zahorchak, W.J. Shufesky, et al., In vivo-mobilized kidney dendritic cells are functionally immature, subvert alloreactive T-cell responses, and prolong organ allograft survival. *Transplantation*, 2004. 77(7): 1080-9.
48. Douillard, P., C. Pannetier, R. Josien, S. Menoret, P. Kourilsky, J.P. Soulillou, et al., Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol*, 1996. 157(3): 1250-60.
49. Vignes, C., E. Chiffolleau, P. Douillard, R. Josien, H. Peche, J.M. Heslan, et al., Anti-TCR-specific DNA vaccination demonstrates a role for a CD8+ T cell clone in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *J Immunol*, 2000. 165(1): 96-101.
50. Groenewegen, G., W.A. Buurman, G.M. Jeunhomme, and C.J. van der Linden, Effect of cyclosporine on MHC class II antigen expression on arterial and venous endothelium in vitro. *Transplantation*, 1985. 40(1): 21-5.
51. Rincon, J., G. Parra, Y. Quiroz, L. Benatuil, and B. Rodriguez-Iturbe, Cyclosporin A reduces expression of adhesion molecules in the kidney of rats with chronic serum sickness. *Clin Exp Immunol*, 2000. 121(2): 391-8.
52. Charreau, B., S. Coupel, G. Boulday, and J.P. Soulillou, Cyclosporine inhibits class II major histocompatibility antigen presentation by xenogeneic endothelial cells to human T lymphocytes by altering expression of the class II transcriptional activator gene. *Transplantation*, 2000. 70(2): 354-61.
53. Milton, A.D., S.C. Spencer, and J.W. Fabre, The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in the rat. *Transplantation*, 1986. 42(4): 337-47.
54. Kreisel, D., A. Krasinskas, A. Krupnick, A. Gelman, K. Balsara, S. Popma, et al., Vascular endothelium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection. *J Immunol*, 2004. 173(5): 3027-34.

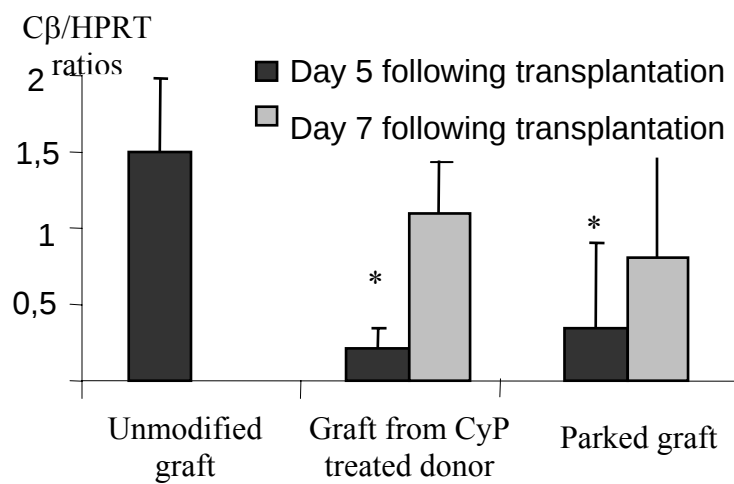
55. Sauve, D., M. Baratin, C. Leduc, K. Bonin, and C. Daniel, Alloantibody production is regulated by CD4<sup>+</sup> T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation. *Am J Transplant*, 2004. 4(8): 1237-45.
56. Reed, A.J., H. Noorchashm, S.Y. Rostami, Y. Zarrabi, A.R. Perate, A.N. Jeganathan, et al., Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *J.Immunol*, 2003. 171(12): 6502-9.
57. Jurcevic, S., P. Chandler, S.H. Sacks, and E. Simpson, Rapid rejection of HLA-A2 transgenic skin graft due to indirect allorecognition. *Transplantation*, 2001. 72(6): 994-7.

**Figure 1**

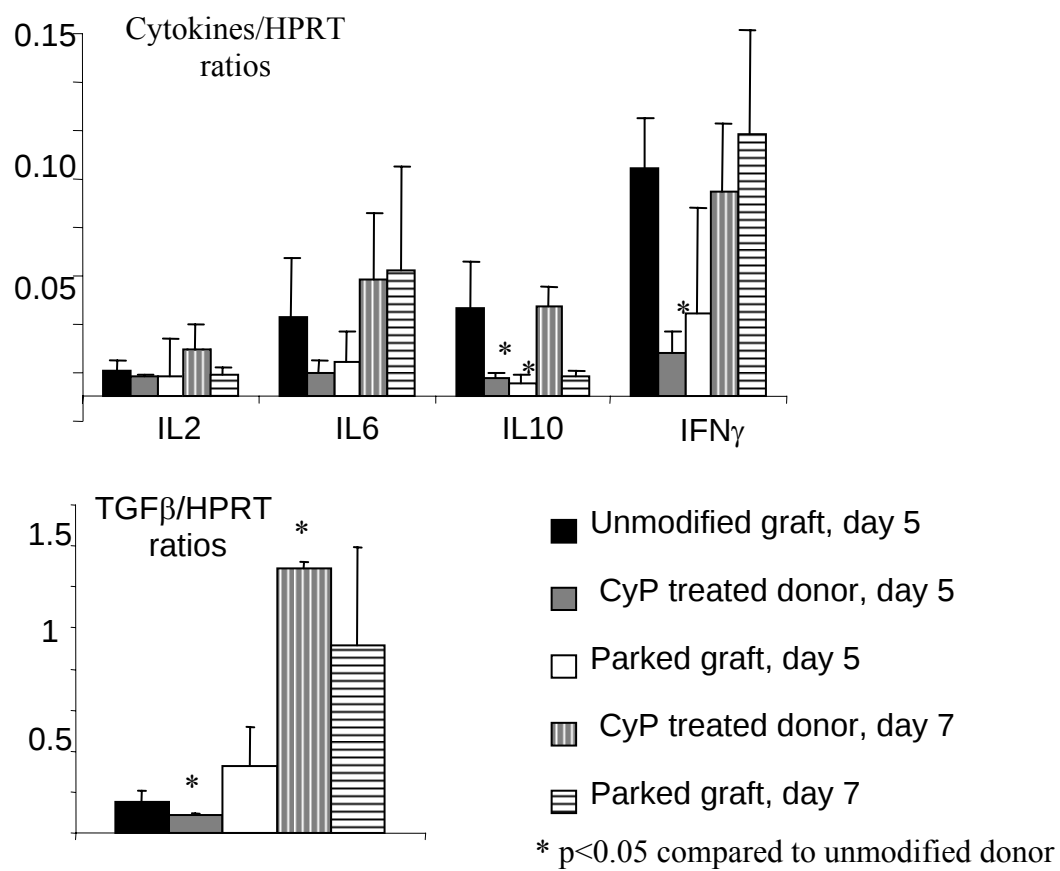
**Figure 2**

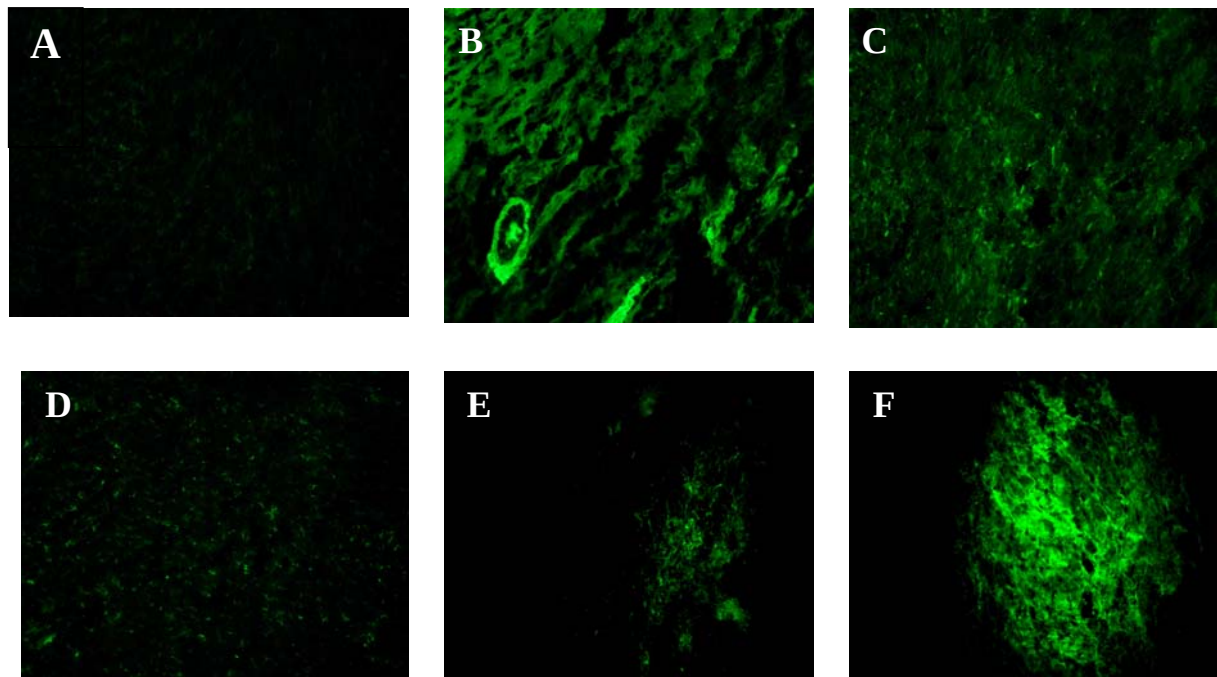
**Figure 3**



**Figure 4**

\*  $p < 0.05$  compared to unmodified graft on day 5

**Figure 5**



## LEGEND FIGURES

### Figure 1: Heart dendritic cell depletion after the Cyclophosphamide injection or parking procedure.

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

### Figure 2 : Graft survival.

Untreated donor (—□—) and CyP treated donor (—△—) graft survival was 6.5±0.5 and 7.3±0.5 days respectively, a non significant difference. Parked graft (—▽—) survival was moderately but significantly prolonged (10.8±1.9 days,  $p<0.05$ ) compared to that of untreated grafts. No significant prolongation was also observed following treatment of LEW.1W donors with CsA (—◇—), suggesting that a CsA carry-over could not account for the prolonged survival of parked grafts.

### Figure 3 : Graft histological analysis on day 5

A : A LEW.1W heart parked in an intermediate recipient treated with CsA : No fibrosis and mononuclear cell infiltration were observed. The endothelium was intact with no signs of vasculitis.

B : An untreated graft 5 days following transplantation. The histological examination showed a large mononuclear cell infiltrate with myocardial fiber necrosis. Vasculitis was observed, with inflammatory endarteritis and vascular narrowing. Anti-CD45 staining confirmed an abundant mononuclear cell infiltrate with a large proportion of T cells (anti-TCR $\alpha\beta$  staining).

C : A parked graft 5 days following transplantation. A mild infiltrate was observed, mainly composed of macrophages. Myocardial fiber structure was conserved and no vasculitis was observed. An immunohistological examination revealed a low-grade infiltration, with few or none TCR  $\alpha\beta$  staining.

**Figure 4: C $\beta$ /HPRT transcript ratios**

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

**Figure 5: Cytokine/HPRT transcripts-ratios in allografts on days 5 and 7.**

mRNA transcripts for IL2, IL6, IL10, IFN $\gamma$  and TGF $\beta$  were measured by competitive RT-PCR and divided by the number of mRNA copies of the non-regulated gene HPRT. The transcript levels of all cytokines, except TGF $\beta$ , decreased on day 5 in DDC-depleted grafts, but on day 7, they reached similar levels to those observed on day 5 in unmodified grafts, suggesting the immune response to have a delayed kinetics.

**Figure 6 : Graft Immunoglobulin deposits**

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

## DISCUSSION

Les cellules dendritiques du donneur, par leur qualité de cellules présentatrices professionnelles d'antigène, sont considérées comme la principale source de l'alloreconnaissance directe. Lors d'allogreffes d'organe, en l'absence de traitements ou de manipulations spécifiques, la voie de présentation directe prédomine dans les premiers jours suivant la greffe et participe donc à la survenue de rejet aigu (42). Cette hypothèse est confortée par les premières observations dans les années 1970-1980 où la survie des greffons déplétés en cellules dendritiques est prolongée (36,37,49,55). Cet effet est cependant inconstant, variable selon l'organe considéré, les combinaisons donneur/receveur étudiées et les moyens de déplétion utilisés. Lors d'une déplétion du greffon par un placement temporaire chez un receveur intermédiaire, le traitement de ce dernier peut modifier son immunogénécité. En effet, certaines stratégies thérapeutiques permettant d'éviter le rejet d'allogreffe s'accompagne de l'infiltration du greffon par des cellules ayant potentiellement des propriétés régulatrices. Ceci peut être observé lors d'un traitement du receveur par DST préalable ou lors de l'administration de sérum anti-classe II du donneur au receveur le jour de la greffe (81,88).

Ce dernier modèle a été particulièrement étudié dans le laboratoire dans la même combinaison donneur/receveur LEW.1W/LEW.1A (cf :article en annexe). L'injection de sérum anti-classe II du donneur (RT1<sup>u</sup>) le jour de la greffe entraîne la tolérance d'une greffe de rein LEW.1W (sans signe histologique de rejet chronique) et une prolongation significative de la survie des greffons cardiaques chez un receveur LEW.1A. Paradoxalement, dans ce modèle, les cellules dendritiques du donneur sont indispensables pour entraîner la prolongation de la survie d'une greffe de cœur. L'examen immunohistochimique des greffons rénaux « tolérés » 100 jours après la greffe montre un infiltrat cellulaire trois fois plus important que dans des greffons rénaux syngéniques. La majorité des cellules infiltrant les greffons expriment en surface des molécules de classe II. Le marquage par l'anticorps OX62 (anticorps anti-chaîne  $\alpha 1$  d'une intégrine présente sur les cellules dendritiques et les lymphocytes T) est également important. L'infiltrat lymphocytaire T n'est pas quantitativement différent de l'infiltrat observé lors d'une greffe rénale syngénique. En revanche, l'accumulation des transcrits C $\beta$  est significativement plus importante à

100 jours dans les greffons rénaux des animaux traités par du sérum anti-classe II que dans les greffons syngéniques, suggérant une activation plus forte de ces lymphocytes T. De plus, l'accumulation de transcrits FoxP3 est significativement plus élevée dans les greffons des receveurs traités par sérum anti-classe II, ce qui pourrait correspondre à une activité suppressive des cellules T (ou des cellules T activées ?) qui infiltrent ces greffons. Par ailleurs, la tolérance peut être transférée à un animal naïf (LEW.1A) par l'injection de splénocytes totaux des animaux traités par sérum anti-classe II et tolérant leur greffon rénal, mais ni avec des lymphocytes purifiés ni avec des splénocytes déplétés en lymphocytes T. Ceci suggère la nécessité d'une coopération entre les cellules T et non-T, probablement par un mécanisme impliquant IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase, enzyme intervenant dans le catabolisme du tryptophane). En effet les cellules T aux propriétés régulatrices semblent induire des cellules dendritiques produisant cette enzyme (316). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse qu'un greffon « toléré » chez un receveur traité au moment de la greffe par du sérum anti-classe II du donneur puisse contenir des cellules (T et/ou non T) ayant des propriétés suppressives. Ceci pourrait entraîner une prolongation de la survie de ce même greffon s'il était greffé chez un deuxième receveur (syngénique du receveur intermédiaire) non traité. Ce type de traitement (sérum anti-donneur) a été administré dans les expériences initiales de Lechler *et al.* (36,37). La prolongation de survie du greffon est liée à la déplétion en cellules dendritiques du donneur mais on ne peut cependant exclure l'hypothèse de cellules aux propriétés « régulatrices » transférées avec le greffon. Un transfert de tolérance avec le greffon lui-même a déjà été observé chez les rongeurs dans un modèle de greffe de peau (204). Il serait intéressant de confirmer ou d'infirmer si dans le modèle de tolérance par l'injection de sérum anti-classe II, la tolérance peut être transférée par le greffon lui-même.

Dans cet article, nous avons choisi deux moyens différents pour dépler les greffons en cellules dendritiques du donneur. L'injection de cyclophosphamide au donneur entraîne une déplétion, importante mais partielle, des cellules dendritiques (>90%). Cependant Mc Kenzie *et al.* avaient montré qu'un faible nombre de « leucocytes résidents » pouvaient être suffisants pour empêcher une prolongation de survie des greffons cardiaques (72). Nous avons donc choisi de dépler les greffons également par un placement temporaire chez un hôte intermédiaire, en administrant à ce dernier un traitement qui n'interfère pas à priori sur la survie du greffon chez un

deuxième receveur. La survie des greffons déplétés par cyclophosphamide n'est pas prolongée par rapport à des greffons contrôles. En revanche, après un placement intermédiaire, la survie est très modérément mais significativement prolongée. Ceci peut être lié au fait que la déplétion est plus importante, voire totale, dans le deuxième cas. La cinétique retardée du rejet peut donc correspondre à une activation des lymphocytes T essentiellement par voie indirecte, avec une participation minime ou nulle de la voie directe. On ne peut en effet exclure totalement une présentation directe par les cellules endothéliales activées du greffon (qui peuvent donc exprimer des molécules du CMH de classe II) aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> du receveur. Cependant l'examen immunohistochimique des greffons déplétés 5 jours après la greffe ne montre aucun marquage spécifique des molécules de classe II du donneur. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> du receveur pourraient également être activés par voie directe par des cellules endothéliales comme cela a été montré dans d'autres modèles (47). Ils ne représentent cependant qu'une faible proportion de l'infiltrat des greffons déplétés en cellules dendritiques du donneur. De plus, la présence de dépôts d'anticorps (surtout des IgG) au moment du rejet dans ces greffons déplétés est un élément en faveur de l'implication de la voie indirecte. En effet, la production d'alloanticorps est surtout sous la dépendance d'une coopération lymphocytes B et lymphocytes T activés par voie indirecte (317).

Nous avons ainsi montré que la présence des cellules dendritiques du donneur, qui sont nécessaires à l'induction d'une tolérance ou d'une importante prolongation de survie du greffon, par DST ou par injection de sérum anti-classe II du donneur, dans la combinaison étudiée dans le laboratoire (LEW.1W/ LEW.1A) ne sont cependant pas nécessaires à la survenue du rejet aigu. Ce rejet semble secondaire à l'activation lymphocytaire T par voie indirecte (en raison de la cinétique un peu décalée et de l'infiltrat du greffon) et à l'action des autres cellules du système immunitaire, notamment les macrophages (qui composent la majorité des cellules infiltrant les greffons déplétés) et les lymphocytes B (avec la production d'alloanticorps). Il a en effet déjà été montré que lors du blocage d'une voie prédominante dans le rejet, d'autres voies, normalement accessoires, « prennent le relais » et induisent alors un rejet aigu (95,318).

## Clinical operational tolerance after kidney transplantation

Gwenaëlle Roussey-Kesler<sup>1\*</sup>, Magali Giral<sup>1\*</sup>, Anne Moreau<sup>2</sup>, Jean-François Subra<sup>3</sup>, Christophe Legendre<sup>4</sup>, Christian Noël<sup>5</sup>, Evangeline Pillebault<sup>6</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup> and Jean-Paul Soulillou<sup>1</sup>.

Both authors equally contribute to this work

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

<sup>2</sup> Service d’Anatomopathologie, CHU-HOTEL DIEU, 44 093 Nantes Cedex 01, France.

<sup>3</sup> Service de Néphrologie, CHU, 4 rue Larrey, 49 033 ANGERS Cedex

<sup>4</sup> Service de Néphrologie, Hôpital Necker, 149 rue de Sèvres, 75 015 PARIS Cedex 15

<sup>5</sup> Service de Néphrologie, Hôpital Calmette, Bd du Professeur Leclerc, 59037 Lille Cedex

<sup>6</sup> Service de Néphrologie, Hôpital Saint-Louis, 1 av Claude Vellefaux ,75475 Paris

Keywords: Operational tolerance, kidney transplantation, immunosuppression withdrawal

Address correspondence to Pr. Jean-Paul Soulillou, I.N.S.E.R.M U643, CHU-HOTEL DIEU, 30 Bd Jean Monnet, 44035 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](mailto:Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr)

---

## Abbreviations

Ab: Antibody

ACE: Angiotensin-Converting Enzyme

ATG: Anti-Thymo-Globulins

AZA: azathioprine

CHOP: Cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone

CS: Corticosteroids

CsA: Cyclosporine

DGF: Delayed Graft Function

EBV: Epstein-Barr Virus

HBV: Hepatitis B Virus

HCV: Hepatitis C Virus

HLA: Human Leucocyte Antigen

MMF: Mycophenolate Mofetil

PRA: Panel Reactive Antibody

PTLD: Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder

## Abstract

Induction of specific tolerance to allografts is one of the major therapeutic challenge in transplantation. Recognising a “tolerance” state in long term recipients of transplant under immunosuppression and stable graft function is also important. Clinical “operational tolerance”, defined as a stable and acceptable graft function without any immunosuppressive for years, is exceptionally reported on renal transplantation. We reported here on a detailed analysis of medical history of a cohort of ten kidney recipients, who display a state of “operational tolerance” during a minimal period of  $9\pm 6.3$  years. Seven out of 10 recipients interrupted progressively (during 1 to 4 years) their immunosuppressive treatment because of non-compliance (two others patients for malignancies and one patient for drug toxicity). Young donor age and mismatched cadaveric status were particular characteristics. Induction therapy was not systematically applied, and maintenance regimen varied following transplantation dates. After treatment withdrawal, patients did not present significant infections or neoplasia. Anti-donor immune response can persist in “operationally tolerant” recipients, as assessed in two recipients who developed anti-donor class II antibodies, without impairment of graft function. Two patients finally degraded renal function 9 to 14 years after treatment withdrawal, without histological lesions of chronic rejection for one of them rather suggesting a non-immunological event.

## Introduction

The advent of renal transplantation has notably reduced morbidity and mortality in patients with end-stage renal disease. The prospects of such patients have also been improved thanks to new immunosuppressive molecules that have dramatically reduced the risk of acute rejection (1) and prolonged graft survival (2). However, immunosuppressive treatments have numerous side effects, including infectious complications (3), tumoral disorders (4,5), diabetes, and hyperlipemia (see for review (6)). Calcineurin inhibitor-related-nephrotoxicity also greatly contributes to the development of chronic allograft nephropathy in long-term functioning grafts (7). Moreover, immunosuppression poorly influences chronic rejection, the main cause of graft loss in renal transplantation, when death with a functional graft is excluded (8,9). Understanding the mechanisms of immune tolerance in humans is therefore crucial if induction of graft-specific tolerance or minimization of immunosuppressive treatment, two major challenges within the field transplantation, are to become achievable.

In rodents, tolerance to allotransplants can be obtained using several strategies, including the induction of chimerism (10-12) and co-stimulatory blockade (13) (14). However, tolerance has rarely been established in large animals models and is exceptional in humans. “Operational tolerance” is a clinical situation which is defined as a stable graft function without clinical features of chronic rejection and in the absence of any suppressive drugs, usually for more than one year. In humans, “operational tolerance” is observed more frequently in liver transplant patients than in others organ recipients (15,16). In renal transplantation, only a few «operationally-tolerant» patients have been reported. Some such patients have participated in protocols aimed at inducing chimerism, and have undergone donor bone marrow and renal transplantation simultaneously (17,18) or sequentially (19-23) to treat end-stage renal disease. Some of these recipients, with (19-23) or without (24) hemopathies seem to accept their graft without necessitating long-term immunosuppression.

Albeit rare, “spontaneous” operational tolerance has also been reported (25-33) (34), demonstrating that clinical “operational tolerance” to renal transplants can occur, although unidentified non-compliance to treatment may lead to underestimation of the phenomenon.

Despite being rare, such patients offer a unique opportunity to study clinical and biological characteristics potentially specific to and associated with tolerance. Previous studies have reported that some “operationally tolerant” recipients display an altered blood-T cell repertoire, as do patients with chronic rejection (34,35). However, interestingly, sorted populations with an altered repertoire from “operationally tolerant” patients differed from those from chronic rejection in that they displayed a state of hyporesponsiveness and did not accumulate inflammatory cytokines (34). Some “operationally-tolerant” patients may also harbor T regulatory cells able to inhibit anti-donor responses in a DTH test in vivo (33). Results from phenotypic studies suggest that “operationally tolerant” profiles do not differ from those of healthy volunteers ones whereas recipients with chronic rejection presented significantly less CD4+CD25<sup>hi</sup> cells (associated with regulatory cells)(Louis S. *et al*, submitted) and more CD8+CD28<sup>-</sup> cells with cytotoxic properties (Baeten D. *et al*, submitted). Finally, cDNA micro-arrays analysis of blood mononuclear cells from “operationally tolerant” kidney recipients and patients undergoing chronic rejection revealed a tolerance-specific pattern of differential gene expression (Brouard S. *et al*, submitted).

However “operationally tolerant” patients represent a model for tolerance in humans, and are now the subject of intense research. Despite, to date no detailed clinical analysis of such patients has been reported. In this paper, we report on the clinical description of a small cohort of 10 kidney recipients displaying clinical “operational tolerance” to their grafts years after interruption of their immunosuppressive treatment.

## Patients, Materials and Methods

Clinical “operational tolerance” was defined as a stable kidney graft function, without clinical markers of chronic rejection, and without any immunosuppressive drugs for more than one year. A creatininemia and proteinuria below 150 $\mu$ mol/l and 1g/24h respectively were defined as acceptable thresholds. The state of “tolerance” is therefore clearly clinically defined. For instance, despite having stable function, some of these patients possess anti-donor antibody reactivity (see below), clearly indicating that this “definition” does not exclude specific mechanisms. Graft biopsies were not performed on these normally functioning kidneys for ethical reasons. However, biopsies were performed in patients who lost their “tolerance criteria” over time. The characteristics of the ten patients meeting these clinical criteria are detailed in the case reports and are summarized in table 1. Further biological data are given in table 2. Creatininemia and proteinuria evolution are depicted for each patient in figure 1.

### *Case reports*

Case 1: A.S. had a membrano-proliferative glomerulopathy. He received a first living related HLA-identical donor kidney, which was immediately lost because of an arterial thrombosis. This patient was not HLA immunized (previous blood transfusions are not documented). He contracted both an HCV (Hepatitis C Virus) and an HBV (Hepatitis B Virus) infection, probably during the period when he was under hemodialysis. At 42 years of age, he received a second renal transplant, from a cadaveric donor, with 1 HLA class I incompatibility. His immunosuppressive treatment (in 1973) consisted of an initial cyclophosphamide perfusion, relayed with CS and AZA. Graft function was delayed until day 15. During this period an acute rejection was suspected but not biopsy-proven, and treated with Cyclophosphamide and CS boluses. His evolution was then marked by several bacterial infections (abscess, pneumopathies). His HCV was clinically quiescent and he spontaneously recovered from HBV. Five years after transplantation, a systematic graft biopsy showed a discrete interstitial mononuclear infiltrate, and C3 and IgM deposits on arteriolar walls, interpreted as a border-

line rejection, but he was not treated at this time. At this point, the patient progressively stopped taking his immunosuppressive medication (uncompliance) over an estimated period of 4 years, i.e. between 12 and 16 years after transplantation. Twenty-six years later, his creatininemia is 113  $\mu\text{mol/l}$  and he only receives an association of a calcic inhibitor and a  $\beta$ -blocker to treat an arterial hypertension.

Case 2: F.J. had an obstructive uropathy. He was 15 years old when hemodialysis was started. Despite 6 blood-transfusions, only a weak anti-HLA immunization was detected once (PRA 7%). A few months later, he received a first cadaveric, 3 HLA class-I incompatible renal transplant. The donor was 7 years-old. He received no induction therapy. CS and AZA were administered from day 0. Seven days after transplantation, he was treated with CS boluses for a clinically suspected acute rejection (not biopsy-proven). He was found to be positive for a Hepatitis C Virus (HCV) which was probably contracted during the period he was under hemodialysis. This disease was still clinically quiescent. Because of non-compliance, he stopped his immunosuppressive treatment 16 years ago over an estimated time period of 2 years. His renal function has remained unchanged, with a creatininemia at 139  $\mu\text{mol/l}$  and a proteinuria at 0.93g/d.

Case 3: M.R. presented end-stage renal disease related to an undetermined glomerulopathy. He was transfused 4 times before grafting; no HLA immunization was detected. At 41 years of age, he received a first renal transplant from a 16 years-old cadaveric donor, with 4 HLA incompatibilities. He received ATG for 15 days as induction therapy. His maintenance immunosuppressive regimen consisted of Ciclosporin (CsA), corticosteroids (CS) and azathioprine (AZA). The graft began functioning after 8 days. CS were stopped 3 months after transplantation (according to the protocol at that time). No significant infections were noted. After 13 years, and following an estimated period of two years of inconstant drug intake, the patient finally stopped taking his immunosuppressive medication (due to

uncompliance). Five years following total interruption, his creatininemia is at  $89\mu\text{mol/l}$  without proteinuria. During this period, he did not present opportunistic infection, EBV reactivation, or positive PRA. His only treatment is an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor to treat moderate hypertension.

Case 4: Y.M.L. had a past history of Crohn's disease which resulted in colectomy, and a nonobstructive nephropathy. He received his first cadaveric 4 HLA incompatible renal transplant at the age of 19. His induction therapy consisted of ATG and a maintenance regimen of CsA, AZA and CS. An acute rejection was suspected on day 6 post-surgery and treated with CS boluses; no graft biopsy was performed. Nine years after transplantation, he started to space out his immunosuppressive drug intake and definitively stopped it one year later. Eight years after immunosuppression withdrawal, his renal function remains stable with a creatininemia at  $150\mu\text{mol/l}$  and proteinuria at  $0.11\text{g/d}$ . He did not present notable infections. He is only treated for hypertension ( $\beta$ -blockers and a central anti-hypertensor).

Case 5: S.P. had a renal dysplasia secondary to posterior urethral valves obstruction. He presented a weak HLA immunization (12% for HLA class II) secondary to 2 blood transfusions. After one year of dialysis, he received his first kidney transplant from a 21-years-old cadaveric donor with 3 HLA incompatibilities. At this date (1991), he was 13 years old. He was given ATG for 11 days and his maintenance treatment was an association of CsA, AZA and CS. He displayed no delayed graft function. He had 6 graft biopsies during the 5 first years of transplantation, all because of moderate episodes of renal dysfunction. All, but one, showed interstitial fibrosis without an infiltrate or tubulitis. One biopsy showed a plasmocyte and lymphocyte focal infiltrate, without tubulitis, suggesting a borderline rejection which was treated with steroid boluses. He presented a zoster in 1993, a symptomatic herpetic manifestation in 1996, and a primo-infection with Epstein-Barr Virus the year following transplantation. CS were progressively withdrawn after an estimated period

of 7 years after transplantation. In 1999, he developed a multifocal post-transplantation lymphoproliferative disorder (PTLD) relative to EBV, and his immunosuppressive medication (CsA and AZA) were abruptly interrupted. PTLD treatment consisted of chemotherapy (CHOP) and radiotherapy. Currently, 6 years after PTLD treatment, S.P. is being treated with valacyclovir and he is considered to be cured from his disease. His renal function remains stable (creatininemia 123  $\mu\text{mol/l}$ , proteinuria 0.33g/d).

Case 6: H.L., 64 years of age, whose initial disease was an interstitial nephropathy, received her first cadaveric kidney transplant from a 39 years-old donor with 3 HLA incompatibilities in 1993. She had been previously transfused several times and had been pregnant twice. She presented low levels of HLA antibodies (PRA 9%) before transplantation. She received no induction therapy, and her immunosuppressive treatment consisted of CsA, CS and mycophenolate mofetil (MMF). She displayed a delayed graft function which was interlinked with an acute rejection episode diagnosed on the 14<sup>th</sup> day (Banff classification: Ib) treated with CS boluses. CS were stopped 5 months after transplantation, and MMF one month later (because of cytopenia). A second acute rejection episode occurred 7 months later (Banff Ia) and 3 CS boluses were administered. During the first year of transplantation, H.L. presented numerous bacteriological infections (urinary infections, pneumopathy, colitis). She also presented cutaneous cancer (basocellular carcinoma). Because of chronic water retention, poor graft function (creatininemia around 200 $\mu\text{mol/l}$ ) and a very poor clinical condition, hemofiltration and hemodialysis were started 12 months after the transplantation. CS and CsA were subsequently stopped. At this time, a donor anti-class II antibody was detected (anti-DR11). Surprisingly, after months of chronic dialysis, her renal function progressively recovered and she no longer required dialysis. Renal-DMSA scintigraphy performed in 2002 showed no residual native kidney function, but a functional kidney graft. Twelve years after

transplantation, and 11 years after immunosuppression withdrawal, her creatininemia is 96  $\mu\text{mol/l}$  and proteinuria below 0.5g/d.

Case 7: F.C.E presented a renal failure related to renal hypoplasia. She had a cervical in situ carcinoma, treated with a surgical exeresis, and considered as cured now. Pre-graft immunization was noted (PRA 15%) secondary to 5 blood transfusions. At the age of 27, she received her first cadaveric kidney from a 30 year-old donor with 4 HLA incompatibilities. She received an induction therapy with ATG for 7 days. Her maintenance regimen consisted of CsA and CS from day 0, and additional AZA after the 6<sup>th</sup> month. She displayed no DGF. She progressively stopped her immunosuppressive treatment due to non-compliance: first CS and AZA 3 years after transplantation, then CsA administration was spaced out over a 4 years-period. She displayed a donor-class II immunization (anti-DR04) during CsA monotherapy. She has now been without treatment for 1 year. She has never presented a rejection episode and her renal function is currently stable (creatininemia 115 $\mu\text{mol/l}$ , proteinuria 0.15g/d).

Case 8: I.K. suffered from a testicular cancer with hepatic metastasis treated with chemotherapy (including cisplatinium) and bone marrow auto-transplantation. He then developed renal failure which was attributed to drug toxicity, and lead to hemodialysis. He underwent 2 blood transfusions without subsequent anti-HLA immunization. At 22 years of age, he received a renal transplant from his HLA-identical 28 year-old brother. He was treated with CsA, MMF and CS without ATG. CS were stopped one month later. Less than one year after transplantation, he spaced out his immunosuppressive drug administration due to non-compliance and definitively interrupted his immunosuppressive medication 2 years after transplantation. He is now only being treated for an arterial hypertension ( $\beta$ -blocker) and continues to display a normal renal function (creatininemia 115  $\mu\text{mol/l}$ , proteinuria 0.05g/d) 5 years after immunosuppression withdrawal.

Case 9 : P.P. suffered an hypocomplementemic glomerulopathy leading to renal failure. He received 2 blood transfusions and had low PRA levels (7%). He had a chronic VHB assessed with the presence of AgHBs. At 43 years of age, he received a kidney transplant in 1980 for the first time, from a 3 HLA incompatible 17 year-old cadaveric donor. He was treated with AZA and CS from day 0. He progressively stopped his immunosuppressive medication due to non-compliance, between 9 and 11 years after transplantation. He maintained a stable renal function until 2002 (creatininemia below 150 $\mu$ mol/l), more than 10 years after immunosuppressive treatment withdrawal. During this period, he did not present notable infection and he was treated for a severe arterial hypertension (ACE inhibitor and  $\beta$ -blocker) and for hyperlipemia. Since 2002, his renal function has started to degrade after 9 years of “operational tolerance”. A subsequent graft biopsy revealed a nephroangiosclerosis, focal interstitial fibrosis and tubular atrophy without a cellular infiltrate, and without arterial or glomerular lesions evoking moderate chronic allograft nephropathy (classified as Banff I)(figure 3). Despite MMF introduction, he has required dialysis since 2003. No anti-HLA antibodies have been detected.

Case 10: M.C presented an undetermined glomerulopathy. He was transfused 4 times and developed low PRA levels (4% for HLA class II). At the age of 52 years, he received a first kidney transplant from a 3 HLA incompatible 30 year-old cadaveric donor. He received an anti –IL2 receptor antibody together with CsA, AZA and CS. CS were stopped 2 months later. Seven years later; he developed a PTLN that was treated with chemotherapy (CHOP) and his immunosuppression was abruptly withdrawn. He kept a stable renal function for 7 years without immunosuppression, with an apparently cured PTLN, until a significant proteinuria appeared and his renal function progressively degraded requiring dialysis in 2004. A graft biopsy was performed in 2002 and showed an allograft glomerulopathy (with segmental thickening of the glomerular basement membrane with a double contour), indicative of a

chronic allograft nephropathy with chronic but not acute rejection component (Banff Ib)(figure 3). At this time, the presence of anti-HLA class II antibodies was suspected, but could not be confirmed on serial samples.

## **Cross-sectional analysis**

### ***Donor and recipient ages, DGF and cold ischemia***

The dates of transplantation for these patients are spread over a long period of time (1973 to 1998). Their median age at the time of transplantation was 34 years old (range 13 to 64 years) which is relatively young for a renal transplantation. Their donors were also young and younger than themselves, with a median age of 25 years (range 7 to 39 years). It was a first kidney transplantation for 9 out of 10 patients. Cold ischemia was on average  $26.4 \pm 12.8$  hours and 4 patients had a delayed graft function, defined as the requirement of at least one dialysis during the first week for transplantation.

### ***Blood transfusions, pre-graft immunization and HLA incompatibilities***

Eight patients were transfused before transplantation ( $6 \pm 7.3$  blood transfusions). Possible blood transfusions before transplantation could not be documented for the two others patients. Six patients presented a low anti-HLA immunization, with mean PRA levels of  $9 \pm 3.9\%$  (range 4 to 15%) (in most cases, anti-HLA antibodies are not determined for class I or class II). Most of these blood transfusions occurred before 1990, were not realised with deleucocytized blood. The HLA incompatibilities were  $3 \pm 1.5$ . The quality of matching varied between 1973 and 1998, and donor MHC class II was not determined for 2 patients (transplantation in 1973 and in 1981). These data are outlined in table 3.

### ***Induction and maintenance treatment***

“Operationally tolerant” patients received a different induction therapy and maintenance regimen. Seven patients received an induction therapy: 4 with ATG, 2 with an anti-IL2 receptor antibody and 1 with cyclophosphamide injected I.V. Three patients underwent transplantation before the ciclosporin era, and received a maintenance regimen of AZA and CS. All of the others received ciclosporin for a mean period of 7.2+/-4.9 years before interruption.

### ***Rejection and post-transplant immunization***

Five patients were clinically diagnosed with acute rejection, but it was biopsy-proven for only two patients. In one patient (patient # 5), 6 graft biopsies were performed over 5 years because of moderate and recurrent increase in creatininemia. These episodes resolved spontaneously, only focal fibrosis but no infiltration was noted. However, in one biopsy performed at 3 years from grafting, a borderline rejection was diagnosed and the patient was treated. Interestingly, 2 patients developed anti-donor class II antibodies: anti-DR11 antibodies detected once for patient # 6 (and were not checked thereafter), and anti-DR04 detected for 4 consecutive years for patient # 7. No concurrent impairment of graft function was observed.

### ***Infectious complications before and after treatment withdrawal*** (table 4)

Abnormal infectious episodes could indicate an aspecific state of immunoincompetence. *Before immunosuppression withdrawal*, none of these patients had presented CMV disease. Three patients presented symptomatic herpetic manifestation, one of them (patient # 5) also suffered from an EBV primo-infection one year after and a zoster two years after transplantation. Four patients suffered from recurrent bacteriological infections, essentially urinary, pulmonary and ORL infections. Three patients presented tumoral disorders after transplantation: basocellular carcinoma in one case (patient # 6) and PTLT in 2 cases (patients # 5 and # 10).

*After treatment withdrawal*, 2 patients (patients # 1 and 5) presented recurrent bacteriological infections. EBV reactivation was checked for 5 patients several years after treatment withdrawal and was negative for 3 of them. One patient had a weak EBV reactivation and the other (case 5 who had a EBV-induced PTLD) is still showing significant EBV replication ( $290/10^5$  PBMC) and is being treated with valacyclovir.

Concerning VHB immunization, 2 patients presented a VHB infection, probably contracted during the pre-transplantation period, from which they spontaneously recovered. One patient had a chronic VHB infection at the time of transplantation, but without significant cytolysis after transplantation. Six other patients retained protective anti-HBs titres after treatment withdrawal, but one of them (patient#10) progressively lost these protective antibodies (10 years after immunosuppression withdrawal).

Taken together, these incidence of infectious episodes which concerned a long period of survey was considered of the same order of what is encountered usually in kidney recipients. Infections during the immunosuppressive drug free phase were uncommon.

### ***Causes and modalities of immunosuppression disruption, stability of operational tolerance***

Immunosuppression was stopped at a mean of  $7.8 \pm 4.3$  years after the transplantation. PTLD was the reason for drug withdrawal in 2 patients. Seven patients stopped their immunosuppressive treatment due to non-compliance. The non-compliant patients did not interrupt their drugs abruptly, but usually over a long time interval. Although no precise time period can be reported, the mean period of progressive interruption has been estimated to  $1.8 \pm 1.5$  years. For the last patient (patient # 6), immunosuppressive medication was withdrawn because of drug toxicity and a very poor clinical condition. The mean period of stable “operational tolerance” was 9 years (range 1 to 20 years). Two out of 10 patients (patients # 9 and 10) developed a renal failure after 9 to 14 years of stable “operational tolerance”. In the two cases where renal function started to degrade, biopsies were performed

and showed a grade I chronic allograft nephropathy, without active rejection component, but with findings suggesting chronic rejection for one of them (patient# 10) (figure 3). No or mild cellular graft infiltration was found. The 8 other patients still display a stable renal function, with a creatininemia at  $118 \pm 20 \mu\text{mol/l}$  (range 89 to  $150 \mu\text{mol/l}$ ) and a proteinuria at  $0.20 \pm 0.17 \text{ g/d}$  (range 0.07 to  $0.5 \text{ g/d}$ )(cf: table 2).

## DISCUSSION

In this paper, we report on a small cohort of kidney recipients with clinical “operational tolerance”. For the first time, we present a detailed account of their medical history and their clinical long-term evolution. Anecdotal cases of long periods of “operational tolerance” in the absence of immunosuppression previously reported in the literature (28,32,33) are reviewed in table 5.

“Operational tolerance” in allotransplantation remains a clinically defined concept. It is usually defined as stable graft function at a good or acceptable level for several years in the absence of immunosuppressive treatment. Clinical “operational tolerance has to be differentiated to “partial tolerance” or “almost tolerance” which corresponds to a stable and correct graft function in minimally immunosuppressed recipients (low dose monotherapy) (36,37). However long-term exposure to even low-dose immunosuppressive drugs has been shown to control auto-immune diseases and can not be assimilated to a state of “operational tolerance”. Tolerance in human transplantation is difficult to define because some characteristics of immune tolerance in animal models, such as donor specificity or transfer of tolerance, are difficult or impossible to assess. Finally, it is not yet clear whether “operational tolerance” is a transitional or a permanent state, some patients may be at times tolerant, and other may be durably tolerant (38). We are aware that a of “true” tolerance can not be attributed to the patients reported here because knowledge of their graft histology is lacking. Graft biopsies were not proposed to these patients since they displayed normal renal function, without proteinuria. Nevertheless, despite this restriction, their acceptance of a mismatched cadaveric kidney, without any immunosuppressive drugs for years (sometimes decades) fulfils the most optimistic definition of tolerance and offers a unique opportunity to understand its mechanisms and to find clinical and biological fingerprints associated with tolerance in human.

A detailed analysis of these patients revealed some potentially interesting findings. The main cause of immunosuppressive treatment cessation was non-compliance (7 out of 10 patients) and the patients usually discontinued their drugs progressively. Furthermore, they usually withdrew one drug and then spaced out the administration of the remaining immunosuppressive drug, with several phases of “stop and start” intake. The exact period of time during which treatment was spaced out is difficult to determine but likely lasted several years (1 to 4 years) in most cases. This progressive “non-compliance procedure” mimics in some respects what is sometimes applied to liver recipients considered as being at low-risk for rejection (15,16,39). These patients are then followed closely during the withdrawal phase so as to treat any signs of rejection as early as possible. One can hypothesize that the prolonged phase of partial weaning and spacing out of intake in non-compliant patients may select these patients and favor a transition to a state of “operational tolerance”.

The occurrence of such “operational tolerance” might be under-estimated because non compliance is more frequent than actually confessed (40,41), varying, according to studies, from 18% (42) to 52% (43). Non-compliant patients can take sporadic doses of calcineurin inhibitors before consultation. A recent study revealed that 22.6% of renal recipients are non-compliers. These patients are at a higher risk of late acute rejection and of increased serum-creatinine (44). However, non-compliance also reveals states of clinical tolerance, as described in this paper.

The median period of “operational tolerance” observed at the time of the study is 9 years, which is already a considerably long period of time. Most of the patients are still display stable graft function. In a retrospective study of renal transplant recipients in the United States, 48 patients (out of 6000) were reported to be off immunosuppression for more than 5 days (27). This study revealed that 43% of the patients who stopped their treatment had a graft failure within the weeks or months following treatment cessation. Only 6 patients (12%)

maintained a stable renal function for more than 3 years (range 3 to 8 years). However, all of them having living-related HLA-identical donors (27). A few other anecdotal cases reported longer periods of “operational tolerance” of up to 20 years (28,33). All, but two, previously reported cases were recipients received grafts from living related donors whereas all but one recipient, in our cohort, received a kidney from a cadaveric mismatched donor (3+/-1.5 HLA incompatibilities). However, all of the donors in our study were young and younger than the recipients themselves, with a median age of 25 years for the donors , and 34 years for the recipients. Kidneys from aging donors are usually more susceptible to ischemia-reperfusion lesions, more often present delayed graft function and may display a higher antigenicity (45). One can hypothesize that the good “quality” of the graft, with few age-related lesions (glomerulosclerosis, interstitial fibrosis), may be a condition for the establishment of tolerance.

The renal function of two patients degraded during the study period, 9 to 14 years after treatment withdrawal. Only one patient received an induction therapy (anti-IL2R antibodies). There was no indication of poor graft quality, donor age was below 30 years and no prolonged delayed graft function (less than 3 days) was observed for either patient. One year post-transplantation creatininemia was not elevated (103 and 99  $\mu\text{mol/l}$  for cases 9 and 10 respectively). These two patients did not present acute rejection during the early post-transplant period, or later during the chronic immunosuppressive regimen, in contrast to 5 other “operationally tolerant” patients who are still “tolerant” more than 6 years following immunosuppression withdrawal. Graft biopsies performed when renal function started to degrade showed no signs of acute or chronic rejection for one patient (patient#9), with no glomerulopathy or vascular lesions, and only a moderate and focal cellular infiltrate. This suggests that the degradation may not be immunologically driven, and the histological lesions observed rather evoke nephroangiosclerosis (figure 3). In contrast, the biopsy from the other

patient (case 10) showed moderate signs of chronic rejection with allograft glomerulopathy and IgM and C1q deposits (figure 3). Nevertheless, there was no active component. Two previous cases of graft biopsy performed during the phase of “operational tolerance” have been reported. One of them presented a moderate and focal infiltrate with an arteriolar intimal hyperplasia despite stable renal function, suggesting the beginnings of chronic allograft nephropathy lesions (29). The histology of the other graft was obtained under unusual circumstances (autopsy following murder) and was described as normal (28).

All together, these rare histological observations show that some of the patients described here may have a low level of limited immune response against their kidney transplant. As observed in several animals models (46,47), an immune response to the graft may occur despite apparent normal graft function, as assessed by the presence of specific T regulatory cell able to transfer the tolerance (48). Interestingly, two patients had anti-donor class-II antibodies without showing degradation of renal function. Terasaki et al. have shown that the late appearance of anti-donor antibodies is associated with the secondary apparition of chronic rejection (49). However, one patient, who had anti-donor class II antibodies when immunosuppressive drugs were stopped, still exhibits a stable renal function more than 10 years later. For the second patient, the time interval since the observation of these antibodies is too short to enable conclusions to be drawn (immunosuppressive treatment has only been stopped for one year) but anti-donor class II antibodies have been detected for 4 years, without any significant increase in creatininemia.

These “operationally tolerant” patients did not seem to be aspecifically immunosuppressed because they did present neither opportunistic nor frequent or severe viral infections nor neoplasia after immunosuppression withdrawal. Furthermore, their protective anti-HBs titres remain stable, reflecting for a part their immunocompetence. However, one can hypothesize

that these patients are “poor alloreactive responders” because they presented unusually low levels of PRA before the transplantation despite an average of 6 blood transfusions (50).

The mechanisms associated with experimental tolerance in allotransplantation are clonal deletion, sometime associated with mixed chimerism, anergy, ignorance and regulation (see for review (38,51)). Central clonal deletion is considered as the more robust way to induce prolonged and specific tolerance in organ transplantation but implies myeloablative treatment and donor bone marrow transplantation, currently limiting the application to patients with malignant hemopathy associated with renal insufficiency (17,18). Regulation, alone or associated with anergy, has also been suggested to play a role in previous reported cases of “operational tolerance” (29,32). Responses to donor antigens via the direct pathway have been reported 12 years after operational tolerance (32), as the presence of alloreactive regulatory T cells operating via the indirect pathway (52). VanBuskirk and al. have also demonstrated immune regulation implicating regulatory cells in some “operationally tolerant” kidney recipients using a “trans-vivo” delayed-type hypersensitivity assay performed with donor antigens (33). Clonal deletion does not seem to be crucial in “spontaneous tolerance”, as observed by Strober (32), as also suggested by the presence of anti-donor reactivity (anti-donor antibodies) in two patients of our cohort. Studies of peripheral blood lymphocytes from recipients with “operational tolerance” conducted in our laboratory have revealed some TCR repertoire alterations, also observed in patients undergoing chronic rejection, but the sorted cells from drug-free “tolerant” patients were characterized by low levels of cytokine transcripts, contrasting with profiles observed in recipients with chronic rejection (34). Moreover, preliminary data on the response of some “operationally tolerant” patients to influenza vaccination suggest that these patients present humoral and cellular responses after influenza vaccination not significantly different from those of healthy volunteers responses (53). Finally, a cDNA microarrays analysis performed on these patients has revealed gene

profiling pattern strongly associated with operational tolerance, suggesting that a tolerance fingerprint may be available in the near future to further explore population of recipients with stable graft function at distance from transplantation.

### *Acknowledgements*

The authors thank Dr J.Ashton-Chess for editing the manuscript.

## **REFERENCES**

1. Rostaing L., Cantarovich D., Mourad G., Budde K., Rigotti P., Mariat C., Margreiter R., Capdevilla L., Lang P., Vialtel P., Ortuno-Mirete J., Charpentier B., Legendre C., Sanchez-Plumed J., Oppenheimer F. and Kessler M. Corticosteroid-Free Immunosuppression with Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil, and Daclizumab Induction in Renal Transplantation. *Transplantation* 2005;79 (7): 807-814
2. Hariharan S., Johnson C. P., Bresnahan B. A., Taranto S. E., McIntosh M. J. and Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000;342 (9): 605-12
3. Souillou J. P. and Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001;72 (12 Suppl): S89-93
4. London N. J., Farmery S. M., Will E. J., Davison A. M. and Lodge J. P. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995;346 (8972): 403-6
5. Dantal J., Hourmant M., Cantarovich D., Giral M., Blancho G., Dreno B. and Souillou J. P. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998;351 (9103): 623-8
6. Halloran P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351 (26): 2715-29
7. Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., O'Connell P. J., Chapman J. R. and Allen R. D. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004;78 (4): 557-65
8. Pascual M., Theruvath T., Kawai T., Tolkoff-Rubin N. and Cosimi A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346 (8): 580-90
9. Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., O'Connell P. J., Allen R. D. and Chapman J. R. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349 (24): 2326-33
10. Slavin S., Strober S., Fuks Z. and Kaplan H. S. Induction of specific tissue transplantation tolerance using fractionated total lymphoid irradiation in adult mice: long-term survival of allogeneic bone marrow and skin grafts. *J Exp Med* 1977;146 (1): 34-48
11. Slavin S., Reitz B., Bieber C. P., Kaplan H. S. and Strober S. Transplantation tolerance in adult rats using total lymphoid irradiation: permanent survival of skin, heart, and marrow allografts. *J Exp Med* 1978;147 (3): 700-7
12. Sharabi Y., Abraham V. S., Sykes M. and Sachs D. H. Mixed allogeneic chimeras prepared by a non-myeloablative regimen: requirement for chimerism to maintain tolerance. *Bone Marrow Transplant* 1992;9 (3): 191-7

13. Seville F., Brouard S., Petzold T., Degauque N., Guillet M., Moreau A., Benjamin C. D. and Souillou J. P. Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation. *Transplantation* 2003;75 (2): 169-72
14. Guillot C., Menoret S., Guillonnet C., Braudeau C., Castro M. G., Lowenstein P. and Anegón I. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 2003;101 (8): 3325-33
15. Devlin J., Doherty D., Thomson L., Wong T., Donaldson P., Portmann B. and Williams R. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998;27 (4): 926-33
16. Takatsuki M., Uemoto S., Inomata Y., Egawa H., Kiuchi T., Fujita S., Hayashi M., Kanematsu T. and Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;72 (3): 449-54
17. Spitzer T. R., Delmonico F., Tolkoff-Rubin N., McAfee S., Sackstein R., Saidman S., Colby C., Sykes M., Sachs D. H. and Cosimi A. B. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999;68 (4): 480-4
18. Buhler L. H., Spitzer T. R., Sykes M., Sachs D. H., Delmonico F. L., Tolkoff-Rubin N., Saidman S. L., Sackstein R., McAfee S., Dey B., Colby C. and Cosimi A. B. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002;74 (10): 1405-9
19. Sayegh M. H., Fine N. A., Smith J. L., Rennke H. G., Milford E. L. and Tilney N. L. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* 1991;114 (11): 954-5
20. Jacobsen N., Taaning E., Ladefoged J., Kristensen J. K. and Pedersen F. K. Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor. *Lancet* 1994;343 (8900): 800
21. Helg C., Chapuis B., Bolle J. F., Morel P., Salomon D., Roux E., Antonioli V., Jeannet M. and Leski M. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994;58 (12): 1420-2
22. Sellers M. T., Deierhoi M. H., Curtis J. J., Gaston R. S., Julian B. A., Lanier D. C., Jr. and Diethelm A. G. Tolerance in renal transplantation after allogeneic bone marrow transplantation-6-year follow-up. *Transplantation* 2001;71 (11): 1681-3
23. Ravanani R., Dudley C. R., Smith R. M., Burton C. J., Lear P. A. and Unsworth D. J. Use of skin grafting to demonstrate tolerance before kidney transplantation without immunosuppression in the recipient of a previous bone marrow transplant. *Transplantation* 2005;79 (3): 375-6
24. 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. Mixed chimerism and

immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 2002;73 (9): 1386-91

25. Owens M. L., Maxwell J. G., Goodnight J. and Wolcott M. W. Discontinuance of immunosuppression in renal transplant patients. *Arch Surg* 1975;110 (12): 1450-1

26. Uehling D. T., Hussey J. L., Weinstein A. B., Wank R. and Bach F. H. Cessation of immunosuppression after renal transplantation. *Surgery* 1976;79 (3): 278-82

27. Zoller K. M., Cho S. I., Cohen J. J. and Harrington J. T. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney Int* 1980;18 (1): 110-4

28. Starzl T. E., Murase N., Demetris A. J., Trucco M., Abu-Elmagd K., Gray E. A., Eghtesad B., Shapiro R., Marcos A. and Fung J. J. Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004;77 (6): 926-9

29. Burlingham W. J., Grailer A. P., Fechner J. H., Jr., Kusaka S., Trucco M., Kocova M., Belzer F. O. and Sollinger H. W. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995;59 (8): 1147-55

30. Christensen L. L., Grunnet N., Rudiger N., Moller B. and Birkeland S. A. Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 1998;51 (6): 637-44

31. Fischer T., Schobel H. and Barenbrock M. Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;70 (2): 217-9

32. Strober S., Benike C., Krishnaswamy S., Engleman E. G. and Grumet F. C. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000;69 (8): 1549-54

33. VanBuskirk A. M., Burlingham W. J., Jankowska-Gan E., Chin T., Kusaka S., Geissler F., Pelletier R. P. and Orosz C. G. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000;106 (1): 145-55

34. Brouard S., Dupont A., Giral M., Louis S., Lair D., Braudeau C., Degauque N., Moizant F., Pallier A., Ruiz C., Guillet M., Laplaud D. and Souillou J. P. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;5 (2): 330-40

35. Alvarez C. M., Opelz G., Giraldo M. C., Pelzl S., Renner F., Weimer R., Schmidt J., Arbelaez M., Garcia L. F. and Susal C. Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* 2005;5 (4 Pt 1): 746-56

36. Calne R. Y. Prope tolerance: the future of organ transplantation--from the laboratory to the clinic. *Transplantation* 2004;77 (6): 930-2

37. Cortesini R. and Suciu-Foca N. The concept of "partial" clinical tolerance. *Transpl Immunol* 2004;13 (2): 101-4

38. Elster E. A., Hale D. A., Mannon R. B., Cendales L. C., Swanson S. J. and Kirk A. D. The road to tolerance: renal transplant tolerance induction in nonhuman primate studies and clinical trials. *Transpl Immunol* 2004;13 (2): 87-99
39. Starzl T. E., Murase N., Abu-Elmagd K., Gray E. A., Shapiro R., Eghtesad B., Corry R. J., Jordan M. L., Fontes P., Gayowski T., Bond G., Scantlebury V. P., Potdar S., Randhawa P., Wu T., Zeevi A., Nalesnik M. A., Woodward J., Marcos A., Trucco M., Demetris A. J. and Fung J. J. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003;361 (9368): 1502-10
40. Butler J. A., Peveler R. C., Roderick P., Horne R. and Mason J. C. Measuring compliance with drug regimens after renal transplantation: comparison of self-report and clinician rating with electronic monitoring. *Transplantation* 2004;77 (5): 786-9
41. Greenstein S. and Siegal B. Compliance and noncompliance in patients with a functioning renal transplant: a multicenter study. *Transplantation* 1998;66 (12): 1718-26
42. Siegal B. R. and Greenstein S. M. Postrenal transplant compliance from the perspective of African-Americans, Hispanic-Americans, and Anglo-Americans. *Adv Ren Replace Ther* 1997;4 (1): 46-54
43. Chisholm M. A., Vollenweider L. J., Mulloy L. L., Jagadeesan M., Wynn J. J., Rogers H. E., Wade W. E. and DiPiro J. T. Renal transplant patient compliance with free immunosuppressive medications. *Transplantation* 2000;70 (8): 1240-4
44. Vlaminc H., Maes B., Evers G., Verbeke G., Lerut E., Van Damme B. and Vanrenterghem Y. Prospective study on late consequences of subclinical non-compliance with immunosuppressive therapy in renal transplant patients. *Am J Transplant* 2004;4 (9): 1509-13
45. Koning O. H., Ploeg R. J., van Bockel J. H., Groenewegen M., van der Woude F. J., Persijn G. G. and Hermans J. Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group. *Transplantation* 1997;63 (11): 1620-8
46. Salama A. D., Delikouras A., Pusey C. D., Cook H. T., Bhangal G., Lechler R. I. and Dorling A. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am J Transplant* 2001;1 (3): 260-9
47. Gagne K., Brouard S., Guillet M., Cuturi M. C. and Soulillou J. P. 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
48. Chiffoleau E., Beriou G., Dutartre P., Usal C., Soulillou J. P. and Cuturi M. C. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002;168 (10): 5058-69

- 
49. Terasaki P. I. and Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4 (3): 438-43
50. Soulillou J. P., Bignon J. D., Peyrat M. A., Guimbretiere J. and Guenel J. Systematic transfusion in hemodialyzed patients awaiting grafts: kinetics of anti-t and b lymphocyte immunization and its incidence on graft function. *Transplantation* 1980;30 (4): 285-9
51. Fehr T. and Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2004;13 (2): 117-30
52. Salama A. D., Najafian N., Clarkson M. R., Harmon W. E. and Sayegh M. H. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (6): 1643-51
53. Roussey-Kesler G., Ballet C., Aubin J. T., Brouard S., Giral M., Miqueu P., Louis S., Van der Werf S. and Soulillou J. P. Humoral and cellular response to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft (*Abstract*). *Basic Science Symposium, La Baule, France* 2005:

| Case      | Initial renal disease                    | Recipient age | Donor age | Pre-graft blood transfusions | Pre-graft PRA | HLA incompatibility number | Cold ischemia (hours) | DGF       | Induction therapy | Acute rejection | Cancer                 | Calcineurin inhibitor exposure (years) | IS withdrawal (time to transplantation) | Reason for IS withdrawal   | Tolerance duration (y) | anti-HLA antibody (since IS withdrawal) |
|-----------|------------------------------------------|---------------|-----------|------------------------------|---------------|----------------------------|-----------------------|-----------|-------------------|-----------------|------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| 1 (1973)  | Membrano-proliferative glomerulopathy    | 42            | 25        | ND                           | No            | 1*                         | 14                    | Yes (d15) | Cyclo-phosphamide | Yes             | None                   |                                        | 12                                      | Non-compliance             | 20                     | None                                    |
| 2 (1981)  | Obstructive uropathy                     | 15            | 7         | 6                            | 7%            | 3*                         | 37                    | No        | No                | Yes             | None                   |                                        | 8                                       | Non-compliance             | 16                     | None                                    |
| 3 (1987)  | Undetermined glomerulopathy              | 41            | 16        | 4                            | No            | 4                          | 36                    | Yes (d8)  | ATG               | No              | None                   | 13                                     | 13                                      | Non-compliance             | 5                      | None                                    |
| 4 (1987)  | Obstructive uropathy                     | 19            | ND        | ND                           | ND            | 4                          | ND                    | ND        | ATG               | Yes             | None                   | 10                                     | 10                                      | Non-compliance             | 8                      | ND                                      |
| 5 (1991)  | Obstructive uropathy                     | 13            | 21        | 2                            | 12%           | 3                          | 29                    | No        | ATG               | Yes             | PTLD                   | 8                                      | 8                                       | PTLD                       | 6                      | None                                    |
| 6 (1993)  | Interstitial nephropathy                 | 64            | 39        | 24                           | 9%            | 3                          | 40                    | Yes (d19) | No                | Yes             | Basocellular carcinoma | 1                                      | 1                                       | Initial renal deagradation | 11                     | anti- donor anti-class II (DR11)        |
| 7 (1994)  | Renal hypoplasia                         | 27            | 30        | 5                            | 15%           | 4                          | 24                    | No        | ATG               | No              | None                   | 10                                     | 10                                      | Non-compliance             | 1                      | anti-donor anti-class II (DR04)         |
| 8 (1998)  | Interstitial nephropathy (drug toxicity) | 27            | 28        | 2                            | No            | 0                          | 3                     | No        | No                | No              | None                   | 1.5                                    | 2                                       | Non-compliance             | 5                      | None                                    |
| 9 (1980)  | Hypocomplementemic glomerulopathy        | 43            | 17        | 2                            | 7%            | 3                          | 18                    | Yes (d3)  | No                | No              | None                   |                                        | 9                                       | Non-compliance             | 14                     | None                                    |
| 10 (1987) | Undetermined glomerulopathy              | 52            | 30        | 4                            | 4%            | 3                          | 38                    | Yes (d2)  | anti-IL2R         | No              | PTLD                   | 7                                      | 7                                       | PTLD                       | 9                      | suspected for class II                  |

**Table 1 : Main characteristics of « operationally tolerant» patients**

| Case             | Creatininemia<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Proteinuria<br>(g/d) | WBC (/mm <sup>3</sup> ) | Lymphocytes<br>(/mm <sup>3</sup> ) | Hb (g/dl)       | $\gamma$ globulin<br>(g/l) | Treatment                                       |
|------------------|----------------------------------------|----------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------------------------------------|
| 1                | 113                                    | 0.22*                | 4100                    | 980                                | 12.3            | 11.5                       | calcic inhibitor,<br>$\beta$ -blocker           |
| 2                | 139                                    | 0.93                 | 8050                    | 3120                               | 14.6            | 10.5                       | None                                            |
| 3                | 89                                     | 0.07                 | 5800                    | 2480                               | 16.3            | 12.2                       | ACE inhibitor                                   |
| 4                | 150                                    | 0.11                 | 6850                    | 2898                               | 14.4            |                            | $\beta$ blocker and central<br>anti-hypertensor |
| 5                | 123                                    | 0.33                 | 7130                    | 2180                               | 16.7            |                            | valaciclovir                                    |
| 6                | 96                                     | 0.50                 | 7150                    | 2480                               | 13.5            |                            |                                                 |
| 7                | 115                                    | 0.15                 | 6880                    |                                    | 11.8            |                            | None                                            |
| 8                | 115                                    | 0.05                 | 6490                    |                                    | 12.5            | 10.2                       | $\beta$ blocker                                 |
| <b>Mean+/-SD</b> | <b>118+/-20</b>                        | <b>0.20+/-0.17</b>   | <b>6556+/-1177</b>      | <b>2356+/-752</b>                  | <b>14+/-1.8</b> | <b>11+/-1</b>              |                                                 |

**Table 2 : Actual biological parameters of « operationally tolerant » patients**

\*: proteinuria in g/l

|                                            |                                               |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Blood Transfusions                         | 8 patients / 8<br>(undetermined for 2)        |
| Pre-graft Immunisation                     | 6 patients / 9<br>(undetermined for 1)        |
| HLA incompatibilities                      | 3 +/- 1.5                                     |
| Induction therapy                          | 6 patients / 10                               |
| Calcineurin inhibitor                      | 7 patients / 10                               |
| Acute rejection episode*                   | 5 patients / 10                               |
| Post-graft immunisation                    | 3 patients / 9<br>(anti-donor class II for 2) |
| IS withdrawal (years from transplantation) | 7.8+/-4.3                                     |
| Withdrawal through non-compliance          | 7 patients / 10                               |
| Tolerance duration (years)                 | 9+/-6.3                                       |

**Table 3 : Immunologic characteristics of « operationally tolerant » patients**

\*: biopsy-proven or clinically suspected

| Case | During immunosuppression                            |                                                      |                        | After IS withdrawal |                                                              |           |                                      | HBV status                                               |
|------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|      | Viral Infections                                    | Bacteriological infections                           | Neoplasia              | Viral Infections    | Bacteriological infections                                   | Neoplasia | EBV reactivation after IS withdrawal |                                                          |
| 1    | Quiescent HCV                                       | Abces                                                | None                   | Quiescent HCV       | Recurrent abces, infectious diarrhea, pneumopathy, sinusitis | None      |                                      | HBV infection spontaneously recovered                    |
| 2    | Quiescent HCV                                       |                                                      | None                   | Quiescent HCV       |                                                              | None      |                                      | Protective anti-HbS Ab (last control: 192 UI/ml)         |
| 3    | Herpetic manifestation                              | Pneumopathy                                          | None                   |                     | Pneumopathy                                                  | None      | negative                             | Protective anti-HbS Ab (last control: 106 UI/ml)         |
| 4    |                                                     |                                                      | None                   |                     | Abces                                                        | None      |                                      |                                                          |
| 5    | EBV primoinfection, herpetic manifestation, zoster, | Urinary and pulmonary infections                     | EBV induced PTLD       |                     | Recurrent ORL infections,                                    | None      | positive (290/105PBMC)               | Protective anti-HbS Ab (last control: 215 UI/ml)         |
| 6    | herpetic manifestation                              | Pulmonary and urinary infections, infectious colitis | Basocellular carcinoma |                     |                                                              | None      |                                      |                                                          |
| 7    | Recurrent verruca                                   | Recurrent sinusitis                                  | None                   |                     |                                                              | None      | negative                             | Protective anti-HbS Ab (last control: 95 UI/ml)          |
| 8    |                                                     | ORL infections                                       | None                   |                     |                                                              | None      | negative                             | HBV infection spontaneously recovered                    |
| 9    |                                                     |                                                      | None                   |                     | Arthritis                                                    | None      | positive (low level)                 | HBV (AgHbS positive)                                     |
| 10   |                                                     |                                                      | PTLD                   |                     |                                                              | None      |                                      | Protective anti-HbS Ab lost 10 years after IS withdrawal |

**Table 4 : Infections and neoplasia during immunosuppressive treatment and after withdrawal**

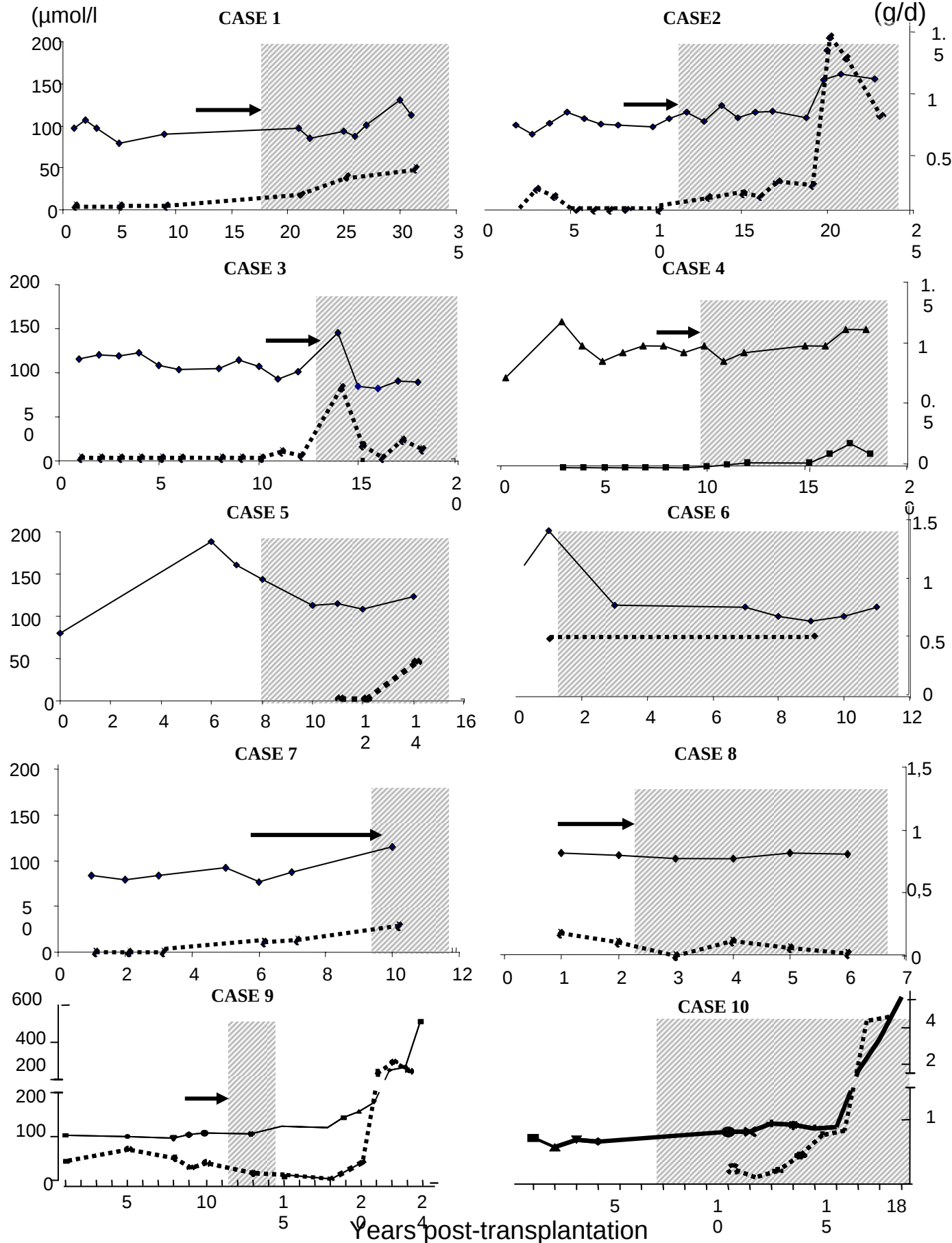
| Patients | Donor                                | HLA incompatibility number                       | Immunosuppressive treatment                                          | Reason for IS withdrawal | Tolerance duration | Histology                                                                             | Mechanisms                                                 | References |
|----------|--------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------|
| 1        | living related                       | ?                                                |                                                                      | Non compliance           | ?                  |                                                                                       |                                                            | (26)       |
| 6        | living related                       | 0                                                |                                                                      | Non compliance           | 3 to 8 years       |                                                                                       |                                                            | (27)       |
| 7        | living related                       | ?                                                | AZA (+CS for acute rejection)                                        |                          | 3 to 38 years      | "normal"                                                                              |                                                            | (28)       |
| 1        | living related                       | 3 (haplo-identical)                              | DST and CsA+AZA+CS                                                   | Non compliance           | 5 years            | focal lymphocyte infiltrate and interstitial fibrosis, arteriolar intimal hyperplasia | Microchimerism, regulation, anergy                         | (29)       |
| 1        | living related                       | 3 (haplo-identical)                              |                                                                      | PTLD                     | more than 3 years  |                                                                                       | anti-donor hyporesponsivness (anergy? Clonal deletion?)    | (30)       |
| 1        | cadaveric                            | 6                                                | Total lymphoid irradiation and ATG+ CS                               | Protocol                 | 12 years           |                                                                                       | no microchimerism, anti-donor reactivity restored in vitro | (32)       |
| 2        | living related (1) and cadaveric (1) | 0 for one patient, 2 for the other patient       | Induction therapy (OKT3) for one patient, no induction for the other | Non compliance           | 5 and 27 years     |                                                                                       | regulation                                                 | (33)       |
| 1        |                                      | 1 HLA class I mismatch (class II not determined) | AZA+CS                                                               | Non compliance           | 9 years            |                                                                                       |                                                            | (31)       |

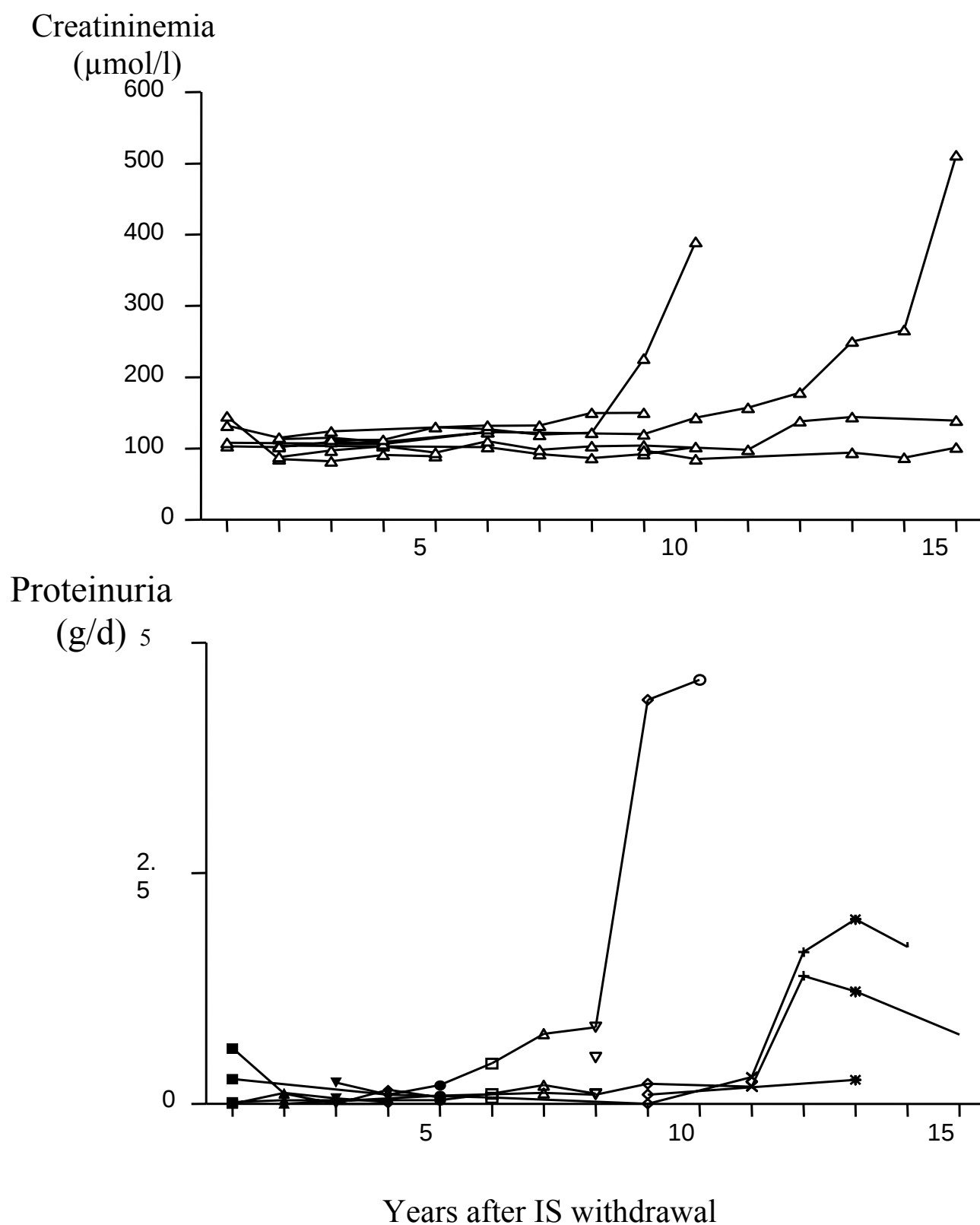
**Table 5 : Reported cases of « operationally tolerant » patients**

Creatininemia  
( $\mu\text{mol/l}$ )

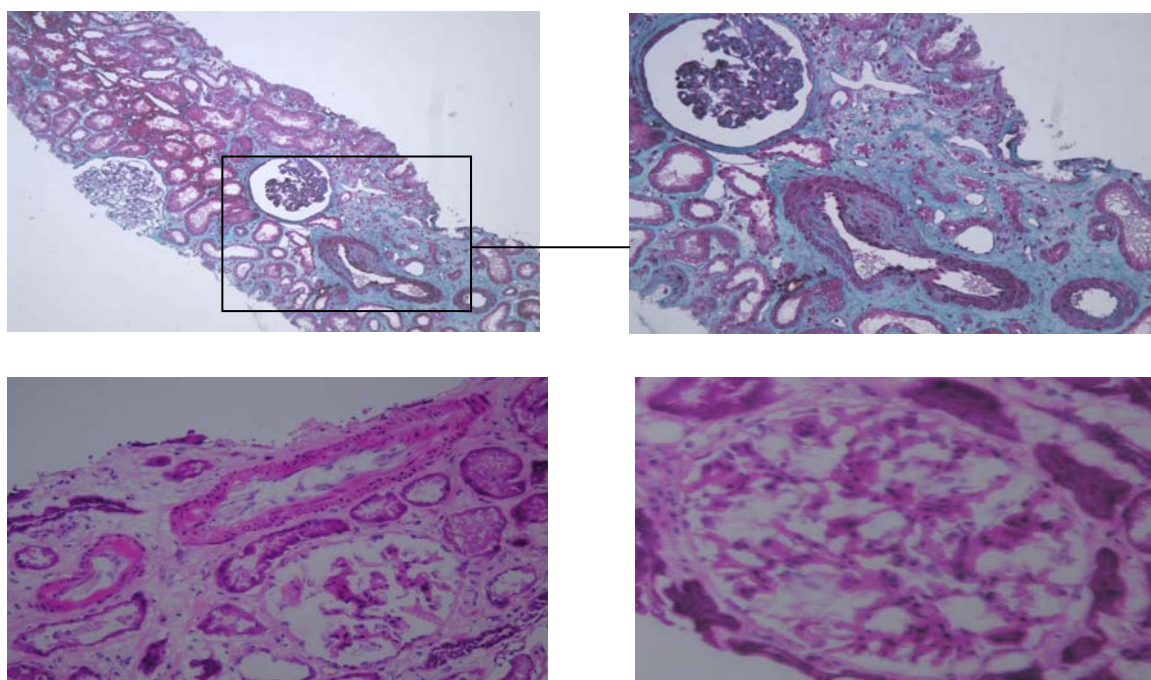
FIGURE 1

Proteinuria  
(g/d)



**Figure 2**

**Figure 3**



## FIGURE LEGENDS

### Figure 1 : Creatininemia and proteinuria evolution since transplantation.

Each graph indicates post-transplantation evolution of creatininemia ( $\mu\text{mol/l}$ ) and proteinuria (g/d) for each patient. The horizontal arrows corresponds to the period of progressive immunosuppressive medication withdrawal. The grey part indicates the period off immunosuppression. Creatininemia and proteinuria remain stable over time, except for cases 9 and 10 whose renal function degraded 14 and 9 years respectively after immunosuppression cessation.

### Figure 2 : Creatininemia and proteinuria evolution since immunosuppression withdrawal

Variations in creatininemia are represented in the upper graph, showing stability over time (except for two patients, 9 and 10). Daily proteinuria is represented in the lower graph, and seems to increase prior to increases in creatininemia. For one patient, only one daily proteinuria dosage is available.

### Figure 3 : Graft biopsy performed following degradation of renal function in cases 9 and 10.

The upper part corresponds to the graft biopsy for patient 9. It only revealed a focal interstitial fibrosis, tubular atrophy and a moderate cellular infiltrate. No intimal thickness was detected. There was no cellular infiltration of the glomerulus and no thickening of the glomerular basement membrane with a double contour. Lesions suggested nephroangiosclerosis rather than chronic allograft rejection. No acute component was present in this biopsy.

The lower part corresponds to graft biopsy of patient 10. It showed focal fibro-oedema with moderate mononuclear infiltration. Glomerular lesions with a double contour of the basement membrane evoked allograft glomerulopathy, which was reinforced by the finding of IgM and C1q deposits (not shown). There was no tubulitis or acute rejection lesion but arteriolar hyalinosis was detected.

## **Humoral and cellular response to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft.**

*Gwenaëlle Roussey-Kesler<sup>1\*</sup>, Caroline Ballet<sup>1\*</sup>, Jean-Thierry Aubin<sup>2</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup>, Magali Giral<sup>1</sup>, Patrick Miqueu<sup>1</sup>, Stéphanie Louis<sup>1</sup>, Sylvie Van der Werf<sup>2</sup> and Jean-Paul Soulillou<sup>1</sup>*

\* Both authors equally participate to this work

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

<sup>2</sup> Centre National de Référence du Virus Influenza, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS

Keywords: Operational tolerance, kidney transplantation, influenza vaccination

Word count : 3610

Word count Abstract : 375

Address correspondence to Pr. Jean-Paul Soulillou, I.N.S.E.R.M U643, CHU-HOTEL DIEU, 30 Bd Jean Monnet, 44035 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](mailto:Jean-Paul.Soulillou@univ-nantes.fr)

**ABBREVIATIONS**

FCS: Fetal Calf Serum

HA: Hemagglutinine

HI: Hemagglutination Inhibition

HV: Healthy volunteers

IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$

IL: Interleukin

IS: ImmunoSuppressed kidney recipients

M0 : Before influenza vaccination

M1: One month after influenza vaccination

M3: Three months after influenza vaccination

NA: Neuraminidase

ND: Not determined

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PTLD : Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder

TOL: Operationally tolerant patients

## ABSTRACT

**Introduction:** Rare kidney recipients enjoy unaltered graft function years after interruption of their immunosuppressive treatment and are considered as “operationally tolerant”. To assess to which extend this state of “operational tolerance” is specific to the graft and is not the result of a global immunodeficiency, their immune response following influenza vaccination was studied and compared to that of kidney recipients under conventional maintenance immunosuppression and of healthy volunteers.

**Patients and Methods:** Four “operationally tolerant” recipients (TOL), 9 immunosuppressed-recipients (IS) and 15 healthy volunteers (HV) received a trivalent influenza vaccine during the 2004-2005 season. The three groups were matched for age (mean age : 49.5, 52.4, 44.3 years for TOL, IS and HV respectively). Mean creatininemia were 104  $\mu\text{mol/l}$  for TOL and 105  $\mu\text{mol/l}$  for IS. Response to vaccination was assessed before and 1 and 3 months after vaccination. The humoral response was measured by hemagglutination inhibition (HI) titres. A positive response was defined as a 4-fold increase in HI titres or as a protective titre ( $>1/40$ ) in a pre-vaccination seronegative subject. Cellular response was assessed by the frequency of specific IFN $\gamma$ -secreting T cells (ELISPOT) and cytokine production after an *in vitro* stimulation with the vaccine. Blood lymphocyte phenotypes were also serially determined.

**Results:** According to the viral strain, positive humoral response was observed in 25 to 75% of TOL, in 0 to 40% of IS and in 33 to 89% of HV. IS recipients presented a significantly lower humoral response as compared to HV for the A/NewCaledonia strain ( $p<0.05$ ). Humoral response for TOL patients was not statistically different from HV. Mean IFN $\gamma$ -secreting cells frequency before vaccination was  $359\pm224$ ,  $272\pm98$  and  $260\pm111/10^6$  cells in TOL, IS and HV patients respectively. One month after vaccination, this frequency respectively increased to  $650\pm465$ ,  $404\pm219$  and  $436\pm195/10^6$  cells. This increase, which was roughly similar in each group, only reached significant levels for HV at one month. Interestingly, blood lymphocyte phenotypic analysis revealed an increase of “central memory” CD45RO+CD62L+ CD4+ and CD8+ cells after influenza vaccination in all groups. No major differences were observed in cytokine production.

**Conclusion:** TOL recipients present a humoral and cellular response to influenza vaccination not different to HV, suggesting that the tolerance state of this small cohort of patients is not related to a global immunodeficiency.

## INTRODUCTION

Organ transplantations represent the reference treatment for organ terminal deficiencies. Nevertheless, prevention of rejection implies non-specific immunosuppression which increases the risk of infectious and tumoral diseases (1-3). Moreover, the immunosuppressive treatment only poorly influences chronic rejection which is actually the main cause of graft loss (4,5). Thus a major goal in transplantation would be to achieve a specific tolerance to the graft in an immunocompetent host, without immunosuppressive drugs (6).

Kidney graft recipients which display a correct and stable renal function years after immunosuppressive treatment disruption have been described (7-12) but most of patients who discontinued immunosuppressive drugs reject their grafts within the weeks following treatment withdrawal. Recently, we have reported a small cohort of "operationally tolerant" kidney recipients in whom blood-T cell exhibit low accumulation of inflammatory cytokines contrasting to patients undergoing chronic rejection (13). Moreover, phenotypic blood-T lymphocytes analysis from "operationally tolerant" patients have revealed a pattern close to that observed in normal subjects, whereas transplant recipients with chronic rejection have less CD4+CD25<sup>hi</sup> (phenotypic markers associated with regulatory cells) (Louis *et al*, submitted) and more CD8+CD28- T cells with cytotoxic properties (Baeten *et al*, submitted). cDNA micro-arrays analysis of blood mononuclear cells revealed a pattern of 49 genes differentially expressed in "operational tolerant" patients and in recipients undergoing chronic rejection, which was associated with tolerance (Brouard *et al*, submitted).

Despite detailed clinical analysis of these "operational tolerant" patients do not suggest that they are at increased risk of opportunistic infections and so are non-specifically immunosuppressed, to which extend these patients are able to respond to antigens different from those of their graft is not known. The subject of this prospective study was to determine if the "operationally tolerant" patients present a normal immune response to influenza vaccination, or if they are immunodeficient despite the absence of immunosuppressive treatment. To assess this point, their response to influenza vaccination was compared to that of immunosuppressed kidney recipients or of healthy volunteers. Previous studies conducted in allograft recipients have revealed that transplanted patients have a poor humoral response to influenza vaccination as compared to healthy volunteers (14-16). We show here that the cellular and humoral responses to influenza vaccination of the "operationally tolerant" recipients were not statistically different from that observed in healthy volunteers, whereas conventionally immunosuppressed kidney recipients presented a poor humoral response.

## PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

### ***Patients***

Five “operationally tolerant” patients (TOL), 8 immunosuppressed kidney recipients (IS) and 10 healthy volunteers (HV) were recruited for the study during 2003-2004 season. The following year, 4 TOL patients, 9 IS recipients and 15 healthy volunteers were enrolled, most of them participated in both parts of the study. The University Hospital Ethical Committee and the local Committee for the Protection of Patients for Biomedical research approved this study. All patients signed a written informed consent before inclusion.

“Operationally tolerant” kidney recipients were defined as patients displaying a stable renal function, with creatininemia and proteinuria below 150µmol/l and 1 g/24h respectively, while immunosuppressive treatments were stopped for more than two years. No “operationally tolerant” patient had presented notable infections during the previous year of the study, and they did not receive any treatment known to interfere with the immune competences. Two patients had presented a malignancy (Post-Transplantation Lymphoproliferative Disorder for one patient and a basocellular carcinoma for the other) and are now considered as cured. Main clinical characteristics of these “operationally tolerant” patients are indicated in table 1. Aged-matched kidney transplant recipients treated with conventional immunosuppressive drugs were used as controls. All received an association of a calcineurin inhibitor (Ciclosporine or Tacrolimus) and mycophenolate mofetil. None of them were treated with azathioprine or corticosteroids. All were transplanted for more than one year (cf: table 2). Another control group consisted in aged-matched healthy volunteers. Mean age and creatininemia of the subjects of the different groups (2004/2005 study) did not significantly differed and are indicated in table 3.

A single dose of influenza vaccine was administered to each participant during autumn, before the beginning of the influenza season. Blood samples were obtained before (M0), and 1 (M1) and 3 months (M3) after immunisation. Previous influenza vaccinations are reported in table 2.

### ***Influenza Vaccine***

A commercially available subunit virion influenza vaccine (*Influvac®*, Solvay Pharma, Neederlands) was used for immunization. This trivalent vaccine contained purified hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) of the influenza strains recommended by World Health Organisation and European Union. The vaccine was composed of A/Moscow/10/99

(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A/NewCaledonia/20/99 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) and B/Hong Kong/330/01 strains for the 2003/2004 season, and A/Fujian/411/2002 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A/New Caledonia/20/99 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) and B/Shanghai/361/2002 for the 2004/2005 season. The concentration of hemagglutinin of each component was 15 µg per single dose (0.5ml).

### ***Antibody titres***

Antibody titres directed against hemagglutinin of each viral strain were determined by standard hemagglutination inhibition (HI) assay. Absolute titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum, which completely inhibited hemagglutination. Titres of 1/40 or more were considered as protective. An humoral positive response was defined as a protective titre in a subject seronegative before vaccination or as a 4-fold increase in HI titres in a seropositive subject before vaccination (17). Specific antibodies increase was also expressed as the reciprocal of the highest dilution showing HI, divided by 5 and transformed to binary logarithms. Thus, a HI titre of 1/10 corresponds to 1, 1/20 to 2, 1/40 to 3 and so on.

### ***Measurement of specific IFN $\gamma$ secreting T cells frequency***

Specific responder cells frequency was determined with an IFN $\gamma$  Elispot Assay. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from EDTA-venous whole blood by standard ficoll isolation and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Sigma, L'Isle D'abeau Chesne, France), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 2mM L-Glutamine (Sigma), 100 U/ml penicillin (Sigma), 100µg/ml streptomycin (Sigma) and 0.1 mM non essential aminoacids (Sigma), at a final concentration of  $2 \cdot 10^6$  PBMC/ml. They were then seeded in duplicate or triplicate in 96 wells Multitestplates coated with anti-IFN $\gamma$  primary antibody (ELISPOT Assay Kit, AID, Strasberg) at a concentration of  $2 \cdot 10^5$  cells per well (100µl). They were stimulated with flu vaccine (0.45 µg HA/ml). PHA added at 30 µg/ml and a virus peptides pool added at a concentration of 10µg/ml (provided by Jean-Gérard Guillet, Institut Pasteur, Paris) were used as positive controls. Negative controls were PBMC cultured alone. Plates were then incubated 24h at 37°C in the presence of 5 % CO<sub>2</sub>. After washing the plates, detecting biotinylated anti-IFN $\gamma$  antibody was added for 2.5 h at room temperature followed by the addition of streptavidin-horse radish peroxidase for 2h. The spots were developed using aminoethyl carbazolat in acetate buffer with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Counting of spot-forming cells was performed with the AID-Elispot reader system. Frequency of IFN $\gamma$

secreting cells was calculated by dividing the number of spots by the number of stimulated PBMC and converted per million of cells.

Positive response has been assessed with a visual appreciation of three independent examiners in a blind mode lecture.

### ***Cytokine measurement***

$10^7$  frozen PBMC were defrozen for *in vitro* stimulation. They were resuspended in the medium (final concentration of  $2.10^6$  PBMC/ml).  $2.10^5$  cells per well were incubated for 48H with or without flu vaccine (0.45 µg HA/ml). Supernatants were harvested and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Secondly they were tested for the presence of ten Th1/Th2 cytokines (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, TNF $\alpha$ , IL12) with the human Th1/Th2 10plex Kit (Bender Medsystems, Vienna). 25µl of each supernatant, of each dilution of ten standards and blank were seeded in a 96 wells V-bottom plates with a mixture of beads coated by antibodies specifically reacting with each of the cytokine to be detected. The beads can be differentiated by the size and by their distinct spectral addresses detectable in FL3 channel. A biotin conjugated second antibody mixture is added and binds to the cytokine captured by the first antibody. Finally Streptavidin-Phycerythrin (detected in FL2 channel) is added and binds to the biotin-conjugated and emits fluorescent signals. Analysis were done using flow cytometer (FACScalibur, Becton Dickinson, San Diego, USA). Standard curves for each cytokine were calculated with the BMS Flow Cytomix Software (Bender Medsystems, Vienna). The fluorescence intensity values of each supernatant for the ten cytokines (Fluorescence of streptavidin-PE) were compared to the standard curves and allowed to determine the concentration of each cytokine in the samples.

### ***T-cells subsets phenotype***

Just after Ficoll isolation and also after a 6-hours *in vitro* stimulation with flu-vaccine (0.45µg HA/ml), PBMC were incubated for 15 min with the following fluorochrome-labelled mAb for phenotypic characterisation : anti-CD3-PC7, anti-CD8-APC, anti-CD4-APC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45RO-FITC, anti-CD25-FITC or anti-CD25-PE, anti-CD62L-PE, anti-CD28-PE, anti-CD69-PE and anti-DR-PE. All mAb were purchased from BD (Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). The labelled PBMC were washed, fixed in PBS/formaldehyde 1%, and analysed by 4-color 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+ and CD4+

or CD8+ cells. Non-specific staining and autofluorescence were determined by isotype matched control mAb. Results are expressed as mean percentage of positive cells or as absolute numbers (percentage of cells expressing the markers reported to the total number of CD4+ or CD8+ lymphocytes).

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed with the GraphPad Software. Before and after vaccination values were analysed with a paired non-parametric Wilcoxon test. Comparisons between each group were realized with a non-parametric Mann Withney test. Percentages of responders and non-responders in each group were compared with a Fischer test.  $p < 0.05$  was considered as significant.

## **RESULTS**

***Humoral response of “operationally tolerant” patients to influenza vaccination was not significantly different that of healthy volunteers, whereas conventionally immunosuppressed kidney recipients presented a depressed response.***

A positive humoral response was observed in 75%, 25% and 50% of the “operationally tolerant” patients, 40%, 20% and 0% of the immunosuppressed kidney recipients and 89%, 89%, and 33% of the healthy volunteers for the A/Moscow/10/99, A/NewCaledonia/20/99 and B/Hong Kong/330/01 strains respectively. The difference was significant between IS and HV subjects for the A/NewCaledonia/20/99 strain (figure 1). Mean geometric titres increase one month after vaccination (M1/M0 titre ratios) were 2.21, 1.60 and 2 for TOL patients, 1.1, 1.3 and 1.1 for IS recipients and 3.18, 4 and 2 for HV for the A/Moscow/10/99 strain, A/NewCaledonia/20/99 and B/Hong Kong/330/01 strains respectively. There was no significant difference between TOL patients and HV, whereas titres increased significantly more in HV than in IS recipients for all strain tested (figure 2). Similarly, mean geometric titres increase at 3 months after vaccination (M3/M0) was significantly different between IS recipients and HV for A/NewCaledonia/20/99 (data not shown).

Concerning percentage of subjects with protective titres after vaccination, there was no significant difference between TOL patients, IS recipients and HV. 75%, 50% and 75% of TOL patients, 80%, 60%, 40% of IS recipients and 100%, 89% and 33% of HV were protected after vaccination for the A/Moscow/10/99, A/NewCaledonia/20/99 and B/Hong Kong/330/01 strains respectively. Nevertheless, according to the strain, 40 to 60% of IS

subjects presented protective titres before vaccination whereas only 0 to 22% of the HV had such protective titres before vaccination (data not shown).

### ***Frequency of specific IFN $\gamma$ secreting T cells after influenza vaccination.***

The mean frequencies of IFN $\gamma$  secreting T cells after a 24-hours *in-vitro* stimulation with HA were 359 $\pm$ 224, 272 $\pm$ 98 and 260 $\pm$ 111 /10<sup>6</sup> PBMC in TOL patients, IS recipients and HV respectively before vaccination. One month after vaccination, these frequencies increased in each group : 650 $\pm$ 401, 404 $\pm$ 219 and 436 $\pm$ 195 in TOL patients, IS recipients and HV respectively. This increase in the frequency of IFN $\gamma$  secreting T cells at one month was significant only in HV patients. However the difference between groups did not reach significance (figure 3). One and three months results were roughly similar.

Positive visual appreciation response was noted in 50% of TOL patients, 77% of IS recipients and 86% of HV, which was not significantly different between the three groups (data not shown).

### ***Cytokine measurement after in vitro stimulation***

After a 48-hours *in vitro* stimulation with HA, IL2 production of PBMC from samples obtained one month following vaccination decreased as compared to pre-vaccination samples. IL2 concentrations in supernatant respectively before vs. one month after vaccination were 192 $\pm$ 111 vs. 126 $\pm$ 46 pg/ml for TOL patients, 293 $\pm$ 106 vs. 127 $\pm$ 62 pg/ml for IS recipients, 420 $\pm$ 156 vs. 183 $\pm$ 72 pg/ml for HV. This decrease was significant only for HV (data not shown). IL8 production significantly decreased at one month for IS subjects (2726 $\pm$ 1149 pg/ml before vs. 744 $\pm$ 99 pg/ml one month after vaccination,  $p < 0.05$ ). Moreover, changes in IL8 production following vaccination (IL8 concentration in the supernatant at one month M1/ before vaccination M0) were significantly different in “operationally tolerant” patients from IS patients and HV (figure 4). No variations in IL6, IL10, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  production were observed before and after vaccination in the three groups. IL4 and IL5 remained undetectable.

### ***Blood “central memory” CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes increased after vaccination.***

An increase in CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, referred as “central memory” lymphocytes (18), was observed 1 and 3 months after vaccination, in all groups, significantly for IS recipients

and HV. CD4+CD45RO+CD62L+ numbers were 315+/-136, 378+/-158 and 501+/-171/mm<sup>3</sup> for TOL patients, 137+/-64, 271+/-139 and 304+/-129/mm<sup>3</sup> for IS recipients, and 305+/-142, 394+/-164 and 446+/-182/mm<sup>3</sup> for HV respectively before and one and three months after influenza vaccination. Of note, IS recipients presented fewer CD4+CD45RO+CD62L+ cells than TOL patients and HV before but no more after vaccination (figure 5). This increase in “central memory” lymphocytes was also significantly present in CD8+ subsets for HV. IS patients also presented lower numbers of “central memory” CD8+ lymphocyte than the others groups (data not shown). There were no significant changes in “effector memory” lymphocyte number (CD45RO+ CD62L-) in all groups.

CD4+CD25+, CD4+CD25<sup>hi</sup> or CD8+CD28- lymphocytes numbers were not significantly different between the three groups (data not show). Nevertheless, CD4+CD25+ was significantly increased in IS recipients and HV 3 months after vaccination as compared as before (129+/-135 vs. 214+/-192 for IS and 164+/-118 vs. 282+/-135 for HV before and three months after vaccination respectively). This increase in CD4+CD25+ was not associated with a concomitant increase in CD4+CD69+ activated T cell population in this two groups.

***CD45RO+ cells decreased after in vitro stimulation whereas CD45RA+cells and CD69+ cells increased.***

Phenotypic studies were also conducted on lymphocytes 6 hours after an *in vitro* stimulation with HA. In each group, a decrease in the percentage of CD4+CD45RO+ cells was observed after stimulation, significantly for IS recipients and HV (figure 6). This decrease was associated with the increase in the percentage of CD4+CD45RA+ cells. CD69 expression increased after in vitro stimulation, in all groups and in all samples, even before the vaccination. This increase was significant for HV, but not for IS and TOL (data not shown). CD25 and CD28 expression in CD4+ lymphocytes were not significantly modified.

## **DISCUSSION**

Influenza vaccination is recommended for patients with chronic diseases, and in particular for transplanted patients. Influenza strains in circulation varied each winter, so influenza vaccine has to be modified every year. It had thus to be repeated yearly. Moreover, response to influenza vaccination has been extensively studied, in healthy (19-27) and in transplanted subjects (14-16,28-36). Response of “operationally tolerant” patients to influenza vaccination has been chosen to study if their response is similar to that of immunosuppressed patients or that of healthy volunteers, as an indirect assessment of their global immunocompetences and

their ability of recognition of non-graft determinants. Despite based on a small cohort of these very rare “operationally tolerant” patients, the data favor the idea of a normal capacity of mounting an immune response again the vaccine. This observation is also in agreement with the fact that “operationally” tolerant patients did not present an unusual increase incidence of infectious diseases after immunosuppression withdrawal.

The response to influenza vaccination is mostly analysed with specific antibody production, titre over 1/40 been related to a protective status (17). Because humoral response to influenza vaccination varies following many conditions, and particularly with age (25,27,37,38), our control subjects were matched for age. Previous studies conducted in transplanted patients showed that they had an impaired humoral response to influenza vaccination (14-16,29,31,34). Immunosuppressive drugs influenced the efficacy of vaccination (Ciclosporine (39), mycophenolate mofetil (40) and to a lesser extend azathioprine (40)). To limit these factors of variations, IS recipients all received the same immunosuppressive drugs association (calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil)(cf : table 2). In addition the two groups of kidney recipients have a similar level of renal function (cf : table 3).

We show here that “operationally tolerant” patients presented an humoral response not significantly different from that of healthy volunteers. In contrast, immunosuppressed patients presented a poorer humoral response. Increase in HI titres in immunosuppressed patients was significantly weaker for each vaccination strain than in healthy volunteers. Of note, if we would have considered the percentage of subjects with protective titres after vaccination, no differences would have been observed. However this is related to a higher percentage of patients displaying protective titres before vaccination in patients with conventional immunosuppression than in healthy volunteers. This is likely due to recurrent influenza vaccinations in immunosuppressed patients, whereas most of the healthy volunteers did not receive previous influenza vaccination (cf : table 3).

Cellular response to influenza vaccination has been less studied than humoral response. Proliferative response (22,24,25) or cytokine production of PBMC (21-23,25,36) after an *in vitro* stimulation (with the vaccine or purified proteins) and the frequency of specific T cells with tetramers by flow cytometry analysis (26,41) have been reported. However, to our knowledge, only three studies reported cellular response to influenza vaccination in transplanted patients (28,36,42). One of them analysed proliferative response in renal recipients and did not detect significant increase in proliferation, in immunosuppressed patients as well as in healthy volunteers (28). Another study conducted in lung transplant recipients considered cytokine production after *in vitro* stimulation (36). No response was

observed in immunosuppressed patients whereas significant variations were noted in healthy volunteers. These observations showed that transplanted patients present low level of cellular response to influenza vaccination. In contrast, in this study, immunosuppressed recipients had a cellular response which was not significantly different from the response of the healthy volunteers. However only healthy volunteers mounted a significant difference in IFN $\gamma$  producing cells following vaccination. This suggests that immunosuppressed patients may present a dissociated response to vaccination, with a relatively conserved cellular response but an impaired humoral response. The dissociation between cellular and humoral response after influenza vaccination has already been observed in elderly subjects (43,44). In this study it may rather be related to the effect of mycophenolate mofetil which particularly affects humoral response (40,45,46). Interestingly, response of “operationally tolerant” patients was closer of the response observed in the healthy individuals than in patients under immunosuppression. Analysis of cytokine production only revealed differences for IL2 and IL8. Th2 cytokines were not detectable. A paradoxical decrease of IL2 after vaccination was observed in all groups (significantly for HV), without difference between the groups. This may be related to the fact that IL2 was measured in the supernatant 48 hours after *in vitro* stimulation, which may be too long to consider this cytokine. However data from cytokine measurement following *in vitro* stimulation must be interpreted consciously of the relative low frequency of responding cells. In any case, “operationally tolerant” patients presented a profile closer to healthy volunteers than to immunosuppressed recipients.

Interestingly, “central memory” CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (determined as CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> cells (18)) increase after influenza vaccination is a surprising finding suggesting that a vaccination could mobilize more cells than assessed by Elispot assay. We could not however directly assess whether most of these CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were directed against influenza strains contained in the vaccine. Increase of “central memory” cells and decrease of “effector memory” and “naïves” CD4<sup>+</sup> T cells have been also found in elderly as compared as in young healthy volunteers (44). This decrease of “effector memory” cell was correlated with a weaker cellular response to influenza vaccination at 3 months (44). In our study, the increase in “central memory” CD4<sup>+</sup> cells was not associated with significant changes in others CD4<sup>+</sup> subsets (“effector memory” or “naïve” CD4<sup>+</sup> T cells) except for patients under immunosuppression.

After a short *in vitro* stimulation with the vaccine, changes in lymphocyte phenotype were observed with a decrease in the percentage in cells expressing CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> and an increase in the expression of CD45RA<sup>+</sup> in all groups of patients. CD69, an early activation

marker, also increased after *in vitro* stimulation, in most of the patients tested. This seem to be related to an activation of the T lymphocytes after the *in vitro* stimulation, but do not allow to discriminate the effect of influenza vaccination, because these changes are observed before and after vaccination, without significant changes over time.

CD4+CD25<sup>hi</sup> (47-49) and CD8+CD28- T cells (50,51) were reported as cells with potential suppressive activities. An increase in such cells has been observed in stable organ recipients (cardiac, renal or liver recipients) and in “operationally tolerant” patients (52,53)(Louis *et al*, submitted). No significant difference was observed in “operationally tolerant” patients compared to HV or immunosuppressed recipients. However previous studies observed different CD4+CD25<sup>hi</sup> or CD8+CD28- levels between “operationally tolerant” patients and recipients undergoing chronic rejection, but not with stable graft function recipients (Louis *et al*, submitted)(Baeten *et al*, submitted).

Taken together, this study showed that immunosuppressed patients had a poor humoral response, significantly weaker than healthy volunteers, with a more conserved cellular response. Interestingly our data also shown that “operationally tolerant” patients presented an humoral and cellular response to influenza vaccination which did not significantly differ from the healthy volunteers response. This suggests a true state of tolerance in these patients, most of them accepting a mismatched cadaveric graft years after definitive immunosuppressive medication withdrawal rather than a global immunodeficiency.

## **REFERENCES**

1. London N. J., Farmery S. M., Will E. J., Davison A. M. and Lodge J. P. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995;346 (8972): 403-6
2. Souillou J. P. and Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001;72 (12 Suppl): S89-93
3. Dantal J. and Souillou J. P. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005;352 (13): 1371-3
4. Pascual M., Theruvath T., Kawai T., Tolkoff-Rubin N. and Cosimi A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346 (8): 580-90
5. Joosten S. A., van Kooten C. and Paul L. C. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003;16 (3): 137-45
6. Sayegh M. H., Perico N. and Remuzzi G. Transplantation tolerance. A complex scenario awaiting clinical applicability. *Contrib Nephrol* 2005;146: 95-104
7. Burlingham W. J., Grailer A. P., Fechner J. H., Jr., Kusaka S., Trucco M., Kocova M., Belzer F. O. and Sollinger H. W. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995;59 (8): 1147-55
8. Fischer T., Schobel H. and Barenbrock M. Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;70 (2): 217-9
9. Christensen L. L., Grunnet N., Rudiger N., Moller B. and Birkeland S. A. Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 1998;51 (6): 637-44
10. Strober S., Benike C., Krishnaswamy S., Engleman E. G. and Grumet F. C. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000;69 (8): 1549-54
11. Starzl T. E., Murase N., Demetris A. J., Trucco M., Abu-Elmagd K., Gray E. A., Eghtesad B., Shapiro R., Marcos A. and Fung J. J. Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004;77 (6): 926-9
12. VanBuskirk A. M., Burlingham W. J., Jankowska-Gan E., Chin T., Kusaka S., Geissler F., Pelletier R. P. and Orosz C. G. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000;106 (1): 145-55
13. Brouard S., Dupont A., Giral M., Louis S., Lair D., Braudeau C., Degauque N., Moizant F., Pallier A., Ruiz C., Guillet M., Laplaud D. and Souillou J. P. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;5 (2): 330-40

14. Sanchez-Fructuoso A. I., Prats D., Naranjo P., Fernandez-Perez C., Gonzalez M. J., Mariano A., Gonzalez J., Figueredo M. A., Martin J. M., Paniagua V., Fereres J., Gomez de la Concha E. and Barrientos A. Influenza virus immunization effectivity in kidney transplant patients subjected to two different triple-drug therapy immunosuppression protocols: mycophenolate versus azathioprine. *Transplantation* 2000;69 (3): 436-9
15. Cavdar C., Sayan M., Sifil A., Artuk C., Yilmaz N., Bahar H. and Camsari T. The comparison of antibody response to influenza vaccination in continuous ambulatory peritoneal dialysis, hemodialysis and renal transplantation patients. *Scand J Urol Nephrol* 2003;37 (1): 71-6
16. Mazzone P. J., Mossad S. B., Mawhorter S. D., Mehta A. C., Schilz R. J. and Maurer J. R. The humoral immune response to influenza vaccination in lung transplant patients. *Eur Respir J* 2001;18 (6): 971-6
17. Beyer W. E., Palache A. M., Luchters G., Nauta J. and Osterhaus A. D. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? *Virus Res* 2004;103 (1-2): 125-32
18. Sallusto F., Lenig D., Forster R., Lipp M. and Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401 (6754): 708-12
19. Zuckerman M. A., Wood J., Chakraverty P., Taylor J., Heath A. B. and Oxford J. S. Serological responses in volunteers to inactivated trivalent subunit influenza vaccine: antibody reactivity with epidemic influenza A and B strains and evidence of a rapid immune response. *J Med Virol* 1991;33 (2): 133-7
20. Brokstad K. A., Cox R. J., Major D., Wood J. M. and Haaheim L. R. Cross-reaction but no avidity change of the serum antibody response after influenza vaccination. *Vaccine* 1995;13 (16): 1522-8
21. McElhaney J. E., Pinkoski M. J., Au D., Lechelt K. E., Bleackley R. C. and Meneilly G. S. Helper and cytotoxic T lymphocyte responses to influenza vaccination in healthy compared to diabetic elderly. *Vaccine* 1996;14 (6): 539-44
22. Powers D. C., McElhaney J. E., Florendo O. A., Jr., Manning M. C., Upshaw C. M., Bentley D. W. and Wilkinson B. E. Humoral and cellular immune responses following vaccination with purified recombinant hemagglutinin from influenza A (H3N2) virus. *J Infect Dis* 1997;175 (2): 342-51
23. McElhaney J. E., Upshaw C. M., Hooton J. W., Lechelt K. E. and Meneilly G. S. Responses to influenza vaccination in different T-cell subsets: a comparison of healthy young and older adults. *Vaccine* 1998;16 (18): 1742-7
24. Saurwein-Teissl M., Steger M. M., Gluck R., Cryz S. and Grubeck-Loebenstien B. Influenza vaccination in a healthy geriatric population: preferential induction of antibodies specific for the H3N2 influenza strain despite equal T cell responsiveness to all vaccine strains. *Vaccine* 1998;16 (2-3): 196-200

25. Murasko D. M., Bernstein E. D., Gardner E. M., Gross P., Munk G., Dran S. and Abrutyn E. Role of humoral and cell-mediated immunity in protection from influenza disease after immunization of healthy elderly. *Exp Gerontol* 2002;37 (2-3): 427-39
26. Danke N. A. and Kwok W. W. HLA class II-restricted CD4+ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol* 2003;171 (6): 3163-9
27. Saurwein-Teissl M., Lung T. L., Marx F., Gschosser C., Asch E., Blasko I., Parson W., Bock G., Schonitzer D., Trannoy E. and Grubeck-Loebenst  n B. Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunol* 2002;168 (11): 5893-9
28. Briggs W. A., Rozek R. J., Migdal S. D., Shillis J. L., Brackett R. G., Brandon F. B., Mahajan S. K. and McDonald F. D. Influenza vaccination in kidney transplant recipients: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 1980;92 (4): 471-7
29. Blumberg E. A., Albano C., Pruett T., Isaacs R., Fitzpatrick J., Bergin J., Crump C. and Hayden F. G. The immunogenicity of influenza virus vaccine in solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996;22 (2): 295-302
30. Wyzgal J., Brydak L. B., Zy  gier D., Paczek L., Rowinski W. and Grochowicki T. Study on efficacy of influenza vaccination in renal allograft recipients. *Transplant Proc* 2002;34 (2): 572-5
31. Dengler T. J., Strnad N., Buhring I., Zimmermann R., Girgsdies O., Kubler W. E. and Zielen S. Differential immune response to influenza and pneumococcal vaccination in immunosuppressed patients after heart transplantation. *Transplantation* 1998;66 (10): 1340-7
32. Burbach G., Bienzle U., Stark K., Rayes N., Neuhaus R., Serke S., Engelmann H., Kunzel W., Turk G. and Neuhaus P. Influenza vaccination in liver transplant recipients. *Transplantation* 1999;67 (5): 753-5
33. Soesman N. M., Rimmelzwaan G. F., Nieuwkoop N. J., Beyer W. E., Tilanus H. W., Kemmeren M. H., Metselaar H. J., de Man R. A. and Osterhaus A. D. Efficacy of influenza vaccination in adult liver transplant recipients. *J Med Virol* 2000;61 (1): 85-93
34. Duchini A., Hendry R. M., Nyberg L. M., Viernes M. E. and Pockros P. J. Immune response to influenza vaccine in adult liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2001;7 (4): 311-3
35. Kimball P., Verbeke S., Flattery M., Rhodes C. and Tolman D. Influenza vaccination does not promote cellular or humoral activation among heart transplant recipients. *Transplantation* 2000;69 (11): 2449-51
36. Mazzone P. J., Mossad S. B., Mawhorter S. D., Mehta A. C. and Mauer J. R. Cell-mediated immune response to influenza vaccination in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2004;23 (10): 1175-81

37. Powers D. C. and Belshe R. B. Effect of age on cytotoxic T lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J Infect Dis* 1993;167 (3): 584-92
38. Goronzy J. J., Fulbright J. W., Crowson C. S., Poland G. A., O'Fallon W. M. and Weyand C. M. Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals. *J Virol* 2001;75 (24): 12182-7
39. Versluis D. J., Beyer W. E., Masurel N., Wenting G. J. and Weimar W. Impairment of the immune response to influenza vaccination in renal transplant recipients by cyclosporine, but not azathioprine. *Transplantation* 1986;42 (4): 376-9
40. Smith K. G., Isbel N. M., Catton M. G., Leydon J. A., Becker G. J. and Walker R. G. Suppression of the humoral immune response by mycophenolate mofetil. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13 (1): 160-4
41. Novak E. J., Liu A. W., Nepom G. T. and Kwok W. W. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 1999;104 (12): R63-7
42. Haining W. N., Evans J. W., Seth N. P., Callaway G. D., Wucherpfennig K. W., Nadler L. M. and Guinan E. C. Measuring T cell immunity to influenza vaccination in children after haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2004;127 (3): 322-5
43. Bernstein E., Kaye D., Abrutyn E., Gross P., Dorfman M. and Murasko D. M. Immune response to influenza vaccination in a large healthy elderly population. *Vaccine* 1999;17 (1): 82-94
44. Kang I., Hong M. S., Nolasco H., Park S. H., Dan J. M., Choi J. Y. and Craft J. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol* 2004;173 (1): 673-81
45. Rose M. L., Smith J., Dureau G., Keogh A. and Kobashigawa J. Mycophenolate mofetil decreases antibody production after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2002;21 (2): 282-5
46. Rentenaar R. J., van Diepen F. N., Meijer R. T., Surachno S., Wilmink J. M., Schellekens P. T., Pals S. T., van Lier R. A. and ten Berge I. J. Immune responsiveness in renal transplant recipients: mycophenolic acid severely depresses humoral immunity in vivo. *Kidney Int* 2002;62 (1): 319-28
47. Dieckmann D., Plottnner H., Berchtold S., Berger T. and Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193 (11): 1303-10
48. Levings M. K., Sangregorio R. and Roncarolo M. G. 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 (11): 1295-302

49. Baecher-Allan C., Brown J. A., Freeman G. J. and Hafler D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167 (3): 1245-53
50. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R. and Suci -Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* 1998;10 (6): 775-83
51. 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. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002;3 (3): 237-43
52. Colovai A. I., Mirza M., Vlad G., Wang S., Ho E., Cortesini R. and Suci -Foca N. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003;64 (1): 31-7
53. 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 K. J. and Tanaka K. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4 (12): 2118-25

| Case<br>(transplantation<br>date) | Initial renal<br>disease                       | Recipient<br>age | Donor<br>age | HLA<br>incompa-<br>tibility<br>number | Induction<br>therapy  | Maintenance IS<br>regimen | Acute<br>rejection | Cancer                    | Notable<br>infection or<br>neoplasia<br>since IS<br>withdrawal | IS withdrawal<br>(time to<br>transplantation) | Reason for IS<br>withdrawal  | Tolerance<br>duration in<br>2004 (years) |
|-----------------------------------|------------------------------------------------|------------------|--------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------|
| TOL 1<br>(1987)                   | Undetermined<br>glomerulopathy                 | 41               | 16           | 4                                     | ATG                   | CsA+AZA+CS                | No                 | None                      | None                                                           | 13                                            | Non-<br>compliance           | 4                                        |
| TOL 2<br>(1991)                   | Obstructive<br>uropathy                        | 13               | 21           | 3                                     | ATG                   | CsA+AZA+CS                | Yes                | PTLD                      | None                                                           | 8                                             | PTLD                         | 5                                        |
| TOL 3<br>(1993)                   | Interstitial<br>nephropathy                    | 64               | 39           | 3                                     | No                    | CsA+MMF+CS                | Yes (2)            | Basocellular<br>carcinoma | None                                                           | 1                                             | Initial renal<br>degradation | 10                                       |
| TOL 4<br>(1998)                   | Interstitial<br>nephropathy<br>(drug toxicity) | 27               | 28           | 0                                     | No                    | CsA+MMF+CS                | No                 | None                      | None                                                           | 2                                             | Non-<br>compliance           | 4                                        |
| TOL 5*<br>(1973)                  | Membrano-<br>proliferative<br>glomerulopathy   | 42               | 25           | 1**                                   | Cyclo-<br>phosphamide | AZA+CS                    | Yes                | None                      | None                                                           | 12                                            | Non-<br>compliance           | 19                                       |

**Table 1 : Main clinical characteristics of « operationally tolerant » patients**

\*: TOL 5 participated only to the 2003/2004 study, whereas the others "operationally tolerant" patients participated to both parts 2003/2004 and 2004/2005 of the study

\*\* : donor HLA class II were not determined



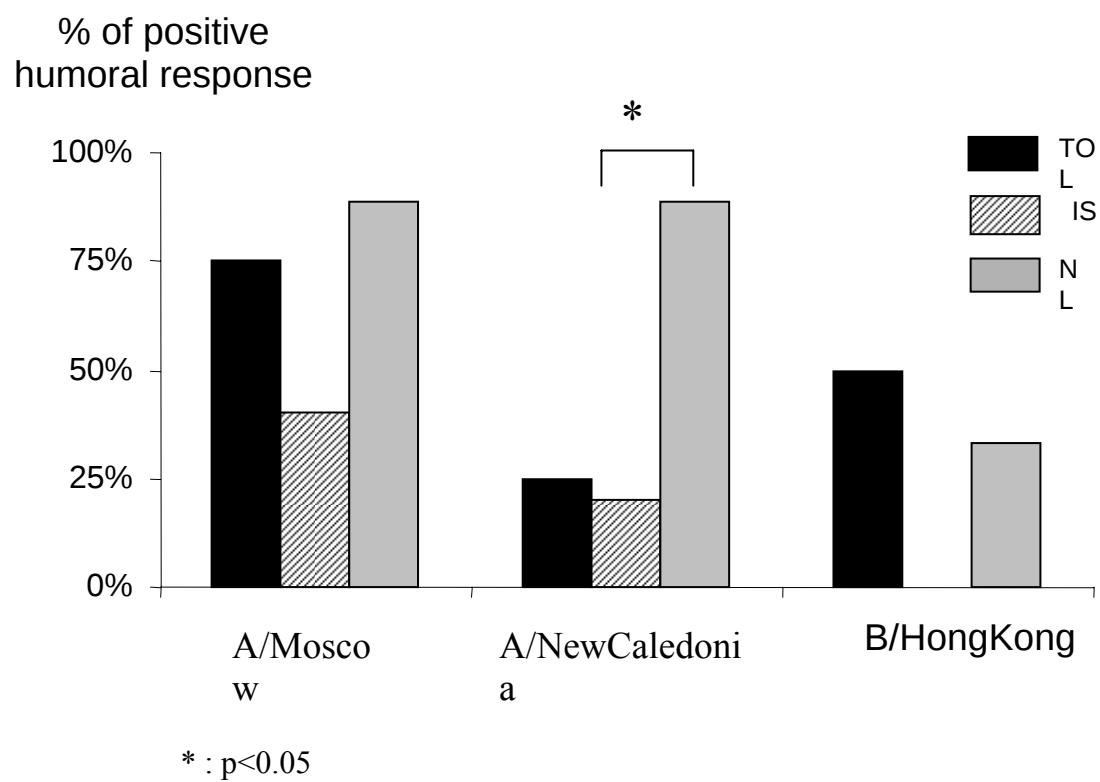
|       | Age<br>(in 2004) | Cause of renal<br>insufficiency       | Years from<br>transplantation | Post-transplantation<br>infections         | Neoplasia                 | IS treatment | Influenza<br>vaccinations before<br>2003 (Nb) | Creatininemia<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Proteinuria<br>(g/d) |
|-------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|--------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| TOL 1 | 59               | undetermined<br>glomerulopathy        | 17                            | Pulmonary infections                       | None                      | 0            |                                               | 88                                     | 0,09                 |
| TOL 2 | 26               | Obstructive uropathy                  | 13                            | EBV primoinfection,<br>zoster              | PTLD                      | 0            | Yes                                           | 118                                    | 0,33                 |
| TOL 3 | 75               | Interstitial nephropathy              | 11                            | Recurrent<br>bacteriological<br>infections | Basocellular<br>carcinoma | 0            |                                               | 96                                     | 0,5                  |
| TOL 4 | 38               | drug toxicity                         | 6                             | None                                       | None                      | 0            |                                               | 115                                    | 0,05                 |
| IS 1  | 69               | lupus nephritis                       | 7                             | zoster, urinary<br>infection               | None                      | CsA+MMF      |                                               | 122                                    | 0,41                 |
| IS 2  | 34               | Interstitial nephropathy              | 9                             | None                                       | None                      | CsA+MMF      |                                               | 97                                     | 0,08                 |
| IS 3  | 55               | polycystic kidney<br>disease          | 8                             | None                                       | Basocellular<br>carcinoma | CsA+MMF      | Yes (7)                                       | 117                                    | 0,11                 |
| IS 4  | 32               | focal segmental<br>glomerulosclerosis | 6                             | CMV, urinary<br>infections                 | None                      | FK+MMF       | Yes (16)                                      | 101                                    | 0,24                 |
| IS 5  | 64               | Interstitial nephropathy              | 7                             | Zoster                                     | None                      | FK+MMF       |                                               | 116                                    | 0,05                 |
| IS 6  | 65               | Undetermined                          | 3                             | None                                       | None                      | FK+MMF       | Yes (14)                                      | 92                                     | 0,09                 |
| IS 7  | 40               |                                       | 2                             | None                                       | None                      | FK+MMF       |                                               | 118                                    | 0,26                 |
| IS 8  | 63               | IgA nephropathy                       | 2                             | Urinary infections                         | None                      | FK+MMF       |                                               | 103                                    | 0,09                 |
| IS 9  | 50               | polycystic kidney<br>disease          | 2                             | CMV                                        | None                      | FK+MMF       | Yes (2)                                       | 81                                     | 0,18                 |

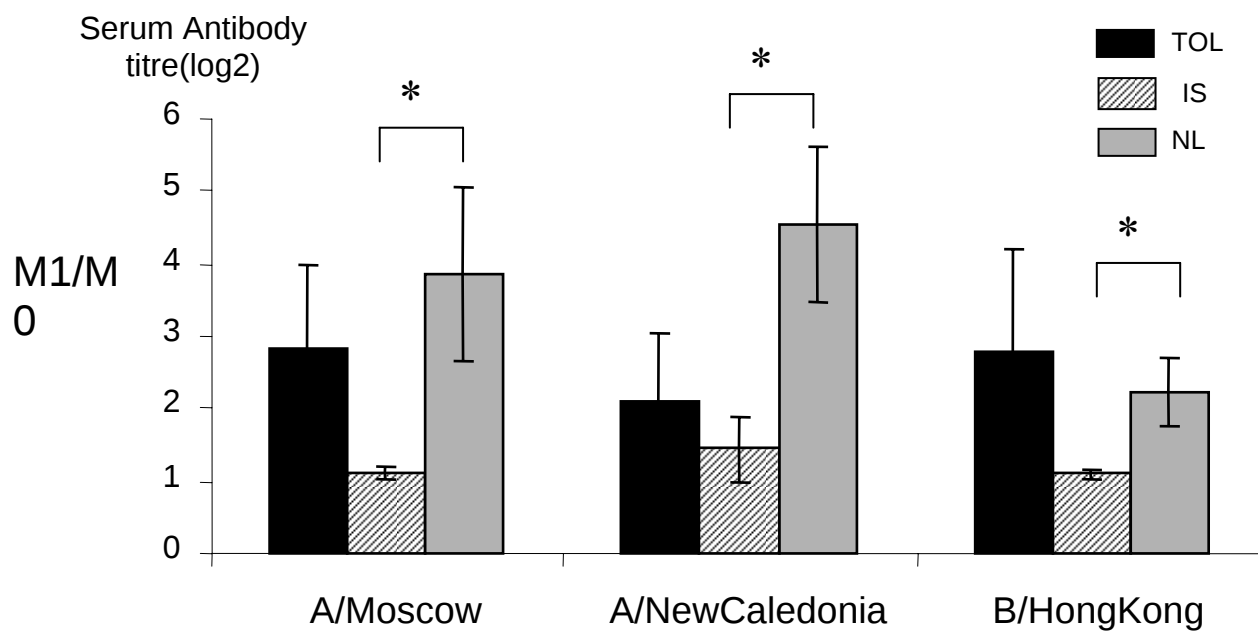
**Table 2 : Clinical and biological parameters of « operationally tolerant »(TOL) and immunosuppressed (IS) recipients**

FK : Tacrolimus, CsA : Ciclosporine, AZA : Azathioprine

|                                    | Mean age +/- SD<br>(years) | Mean creatininemia +/-<br>SD (μmol/l) | Mean Proteinuria +/-<br>SD (g/d) | Previous influneza<br>vaccination (% patients) |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------|
| Operationally tolerant<br>patients | 49.5+/-21.8                | 104+/-14.5                            | 0.24+/-0.21                      |                                                |
| Immunosuppressed<br>recipients     | 52.4+/-14.1                | 105+/-14                              | 0.16+/-0.11                      |                                                |
| Healthy volunteers                 | 44.3+/-13.5                | ND                                    | ND                               | 53%                                            |

**Table 3: Mean age, creatininemia and proteinuria of “operationally tolerant” patients, immunosuppressed recipients and healthy volunteers**

**Figure 1**

**Figure 2**

\* :  $p < 0.05$

Figure 3

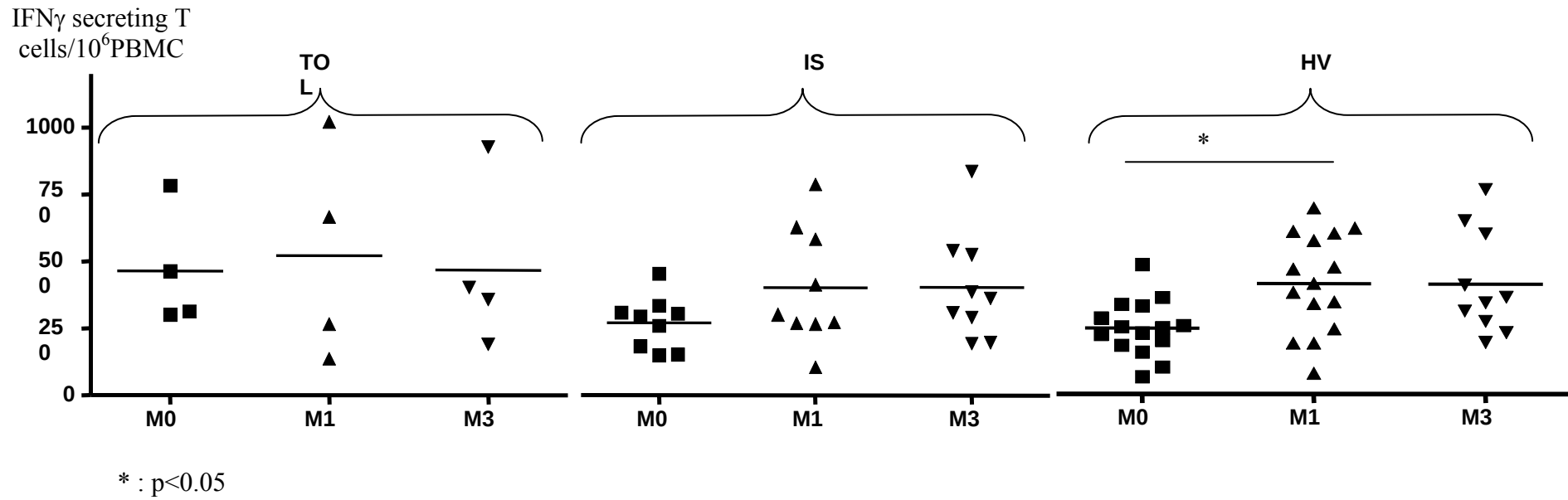


Figure 4

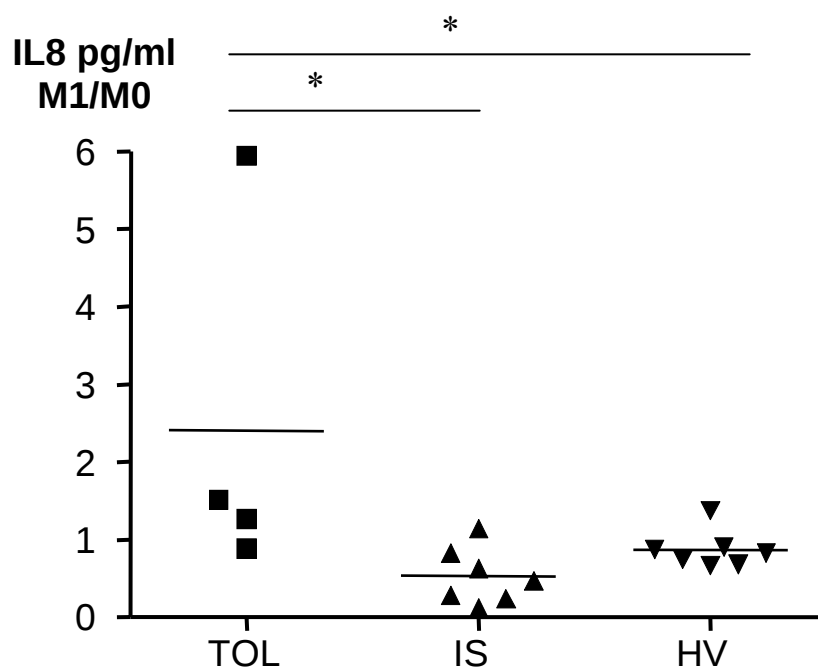


Figure 5

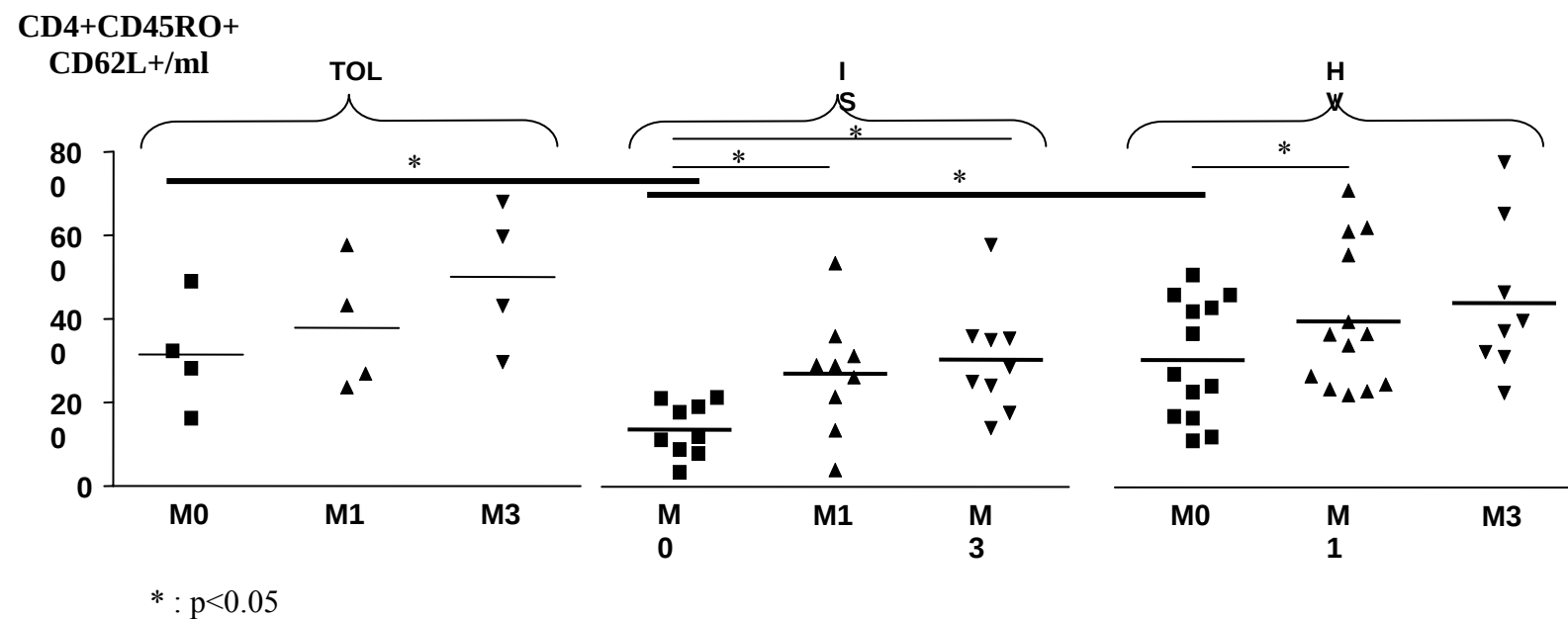
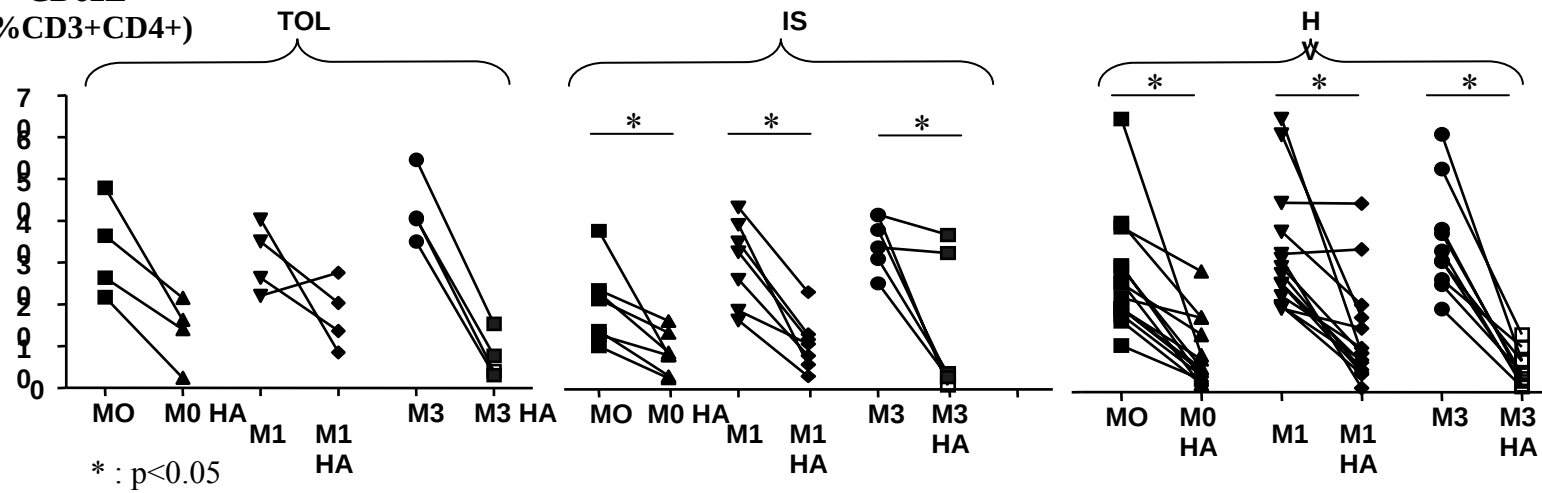


Figure 6

CD4+CD45RO+  
CD62L+  
(%CD3+CD4+)



## Figure Legends

***Figure 1: Percentages of patients presenting a positive humoral response to influenza vaccination.***

A positive response is defined as a protective titre for a subject who was seronegative before vaccination, or as a 4-fold increase in antibody titre for a previously seropositive subject. No significant difference was observed between “operationally tolerant” patients (TOL) and healthy volunteers (HV). In contrast, immunosuppressed kidney recipients (IS) had lower humoral response, significantly decreased as compared to HV response for the A/NewCaledonia strain (\*:  $p<0.05$ ).

***Figure 2: Mean increase in Hemagglutinin Inhibition (HI) titre one month after vaccination compared to before.***

HI titre was expressed as the reciprocal of the highest dilution showing HI, divided by 5 and transformed to binary logarithms. The mean ratio between the titre observed at one month (M1) and the titre observed before vaccination (M0) is reported. TOL and HV had an increase in HI titres after influenza vaccination (mean ratio M1/M0 above 1) and these magnitudes were not significantly different. In contrast, IS presented no or poor increase in HI titres, which was significantly reduced comparing to HV for each strain of the vaccine.

***Figure 3: IFN $\gamma$  secreting T cells frequency determined with an ELISPOT assay after a 24-hours in vitro stimulation with HA***

PBMC were stimulated for 24 hours with the vaccine as described in Materials and Methods section. An increase in specific IFN $\gamma$  secreting T cells frequency was noted in TOL, IS and HV. No significant differences were found between these groups. The frequency remained stable 3 months after vaccination as compared to 1 month.

**Figure 4 : IL8 concentration after in vitro stimulation.**

IL8 was measured in the supernatant after a 48-hours *in vitro* stimulation of PBMC with the vaccine. A decrease of IL8 production was observed one month after vaccination in IS recipients (ratio of the IL8 concentration in the supernatant one month after vaccination M1/before vaccination M0 above 1) whereas an increase was noted for “operationally tolerant” patients. The ratio M1/M0 IL8 production of “operationally tolerant” patients was significantly different from the ratios of immunosuppressed recipients and healthy volunteers.

**Figure 5 : “Central memory” CD45RO+CD62L+ CD4+ cells increased after vaccination**

An increase in CD45RO+CD62L+CD4+ lymphocyte subset was observed in TOL patients, IS recipients and HV after influenza vaccination. The number of peripheral blood T lymphocytes characterized by this phenotype was significantly higher after vaccination for IS (at one and three months, M1 and M3) and HV (M1). Moreover, IS recipients presented significantly lower numbers of CD45RO+CD62L+CD4+ lymphocytes before vaccination (M0) than TOL and HV, and this was not observed any more one month after (M1).

**Figure 6 : Changes in CD45 isoforms expression on CD4+ cells after in vitro stimulation**

After a 6-hours *in vitro* stimulation with HA, percentages of cells expressing CD45RO were dramatically reduced in all groups after stimulation (MO HA, M1 HA and M3 HA) than before stimulation (M0, M1 and M3), significantly for HV. This was observed even before vaccination. This was associated with an increase in percentages of cells expressing CD45RA (and CD69) molecules after the stimulation (data not shown).

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'induction d'une tolérance à une allogreffe est un objectif majeur en transplantation. Reconnaître une tolérance est aussi très important, y compris pour progresser vers l'induction de celle-ci. La « tolérance opérationnelle » est avant tout une définition clinique qui correspond à une fonction du greffon satisfaisante et stable après l'arrêt des traitements immunosuppresseurs depuis plus de 1 an. Quelques patients présentent de telles caractéristiques après une transplantation rénale. Ces patients sont cependant très rares, et les études portant sur les mécanismes impliqués dans la survenue de cet état de « tolérance opérationnelle » sont donc limitées.

Dans le premier article, nous rapportons les caractéristiques cliniques de dix patients présentant une « tolérance opérationnelle » après une transplantation rénale. L'effectif de cette cohorte semble certes faible. Il s'agit de patients recrutés avec la participation de nombreux centres français de transplantation rénale et constitue la plus grande cohorte décrite à notre connaissance. L'analyse de ces patients a permis de constater d'une part que certains patients « opérationnellement tolérants » semblaient conserver une réactivité contre les antigènes du donneur, illustrée par la présence d'anticorps anti-classe II spécifiques du donneur. L'existence de tels anticorps est habituellement associée à une évolution défavorable de la greffe avec la survenue de rejet aigu ou chronique (319) (Hourmant *et al*, soumis). Cependant, les patients décrits ici ont probablement une réponse alloréactive plus faible puisque l'immunisation anti-HLA avant la greffe était aussi globalement faible malgré le nombre de transfusions sanguines administrées (9+/-3.9% de PRA pour 6+/-7.3 transfusions) (320). D'autre part, ces patients ne présentent pas de signes cliniques d'immunodépression, puisque depuis l'arrêt des traitements immunosuppresseurs, ils n'ont pas eu d'infection sévères ou de néoplasies viro-induites. Le jeune âge des donneurs et une reprise de fonction du greffon pas ou peu retardée reflètent par ailleurs probablement la bonne « qualité » des greffons rénaux. Ce paramètre, associé à l'arrêt progressif de l'immunosuppression, constituent des éléments favorisant potentiellement la survenue d'un état de tolérance opérationnelle.

Cette description clinique est le préambule nécessaire à l'interprétation des études fonctionnelles réalisée chez ces patients. Cependant, elle ne permet pas d'envisager les mécanismes en cause dans la survenue et le maintien d'un état de tolérance. Les modalités thérapeutiques ne semblent pas jouer un rôle majeur ici, puisque les patients n'ont pas tous reçu de traitement d'induction, et le traitement immunosuppresseur d'entretien est différent d'un patient à un autre. De plus, cette étude clinique ne permet pas de préciser si l'état de tolérance est spécifique du greffon ou si ces patients conservent des réponses immunitaires globalement diminuées.

Afin d'essayer de répondre à ce dernier point, nous avons analysé la réponse immunitaire des patients « opérationnellement tolérants » après la vaccination anti-grippale. Ces patients sont d'une part rares et d'autre part souvent peu compliants (tant pour les prises médicamenteuses que pour les consultations de suivi !). C'est pourquoi nous n'avons pu conduire cette étude que sur un faible effectif d'individus parmi ces patients « opérationnellement tolérants » (4 à 5 patients sur les 8 qui présentent actuellement les caractéristiques cliniques d'une « tolérance opérationnelle »). Nous avons observé que la réponse de ces sujets n'était pas significativement différente de celle des volontaires sains. En revanche, les patients greffés rénaux traités par une association d'immunosuppresseurs avaient une réponse humorale significativement plus faible que les volontaires sains. Les résultats présentés ici sont préliminaires, et la réponse humorale de la deuxième partie de l'étude (saison 2004-2005) sera prochainement analysée. Nous pourrons ainsi vérifier d'une part si les réponses humorales observées dans les différents groupes de sujets lors de la première année sont reproduites. D'autre part, nous regarderons s'il existe une corrélation entre la réponse humorale et la réponse cellulaire (déterminée par la mesure de la fréquence des cellules produisant de l'IFN $\gamma$  après stimulation *in vitro* avec le vaccin).

Nous avons présenté en introduction les études déjà menées sur des patients « opérationnellement tolérants ». Le phénotype, la transcription en cytokines et le répertoire du récepteur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> sanguins ont été caractérisés au laboratoire (312)(Louis *et al*, soumis) (Baeten *et al*, soumis). Ces résultats mettent en évidence un profil transcriptionnel de cytokines et un phénotype lymphocytaire différent des sujets en rejet chronique, mais proche de celui des volontaires sains. Une première analyse des cellules mononucléées sanguines par

des puces à ADN a révélé un profil de gènes qui permet de discriminer l'état de « tolérance opérationnelle » au rejet chronique (Brouard *et al*, soumis). Une seconde étude indépendante portant essentiellement sur les mêmes malades mais avec une autre stratégie (échantillons poolés, puces à oligonucléotides, comparaison directe) a abouti aux mêmes conclusions. Ces résultats encourageants ont lancé le développement d'une puce à ADN (dédiée « tolérance ») permettant d'identifier une signature de la tolérance, actuellement en cours de validation. Par ailleurs, afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans l'état de tolérance de ces patients, l'activité régulatrice des cellules CD4+CD25+ est évaluée par des tests de suppression *in vitro*. La réactivité contre le donneur ne peut être testée directement car les cellules du donneur ne sont plus disponibles dans la majorité des cas. Elle est maintenant analysée dans le laboratoire par la réponse après une stimulation polyclonale (anti-CD3 et anti-CD28) et par la réponse contre des peptides dérivés des molécules HLA du donneur et pouvant être présentés par des molécules HLA du receveur (par Elispot). La persistance éventuelle d'un microchimérisme est également en cours de détermination. L'étude de la fonction des cellules dendritiques et mononuclées de ces patients est également débutée, à la recherche de propriétés tolérogènes. Il sera probablement intéressant d'évaluer plus tard le polymorphisme des cytokines ou d'autres molécules impliquées dans les réponses immunitaires.

Les perspectives d'études sur les patients « opérationnellement tolérants » sont donc nombreuses. Elles sont néanmoins malheureusement limitées non seulement par le faible nombre de patients qui répondent à de telles caractéristiques mais aussi par la répétition des prélèvements pour chacun de ces patients. Les résultats des études déjà menées semblent indiquer que ces patients ne présentent pas d'immunosuppression globale. Des caractéristiques associées à un état de tolérance semblent exister et pourraient permettre d'identifier dans le futur une « signature » de la tolérance. Elle pourrait être alors recherchée chez tous les patients après une transplantation rénale. Ce « dépistage » de la tolérance permettrait d'envisager une réduction voire un arrêt de l'immunosuppression chez certains patients qui présenteraient un profil associé à la tolérance.

## **CONCLUSION**

L'induction d'une tolérance spécifique à une allogreffe, sans risques iatrogènes importants, serait une avancée considérable dans le domaine de la transplantation. Nous avons abordé ce concept au cours du travail rapporté dans cette thèse. Tout d'abord, nous avons étudié l'importance des cellules dendritiques du donneur dans la survenue d'un rejet aigu dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, dans un modèle « classique » du laboratoire. Alors qu'elles sont indispensables à l'induction de tolérance selon certains protocoles dans la même combinaison, ces cellules dendritiques, sources principales de l'alloreconnaissance directe, ne sont pas nécessaires pour la survenue du rejet aigu.

Dans cette thèse, je me suis cependant surtout intéressée aux patients transplantés rénaux qui présentent une « tolérance opérationnelle ». Nous avons analysé leur histoire médicale et leur évolution après la transplantation et l'arrêt des traitements immunosuppresseurs, afin de mettre en évidence des paramètres associés à un état de « tolérance opérationnelle ». Ces patients ne présentent pas de signes cliniques d'immunosuppression, mais cela reste insuffisant pour préciser une immunocompétence globale (avec une tolérance spécifique du greffon) ou une relative immunosuppression malgré l'arrêt des traitements. Nous avons donc comparé leur réponse immune après une vaccination anti-grippale à celle de volontaires sains et à celle de sujets transplantés traités par une immunosuppression conventionnelle. Les résultats préliminaires de cette étude suggèrent que les patients « opérationnellement tolérants » ne sont pas immunodéprimés, leur réponse immune post-vaccinale n'étant pas significativement différente de celle des volontaires sains. De nombreuses voies sont actuellement explorées afin de préciser au mieux les mécanismes impliqués dans la « tolérance opérationnelle » chez ces sujets, et afin de mettre en évidence le marqueur ou l'association de marqueurs offrant une « signature » de la tolérance. Celle-ci permettrait alors un « dépistage » à la recherche d'un profil associé ou favorisant la survenue d'une tolérance à une allogreffe rénale. Une réduction voire un arrêt de l'immunosuppression pourrait alors être envisagée chez certains patients greffés, tout en maintenant une surveillance

=

rapprochée. Ceci permettrait peut-être alors d'observer une plus forte proportion de patients transplantés rénaux « opérationnellement tolérants » et pour ceux-ci de réduire les risques iatrogènes liés à l'immunosuppression.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Reinherz E. L., Tan K., Tang L., Kern P., Liu J., Xiong Y., Hussey R. E., Smolyar A., Hare B., Zhang R., Joachimiak A., Chang H. C., Wagner G. and Wang J. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 1999;286 (5446): 1913-21.
2. Murray J. E., Merrill J. P., Dammin G. J., Dealy J. B., Jr., Walter C. W., Brooke M. S. and Wilson R. E. Study on transplantation immunity after total body irradiation: clinical and experimental investigation. *Surgery* 1960;48: 272-84
3. Starzl T. E., Groth C. G., Brettschneider L., Penn I., Fulginiti V. A., Moon J. B., Blanchard H., Martin A. J., Jr. and Porter K. A. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168 (3): 392-415
4. Barnard C. N. Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Am J Cardiol* 1968;22 (4): 584-96
5. Barnard C. N. What we have learned about heart transplants. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1968;56 (4): 457-68
6. Fehr T. and Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. *Transpl Immunol* 2004;13 (2): 117-30
7. Pasare C. and Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2004;6 (15): 1382-7
8. Barton G. M. and Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003;300 (5625): 1524-5
9. Zinkernagel R. M. and Doherty P. C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 1974;248 (450): 701-2
10. Collins T., Korman A. J., Wake C. T., Boss J. M., Kappes D. J., Fiers W., Ault K. A., Gimbrone M. A., Jr., Strominger J. L. and Pober J. S. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81 (15): 4917-21
11. Jorgensen J. L., Esser U., Fazekas de St Groth B., Reay P. A. and Davis M. M. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 1992;355 (6357): 224-30

12. Garboczi D. N., Ghosh P., Utz U., Fan Q. R., Biddison W. E. and Wiley D. C. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 1996;384 (6605): 134-41
13. Garcia K. C., Degano M., Pease L. R., Huang M., Peterson P. A., Teyton L. and Wilson I. A. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 1998;279 (5354): 1166-72
14. Garcia K. C., Teyton L. and Wilson I. A. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 1999;17: 369-97
15. Mason D. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* 1998;19 (9): 395-404.
16. Jenkins M. K., Pardoll D. M., Mizuguchi J., Quill H. and Schwartz R. H. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* 1987;95: 113-35
17. Kabelitz D., Pohl T. and Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993;14 (7): 338-9
18. Flynn K. and Mullbacher A. Memory alloreactive cytotoxic T cells do not require costimulation for activation in vitro. *Immunol Cell Biol* 1996;74 (5): 413-20
19. Bertram E. M., Dawicki W. and Watts T. H. Role of T cell costimulation in anti-viral immunity. *Semin Immunol* 2004;16 (3): 185-96
20. Ohashi P. S. and DeFranco A. L. Making and breaking tolerance. *Curr Opin Immunol* 2002;14 (6): 744-59
21. den Haan J. M. and Bevan M. J. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2002;196 (6): 817-27
22. Fonteneau J. F., Kavanagh D. G., Lirvall M., Sanders C., Cover T. L., Bhardwaj N. and Larsson M. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003;102 (13): 4448-55
23. Delamarre L., Holcombe H. and Mellman I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* 2003;198 (1): 111-22
24. Datta S. K., Redecke V., Prilliman K. R., Takabayashi K., Corr M., Tallant T., DiDonato J., Dziarski R., Akira S., Schoenberger S. P. and Raz E. A subset of Toll-

=

- like receptor ligands induces cross-presentation by bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* 2003;170 (8): 4102-10
25. Belz G. T., Behrens G. M., Smith C. M., Miller J. F., Jones C., Lejon K., Fathman C. G., Mueller S. N., Shortman K., Carbone F. R. and Heath W. R. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 2002;196 (8): 1099-104
  26. Harshyne L. A., Watkins S. C., Gambotto A. and Barratt-Boyes S. M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* 2001;166 (6): 3717-23
  27. Sauter B., Albert M. L., Francisco L., Larsson M., Somersan S. and Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000;191 (3): 423-34.
  28. Gibson T. and Medawar P. B. *J Anat* 1943;77: 299-310
  29. Medawar P. B. *J Anat* 1944;78: 176-199
  30. Lakkis F. G., Arakelov A., Konieczny B. T. and Inoue Y. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 2000;6 (6): 686-8
  31. Zhou P., Hwang K. W., Palucki D., Kim O., Newell K. A., Fu Y. X. and Alegre M. L. Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses. *Am J Transplant* 2003;3 (3): 259-66
  32. Benichou G., Takizawa P. A., Olson C. A., McMillan M. and Sercarz E. E. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992;175 (1): 305-8.
  33. Gallon L., Watschinger B., Murphy B., Akalin E., Sayegh M. H. and Carpenter C. B. The indirect pathway of allorecognition. The occurrence of self-restricted T cell recognition of allo-MHC peptides early in acute renal allograft rejection and its inhibition by conventional immunosuppression. *Transplantation*. 1995;59 (4): 612-6
  34. Sayegh M. H. and Carpenter C. B. Role of indirect allorecognition in allograft rejection. *Int Rev Immunol* 1996;13 (3): 221-9
  35. Waaga A. M., Chandraker A., Spadafora-Ferreira M., Iyengar A. R., Khoury S. J., Carpenter C. B. and Sayegh M. H. Mechanisms of indirect allorecognition: characterization of MHC class II allopeptide-specific T helper cell clones from animals undergoing acute allograft rejection. *Transplantation* 1998;65 (7): 876-83.

36. Lechler R. I. and Batchelor J. R. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med* 1982;155 (1): 31-41.
37. Lechler R. I. and Batchelor J. R. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982;156 (6): 1835-41.
38. Liu Z., Sun Y. K., Xi Y. P., Hong B., Harris P. E., Reed E. F. and Suciu-Foca N. Limited usage of T cell receptor V beta genes by allopeptide-specific T cells. *J Immunol* 1993;150 (8 Pt 1): 3180-6.
39. Daniel C., Horvath S. and Allen P. M. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 1998;8 (5): 543-52.
40. Sebille F., Gagne K., Guillet M., Pallier A., Brouard S., Vanhove B., Delsuc M. A. and Souillou J. P. Direct recognition of foreign MHC determinants by naive T cells mobilises specific Vb families without skewing of the CDR3 length distribution. *Journal of Immunology* 2001;167 (6): 3082-8
41. Benichou G., Tam R. C., Soares L. R., Popov I. A., Garovoy M. R. and Fedoseyeva E. V. The influence of two distinct alloresponse pathways on the design of peptide-based strategies for allograft tolerance. *Res Immunol* 1996;147 (6): 377-87.
42. Benichou G. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Front Biosci* 1999;4: D476-80
43. Suchin E. J., Langmuir P. B., Palmer E., Sayegh M. H., Wells A. D. and Turka L. A. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001;166 (2): 973-81.
44. Lombardi G., Sidhu S., Daly M., Batchelor J. R., Makgoba W. and Lechler R. I. Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 1990;2 (1): 9-13
45. Game D. S. and Lechler R. I. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2002;10 (2-3): 101-8
46. Obst R., Netuschil N., Klopfer K., Stevanovic S. and Rammensee H. G. The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self-major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 2000;191 (5): 805-12
47. Kreisel D., Krupnick A. S., Gelman A. E., Engels F. H., Popma S. H., Krasinskas A. M., Balsara K. R., Szeto W. Y., Turka L. A. and Rosengard B. R. Non-hematopoietic

- allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med* 2002;8 (3): 233-9
48. Kreisel D., Krasinskas A., Krupnick A., Gelman A., Balsara K., Popma S., Riha M., Rosengard A., Turka L. and Rosengard B. Vascular endothelium does not activate CD4+ direct allorecognition in graft rejection. *J Immunol* 2004;173 (5): 3027-34
  49. Talmage D. W., Dart G., Radovich J. and Lafferty K. J. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science* 1976;191 (4225): 385-8
  50. Fabre J. and Morris P. The role of passenger leucocytes in the rejection of renal allografts in the rat. *Transplantation*. 1973;15 (6): 631-3
  51. Larsen C. P., Morris P. J. and Austyn J. M. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med* 1990;171 (1): 307-14.
  52. Saiki T., Ezaki T., Ogawa M. and Matsuno K. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation* 2001;71 (12): 1806-15
  53. Spencer S. C. and Fabre J. W. Characterization of the tissue macrophage and the interstitial dendritic cell as distinct leukocytes normally resident in the connective tissue of rat heart. *J Exp Med* 1990;171 (6): 1841-51.
  54. Hart D. N. and Fabre J. W. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* 1981;154 (2): 347-61.
  55. Hart D. N., Winearls C. G. and Fabre J. W. Graft adaptation: studies on possible mechanisms in long-term surviving rat renal allografts. *Transplantation* 1980;30 (1): 73-80
  56. Pietra B. A., Wiseman A., Bolwerk A., Rizeq M. and Gill R. G. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *J Clin Invest* 2000;106 (8): 1003-10.
  57. Benichou G., Malloy K. M., Tam R. C., Heeger P. S. and Fedoseyeva E. V. The presentation of self and allogeneic MHC peptides to T lymphocytes. *Hum Immunol* 1998;59 (9): 540-8
  58. Benichou G., Valujskikh A. and Heeger P. S. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 1999;162 (1): 352-8.

- 
59. Baker R. J., Hernandez-Fuentes M. P., Brookes P. A., Chaudhry A. N., Cook H. T. and Lechler R. I. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol* 2001;167 (12): 7199-206
60. Vella J. P., Spadafora-Ferreira M., Murphy B., Alexander S., Harmon W., Carpenter C. B. and Sayegh M. H. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*. 1997;64 (6): 795-800
61. Lee R. S., Yamada K., Houser S. L., Womer K. L., Maloney M. E., Rose H. S., Sayegh M. H. and Madsen J. C. Indirect recognition of allopeptides promotes the development of cardiac allograft vasculopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98 (6): 3276-81.
62. Szeto W. Y., Krasinskas A. M., Kreisel D., Krupnick A. S., Popma S. H. and Rosengard B. R. Depletion of recipient CD4+ but not CD8+ T lymphocytes prevents the development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation* 2002;73 (7): 1116-22
63. Stanford R. E., Ahmed S., Hodson M., Banner N. R. and Rose M. L. A role for indirect allorecognition in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am J Transplant* 2003;3 (6): 736-42
64. Ensminger S. M., Spriewald B. M., Witzke O., Pajaro O. E., Yacoub M. H., Morris P. J., Rose M. L. and Wood K. J. Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis. *Transplantation* 2002;73 (2): 279-86
65. Suciu-Foca N., Ciubotariu R., Liu Z., Ho E., Rose E. A. and Cortesini R. Persistent allopeptide reactivity and epitope spreading in chronic rejection. *Transplant Proc* 1998;30 (5): 2136-7
66. Auchincloss H., Lee R., Shea S., Markowitz J. S., Grusby M. J. and Glimcher L. H. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90 (8): 3373-7.
67. Fangmann J., Dalchau R. and Fabre J. W. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1992;175 (6): 1521-9

68. Braun M. Y., Grandjean I., Feunou P., Duban L., Kiss R., Goldman M. and Lantz O. Acute rejection in the absence of cognate recognition of allograft by T cells. *J Immunol* 2001;166 (8): 4879-83.
69. Reed A. J., Noorchashm H., Rostami S. Y., Zarrabi Y., Perate A. R., Jeganathan A. N., Caton A. J. and Naji A. Alloreactive CD4 T cell activation in vivo: an autonomous function of the indirect pathway of alloantigen presentation. *J.Immunol* 2003;171 (12): 6502-9
70. Jiang S., Herrera O. and Lechler R. I. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004;16 (5): 550-7
71. Oluwole S., Hardy M. A., Wang T., Satake K., Todd G., Reemtsma K. and Nowygrod R. Donor pretreatment: rat heart allograft survival and measurement of passenger leukocyte depletion with indium-111. *Transplantation* 1980;30 (1): 31-3
72. McKenzie J. L., Beard M. E. and Hart D. N. The effect of donor pretreatment on interstitial dendritic cell content and rat cardiac allograft survival. *Transplantation* 1984;38 (4): 371-6.
73. Burris D. E., Gruel S. M. and Rao U. K. Persistence of dendritic cells and allograft antigenicity despite prolonged interim hosting of cardiac allografts in rats. *Transplantation* 1989;47 (6): 1085-7
74. Stegall M. D., Tezuka K., Oluwole S. F., Engelstad K., Jing M. X., Andrew J. and Hardy M. A. Interstitial class II-positive cell depletion by donor pretreatment with gamma irradiation. Evidence of differential immunogenicity between vascularized cardiac allografts and islets. *Transplantation* 1990;49 (2): 246-51.
75. Darden A. G., Clarke R. D. and Guttman R. D. Rat cardiac dendritic cells: frequency in inbred and congenic rats. *Transplant Proc* 1987;19 (1 Pt 1): 208
76. Darden A. G., Forbes R. D., Darden P. M. and Guttman R. D. The effects of genetics and age on expression of MHC class II and CD4 antigens on rat cardiac interstitial dendritic cells. *Cell Immunol* 1990;126 (2): 322-30
77. Steiniger B., Klempnauer J. and Wonigeit K. Phenotype and histological distribution of interstitial dendritic cells in the rat pancreas, liver, heart, and kidney. *Transplantation* 1984;38 (2): 169-74
78. Yoon S., Yoo H. J., Shim N. R., Baek S. Y., Kim B. S., Kim J. B., Jun E. J., Son Y. K., Lee S. Y. and Yoo Y. H. Immunohistochemical characterization of macrophage and dendritic cell subpopulations of the spleen, thymus, tongue and heart in

=

- cyclophosphamide-induced immunosuppressed rat. *Anat Histol Embryol* 2003;32 (2): 80-8
79. Douillard P., Pannetier C., Josien R., Menoret S., Kourilsky P., Souillou J. P. and Cuturi M. C. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996;157 (3): 1250-60.
80. Douillard P., Vignes C., Josien R., Chiffolleau E., Heslan J. M., Proust V., Souillou J. P. and Cuturi M. C. Reassessment of the role of CD8+ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur J Immunol* 1999;29 (6): 1919-24.
81. Gagne K., Brouard S., Guillet M., Cuturi M. C. and Souillou J. P. 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
82. Krasninkas A. M., Eiref S. D., McLean A. D., Kreisel D., Gelman A. E., Popma S. H., Moore J. S. and Rosengard B. R. Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000;70 (3): 514-21
83. Maksymowicz M., Olszewski W. L. and Cybulska E. Repopulation of donor heart with recipient bone marrow-derived dendritic cells does not prevent acute rejection. *Transplant Proc* 2002;34 (2): 683-4
84. Maksymowicz M., Olszewski W. L. and Cybulska E. Repopulation of donor heart by recipient bone marrow-derived dendritic cells prior to transplantation causes acute rejection by both the allogeneic and syngeneic recipient. *Transplant Proc* 2003;35 (6): 2374-5
85. Wang Z., Castellana A., De Creus A., Shufesky W. J., Morelli A. E. and Thomson A. W. Heart, but not skin, allografts from donors lacking Flt3 ligand exhibit markedly prolonged survival time. *J Immunol* 2004;172: 5924-30
86. Sun J., McCaughan G. W., Gallagher N. D., Sheil A. G. and Bishop G. A. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 1995;60 (3): 233-6.

87. Sriwatanawongsa V., Davies H. S. and Calne R. Y. The essential roles of parenchymal tissues and passenger leukocytes in the tolerance induced by liver grafting in rats. *Nat Med* 1995;1 (5): 428-32.
88. Josien R., Heslan M., Brouard S., Souillou J. P. and Cuturi M. C. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998;92 (12): 4539-44.
89. Mauiyyedi S. and Colvin R. B. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11 (6): 609-18
90. Lin Y., Soares M. P., Sato K., Takigami K., Csizmadia E., Smith N. and Bach F. H. Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. *J Immunol* 1999;163 (5): 2850-7
91. Salama A. D., Delikouras A., Pusey C. D., Cook H. T., Bhargal G., Lechler R. I. and Dorling A. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. *Am J Transplant* 2001;1 (3): 260-9
92. Park W. D., Grande J. P., Ninova D., Nath K. A., Platt J. L., Gloor J. M. and Stegall M. D. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *Am J Transplant* 2003;3 (8): 952-60
93. Delikouras A., Hayes M., Malde P., Lechler R. I. and Dorling A. Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-xl and protection from tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactive natural antibody. *Transplantation* 2001;71 (5): 599-605
94. Desvaux D., Schwarzing M., Pastural M., Baron C., Abtahi M., Berrehar F., Lim A., Lang P. and le Gouvello S. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. *Transplantation* 2004;78 (5): 647-53
95. Le Moine A. and Goldman M. Non-classical pathways of cell-mediated allograft rejection: new challenges for tolerance induction? *Am J Transplant* 2003;3 (2): 101-6
96. Braun M. Y., Desalle F., Le Moine A., Pretolani M., Matthys P., Kiss R. and Goldman M. IL-5 and eosinophils mediate the rejection of fully histoincompatible

=

- vascularized cardiac allografts: regulatory role of alloreactive CD8(+) T lymphocytes and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2000;30 (5): 1290-6
97. Poulin L. F., Richard M., Le Moine A., Kiss R., McKenzie A. N., Goldman M., Renaud J. C., Van Snick J. and Braun M. Y. Interleukin-9 promotes eosinophilic rejection of mouse heart allografts. *Transplantation* 2003;76 (3): 572-7
  98. Guyot C., Nguyen J. M., Cochat P., Foulard M., Bouissou F., Van Damme-Lombaerts R., Loirat C., Janssen F., Bensman A., Nivet H., Fischbach M., Guignard J. P. and Andre J. L. Risk factors for chronic rejection in pediatric renal allograft recipients. *Pediatr Nephrol* 1996;10 (6): 723-7
  99. Pascual M., Theruvath T., Kawai T., Tolkoff-Rubin N. and Cosimi A. B. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002;346 (8): 580-90
  100. Joosten S. A., van Kooten C. and Paul L. C. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003;16 (3): 137-45
  101. Shirwan H. Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation* 1999;68 (6): 715-26
  102. Racusen L. C., Halloran P. F. and Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004;4 (10): 1562-6
  103. Gasser M., Waaga A. M., Kist-Van Holthe J. E., Lenhard S. M., Laskowski I., Shaw G. D., Hancock W. W. and Tilney N. L. Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol* 2002;13 (7): 1937-45
  104. Szabo A. and Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1998;30 (8): 4281-4
  105. Koh K. P., Wang Y., Yi T., Shiao S. L., Lorber M. I., Sessa W. C., Tellides G. and Pober J. S. T cell-mediated vascular dysfunction of human allografts results from IFN-gamma dysregulation of NO synthase. *J Clin Invest* 2004;114 (6): 846-56
  106. Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., O'Connell P. J., Allen R. D. and Chapman J. R. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349 (24): 2326-33
  107. Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., O'Connell P. J., Allen R. D. and Chapman J. R. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. *Transplantation* 2004;78 (2): 242-9

108. Nankivell B. J., Borrows R. J., Fung C. L., O'Connell P. J., Chapman J. R. and Allen R. D. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004;78 (4): 557-65
109. Schwartz R. and Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959;183 (4676): 1682-3
110. Schwartz R., Eisner A. and Dameshek W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *J Clin Invest* 1959;38 (8): 1394-403
111. Starzl T. E., Marchioro T. L. and Waddell W. R. The Reversal of Rejection in Human Renal Homografts with Subsequent Development of Homograft Tolerance. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117: 385-95
112. Starzl T. E., Marchioro T. L., Porter K. A., Iwasaki Y. and Cerilli G. J. The use of heterologous antilymphoid agents in canine renal and liver homotransplantation and in human renal homotransplantation. *Surg Gynecol Obstet* 1967;124 (2): 301-8
113. Calne R. Y., White D. J., Thiru S., Evans D. B., McMaster P., Dunn D. C., Craddock G. N., Pentlow B. D. and Rolles K. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978;2 (8104-5): 1323-7
114. Homan W. P., Fabre J. W., French M. E., Millard P. R. and Morris P. J. Treatment of kidney-allograft rejection with cyclosporin A. *Lancet* 1979;2 (8139): 421
115. Souillou J. P., Peyronnet P., Le Mauff B., Hourmant M., Olive D., Mawas C., Delaage M., Hirn M. and Jacques Y. Prevention of rejection of kidney transplants by monoclonal antibody directed against interleukin 2. *Lancet* 1987;1 (8546): 1339-42
116. Souillou J. P., Cantarovich D., Le Mauff B., Giral M., Robillard N., Hourmant M., Hirn M. and Jacques Y. Randomized controlled trial of a monoclonal antibody against the interleukin-2 receptor (33B3.1) as compared with rabbit antithymocyte globulin for prophylaxis against rejection of renal allografts. *N Engl J Med* 1990;322 (17): 1175-82
117. Hourmant M., Le Mauff B., Le Meur Y., Dantal J., Cantarovich D., Giral M., Caudrelier P., Albericci G. and Souillou J. P. Administration of an anti-CD11a monoclonal antibody in recipients of kidney transplantation. A pilot study. *Transplantation* 1994;58 (3): 377-80
118. Dantal J., Ninin E., Hourmant M., Boeffard F., Cantarovich D., Giral M., Wijdenes J., Souillou J. P. and Le Mauff B. Anti-CD4 MoAb therapy in kidney transplantation - a pilot study in early prophylaxis of rejection. *Transplantation* 1996;62 (10): 1502-6

119. Calne R., Moffatt S. D., Friend P. J., Jamieson N. V., Bradley J. A., Hale G., Firth J., Bradley J., Smith K. G. and Waldmann H. Campath 1H allows low-dose cyclosporine monotherapy in 31 cadaveric renal allograft recipients. *Transplantation* 1999;68 (10): 1613-6
120. Kahana L. and Baxter J. OKT3 rescue in refractory renal rejection. *Nephron* 1987;46 Suppl 1: 34-40
121. Norman D. J., Barry J. M., Bennett W. M., Leone M., Henell K., Funnell B. and Hubert B. The use of OKT3 in cadaveric renal transplantation for rejection that is unresponsive to conventional anti-rejection therapy. *Am J Kidney Dis* 1988;11 (2): 90-3
122. Halloran P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351 (26): 2715-29
123. Sheil A. G., Disney A. P., Mathew T. H. and Amiss N. De novo malignancy emerges as a major cause of morbidity and late failure in renal transplantation. *Transplant Proc* 1993;25 (1 Pt 2): 1383-4
124. London N. J., Farmery S. M., Will E. J., Davison A. M. and Lodge J. P. Risk of neoplasia in renal transplant patients. *Lancet* 1995;346 (8972): 403-6
125. Dantal J., Hourmant M., Cantarovich D., Giral M., Blancho G., Dreno B. and Souillou J. P. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 1998;351 (9103): 623-8
126. Dantal J. and Souillou J. P. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005;352 (13): 1371-3
127. Palestine A. G., Austin H. A., 3rd, Balow J. E., Antonovych T. T., Sabnis S. G., Preuss H. G. and Nussenblatt R. B. Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N Engl J Med* 1986;314 (20): 1293-8
128. Solez K., Vincenti F. and Filo R. S. Histopathologic findings from 2-year protocol biopsies from a U.S. multicenter kidney transplant trial comparing tacrolimus versus cyclosporine: a report of the FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1998;66 (12): 1736-40
129. Jordan M. S., Boesteanu A., Reed A. J., Petrone A. L., Holenbeck A. E., Lerman M. A., Naji A. and Caton A. J. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001;2 (4): 301-6

130. Ansari M. J. and Sayegh M. H. Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. *Kidney Int* 2004;65 (5): 1560-3
131. Strober S., Lowsky R. J., Shizuru J. A., Scandling J. D. and Millan M. T. Approaches to transplantation tolerance in humans. *Transplantation* 2004;77 (6): 932-6
132. Monaco A. P. Prospects and strategies for clinical tolerance. *Transplant Proc* 2004;36 (1): 227-31
133. Billingham R. E., Brent L. and Medawar P. B. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953;172 (4379): 603-6
134. Brent L., Brooks C. G., Medawar P. B. and Simpson E. Transplantation tolerance. *Br Med Bull* 1976;32 (2): 101-6
135. Flamand V., Donckier V., Demoor F. X., Le Moine A., Matthys P., Vanderhaeghen M. L., Tagawa Y., Iwakura Y., Billiau A., Abramowicz D. and Goldman M. CD40 ligation prevents neonatal induction of transplantation tolerance. *J Immunol* 1998;160 (10): 4666-9
136. Le Moine A., Flamand V., de Lavarelle A., Paulart F., Buonocore S., Vanderhaeghen M. L., Nagy N., Habran C., Kiss R., Abramowicz D. and Goldman M. Hypereosinophilic syndrome induced by neonatal immunization against MHC class II alloantigen: critical role of IL-4. *Eur J Immunol* 2002;32 (1): 174-81
137. Feng H. M., Glasebrook A. L., Engers H. D. and Louis J. A. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of F1 spleen cells into parental mice. *J Immunol* 1983;131 (5): 2165-9
138. Gorczynski R. M. and MacRae S. Suppression of cytotoxic response to histoincompatible cells. II. Analysis of the role of two independent T suppressor pools in maintenance of neonatally induced allograft tolerance in mice. *J Immunol* 1979;122 (3): 747-52
139. Gao Q., Rouse T. M., Kazmerzak K. and Field E. H. CD4+CD25+ cells regulate CD8 cell anergy in neonatal tolerant mice. *Transplantation* 1999;68 (12): 1891-7
140. Ildstad S. T. and Sachs D. H. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 1984;307 (5947): 168-70
141. Sykes M. Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity* 2001;14 (4): 417-24

142. Cosimi A. B. and Sachs D. H. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 2004;77 (6): 943-6
143. Perico N., Rossini M., Imberti O., Bontempelli M. and Remuzzi G. Intrathymic transplantation of donor cells allows a stabilized, incompatible renal transplant to survive indefinitely after cyclosporine withdrawal. *Exp Nephrol* 1993;1 (3): 185-9
144. Souillou J. P., Blandin F., Gunther E. and Lemoine V. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984;38 (1): 63-7.
145. Sebille F., Brouard S., Petzold T., Degauque N., Guillet M., Moreau A., Benjamin C. D. and Souillou J. P. Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation. *Transplantation* 2003;75 (2): 169-72
146. Starzl T. E. Chimerism and tolerance in transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101 Suppl 2: 14607-14
147. Wekerle T., Kurtz J., Sayegh M., Ito H., Wells A., Bensinger S., Shaffer J., Turka L. and Sykes M. Peripheral deletion after bone marrow transplantation with costimulatory blockade has features of both activation-induced cell death and passive cell death. *J Immunol* 2001;166 (4): 2311-6
148. Starzl T. E., Demetris A. J., Trucco M., Ramos H., Zeevi A., Rudert W. A., Kocova M., Ricordi C., Ildstad S. and Murase N. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992;340 (8824): 876-7
149. Iwaki Y., Starzl T. E., Yagihashi A., Taniwaki S., Abu-Elmagd K., Tzakis A., Fung J. and Todo S. Replacement of donor lymphoid tissue in small-bowel transplants. *Lancet* 1991;337 (8745): 818-9
150. Murase N., Demetris A. J., Woo J., Furuya T., Nalesnik M., Tanabe M., Todo S. and Starzl T. E. Lymphocyte traffic and graft-versus-host disease after fully allogeneic small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1991;23 (6): 3246-7
151. Starzl T. E., Murase N., Thomson A. and Demetris A. J. Liver transplants contribute to their own success. *Nat Med* 1996;2 (2): 163-5
152. Boyse E. A., Lance E. M., Carswell E. A., Cooper S. and Old L. J. Rejection of skin allografts by radiation chimaeras: selective gene action in the specification of cell surface structure. *Nature* 1970;227 (5261): 901-3
153. Schlitt H. J., Hundrieser J., Ringe B. and Pichlmayr R. Donor-type microchimerism associated with graft rejection eight years after liver transplantation. *N Engl J Med* 1994;330 (9): 646-7

154. Devlin J., Doherty D., Thomson L., Wong T., Donaldson P., Portmann B. and Williams R. Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 1998;27 (4): 926-33
155. Higuchi M., Zeng D., Shizuru J., Gworek J., Dejbakhsh-Jones S., Taniguchi M. and Strober S. Immune tolerance to combined organ and bone marrow transplants after fractionated lymphoid irradiation involves regulatory NK T cells and clonal deletion. *J Immunol* 2002;169 (10): 5564-70
156. Gershon R. K. A disquisition on suppressor T cells. *Transplant Rev* 1975;26: 170-85
157. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. and Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155 (3): 1151-64
158. Jonuleit H., Schmitt E., Stassen M., Tuettenberg A., Knop J. and Enk A. H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001;193 (11): 1285-94
159. Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T. and Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001;193 (11): 1303-10
160. Levings M. K., Sangregorio R. and Roncarolo M. G. 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 (11): 1295-302
161. Suri-Payer E., Amar A. Z., Thornton A. M. and Shevach E. M. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160 (3): 1212-8
162. Viglietta V., Baecher-Allan C., Weiner H. L. and Hafler D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199 (7): 971-9
163. Kriegel M. A., Lohmann T., Gabler C., Blank N., Kalden J. R. and Lorenz H. M. Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004;199 (9): 1285-91

164. Sakaguchi S. The origin of FOXP3-expressing CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest* 2003;112 (9): 1310-2
165. Ehrenstein M. R., Evans J. G., Singh A., Moore S., Warnes G., Isenberg D. A. and Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. *J Exp Med* 2004;200 (3): 277-85
166. Jonuleit H. and Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;171 (12): 6323-7
167. Walsh P. T., Taylor D. K. and Turka L. A. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004;114 (10): 1398-403
168. Cottrez F. and Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4<sup>+</sup>)CD(25<sup>+</sup>) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 2004;77 (1 Suppl): S12-5
169. Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22: 531-62
170. Wing K., Ekmark A., Karlsson H., Rudin A. and Suri-Payer E. Characterization of human CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology* 2002;106 (2): 190-9
171. Tsaknaris L., Spencer L., Culbertson N., Hicks K., LaTocha D., Chou Y. K., Whitham R. H., Bakke A., Jones R. E., Offner H., Bourdette D. N. and Vandenbark A. A. Functional assay for human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells reveals an age-dependent loss of suppressive activity. *J Neurosci Res* 2003;74 (2): 296-308
172. Tang Q., Henriksen K. J., Boden E. K., Tooley A. J., Ye J., Subudhi S. K., Zheng X. X., Strom T. B. and Bluestone J. A. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171 (7): 3348-52
173. Baecher-Allan C., Brown J. A., Freeman G. J. and Hafler D. A. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167 (3): 1245-53
174. McHugh R. S., Whitters M. J., Piccirillo C. A., Young D. A., Shevach E. M., Collins M. and Byrne M. C. CD4<sup>(+)</sup>CD25<sup>(+)</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16 (2): 311-23
175. Morgan M. E., van Bilsen J. H., Bakker A. M., Heemskerk B., Schilham M. W., Hartgers F. C., Elferink B. G., van der Zanden L., de Vries R. R., Huizinga T. W.,

- 
- Ottenhoff T. H. and Toes R. E. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 2005;66 (1): 13-20
176. Pae H. O., Oh G. S., Choi B. M., Chae S. C. and Chung H. T. Differential expressions of heme oxygenase-1 gene in CD25- and CD25+ subsets of human CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306 (3): 701-5
177. Choi B. M., Pae H. O., Jeong Y. R., Kim Y. M. and Chung H. T. Critical role of heme oxygenase-1 in Foxp3-mediated immune suppression. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327 (4): 1066-71
178. Thornton A. M., Donovan E. E., Piccirillo C. A. and Shevach E. M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 2004;172 (11): 6519-23
179. Thornton A. M. and Shevach E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188 (2): 287-96
180. Levings M. K., Sangregorio R., Sartirana C., Moschin A. L., Battaglia M., Orban P. C. and Roncarolo M. G. 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 (10): 1335-46
181. Stephens L. A., Mottet C., Mason D. and Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001;31 (4): 1247-54
182. Suri-Payer E. and Cantor H. Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells. *J Autoimmun* 2001;16 (2): 115-23
183. Piccirillo C. A., Letterio J. J., Thornton A. M., McHugh R. S., Mamura M., Mizuhara H. and Shevach E. M. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002;196 (2): 237-46
184. Trzonkowski P., Szmit E., Mysliwska J., Dobyszek A. and Mysliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. *Clin Immunol* 2004;112 (3): 258-67
185. Camara N. O., Seville F. and Lechler R. I. Human CD4+CD25+ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8+ T cell activation. *Eur J Immunol* 2003;33 (12): 3473-83

186. Azuma T., Takahashi T., Kunisato A., Kitamura T. and Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003;63 (15): 4516-20
187. 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. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005;66 (3): 222-30
188. Misra N., Bayry J., Lacroix-Desmazes S., Kazatchkine M. D. and Kaveri S. V. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172 (8): 4676-80
189. Chen Y., Kuchroo V. K., Inobe J., Hafler D. A. and Weiner H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265 (5176): 1237-40
190. Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J. E. and Roncarolo M. G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389 (6652): 737-42
191. Groux H. Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* 2003;75 (9 Suppl): 8S-12S
192. Foussat A., Cottrez F., Brun V., Fournier N., Breittmayer J. P. and Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003;171 (10): 5018-26
193. Hori S., Nomura T. and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299 (5609): 1057-61
194. Fontenot J. D., Gavin M. A. and Rudensky A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4 (4): 330-6
195. Wakkach A., Fournier N., Brun V., Breittmayer J. P., Cottrez F. and Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 2003;18 (5): 605-17
196. Verhasselt V., Vosters O., Beuneu C., Nicaise C., Stordeur P. and Goldman M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34 (3): 762-72

197. Davies J. D., Leong L. Y., Mellor A., Cobbold S. P. and Waldmann H. T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J Immunol* 1996;156 (10): 3602-7
198. Qin S., Cobbold S. P., Pope H., Elliott J., Kioussis D., Davies J. and Waldmann H. "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 1993;259 (5097): 974-7
199. Hall B. M., Jelbart M. E., Gurley K. E. and Dorsch S. E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells. *J Exp Med* 1985;162 (5): 1683-94
200. Taylor P. A., Noelle R. J. and Blazar B. R. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001;193 (11): 1311-8
201. Chiffolleau E., Beriou G., Dutartre P., Usal C., Souillou J. P. and Cuturi M. C. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol* 2002;168 (10): 5058-69
202. Zhang Z. X., Yang L., Young K. J., DuTemple B. and Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000;6 (7): 782-9
203. Hara M., Kingsley C. I., Niimi M., Read S., Turvey S. E., Bushell A. R., Morris P. J., Powrie F. and Wood K. J. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001;166 (6): 3789-96
204. Graca L., Cobbold S. P. and Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002;195 (12): 1641-6
205. Benghiat F. S., Graca L., Braun M. Y., Detienne S., Moore F., Buonocore S., Flamand V., Waldmann H., Goldman M. and Le Moine A. Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. *Transplantation* 2005;79 (6): 648-54
206. Salama A. D., Najafian N., Clarkson M. R., Harmon W. E. and Sayegh M. H. Regulatory CD25+ T cells in human kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (6): 1643-51
207. Jiang S., Camara N., Lombardi G. and Lechler R. I. Induction of allopeptide-specific human CD4+CD25+ regulatory T cells ex vivo. *Blood* 2003;102 (6): 2180-6

208. Game D. S., Hernandez-Fuentes M. P., Chaudhry A. N. and Lechler R. I. CD4+CD25+ regulatory T cells do not significantly contribute to direct pathway hyporesponsiveness in stable renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14 (6): 1652-61
209. Koshiba T., Kitade H., Van Damme B., Giulietti A., Overbergh L., Mathieu C., Waer M. and Pirenne J. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation* 2003;76 (3): 588-96
210. Pirenne J., Kitade H., Kawai M., Koshiba T., Van Damme B., Mathieu C. and Waer M. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 2005;79 (3 Suppl): S25-7
211. Liu Z., Tugulea S., Cortesini R. and Suciu-Foca N. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* 1998;10 (6): 775-83
212. Cortesini R., LeMaoult J., Ciubotariu R. and Cortesini N. S. CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev* 2001;182: 201-6
213. 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 Suciu-Foca N. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002;3 (3): 237-43
214. Ciubotariu R., Colovai A. I., Pennesi G., Liu Z., Smith D., Berlocco P., Cortesini R. and Suciu-Foca N. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J Immunol* 1998;161 (10): 5193-202
215. Jiang H. and Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114 (9): 1198-208
216. Manavalan J. S., Kim-Schulze S., Scotto L., Naiyer A. J., Vlad G., Colombo P. C., Marboe C., Mancini D., Cortesini R. and Suciu-Foca N. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 2004;16 (8): 1055-68
217. Colovai A. I., Mirza M., Vlad G., Wang S., Ho E., Cortesini R. and Suciu-Foca N. Regulatory CD8+CD28- T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 2003;64 (1): 31-7

218. Liu J., Liu Z., Witkowski P., Vlad G., Manavalan J. S., Scotto L., Kim-Schulze S., Cortesini R., Hardy M. A. and Suciu-Foca N. Rat CD8<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transpl Immunol* 2004;13 (4): 239-47
219. Kawamura H., Kameyama H., Kosaka T., Kuwahara O., Bannai M., Kawamura T., Watanabe H. and Abo T. Association of CD8<sup>+</sup> natural killer T cells in the liver with neonatal tolerance phenomenon. *Transplantation* 2002;73 (6): 978-92
220. Seino K. I., Fukao K., Muramoto K., Yanagisawa K., Takada Y., Kakuta S., Iwakura Y., Van Kaer L., Takeda K., Nakayama T., Taniguchi M., Bashuda H., Yagita H. and Okumura K. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98 (5): 2577-81
221. Araki M., Kondo T., Gumperz J. E., Brenner M. B., Miyake S. and Yamamura T. Th2 bias of CD4<sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 2003;15 (2): 279-88
222. 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., Strominger J. L. and Hafler D. A. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998;391 (6663): 177-81
223. Graca L., Thompson S., Lin C. Y., Adams E., Cobbold S. P. and Waldmann H. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *J Immunol* 2002;168 (11): 5558-65
224. Fischer K., Voelkl S., Heymann J., Przybylski G. K., Mondal K., Laumer M., Kunz-Schughart L., Schmidt C. A., Andreesen R. and Mackensen A. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta<sup>+</sup> CD4(-)CD8<sup>-</sup> double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005;105 (7): 2828-35
225. Young K. J., Yang L., Phillips M. J. and Zhang L. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 2002;100 (9): 3408-14
226. Chen W., Ford M. S., Young K. J. and Zhang L. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc* 2003;35 (7): 2479-80
227. Reischig T., Jindra P., Mares J., Cechura M., Svecova M., Hes O., Opatrny K., Jr. and Treska V. Valacyclovir for cytomegalovirus prophylaxis reduces the risk of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 2005;79 (3): 317-24

228. Nett P. C., Heisey D. M., Fernandez L. A., Sollinger H. W. and Pirsch J. D. Association of cytomegalovirus disease and acute rejection with graft loss in kidney transplantation. *Transplantation* 2004;78 (7): 1036-41
229. Myburgh J. A., Smit J. A., Pieterz G. A., Ling S., Sandrin M. S. and McKenzie I. F. Tolerance in baboon kidney transplantation with total lymphoid irradiation (TLI) and anti-CD3/CD4-idarubicin conjugates. *Transplantation* 2001;72 (6): 1150-2
230. Knechtle S. J., Vargo D., Fechner J., Zhai Y., Wang J., Hanaway M. J., Scharff J., Hu H., Knapp L., Watkins D. and Neville D. M., Jr. FN18-CRM9 immunotoxin promotes tolerance in primate renal allografts. *Transplantation* 1997;63 (1): 1-6
231. Armstrong N., Buckley P., Oberley T., Fechner J., Jr., Dong Y., Hong X., Kirk A., Neville D., Jr. and Knechtle S. Analysis of primate renal allografts after T-cell depletion with anti-CD3-CRM9. *Transplantation* 1998;66 (1): 5-13
232. 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. Durable donor-specific T and B cell tolerance in rhesus macaques induced with peritransplantation anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin: absence of chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2000;69 (12): 2497-503
233. Thomas J. M., Hubbard W. J., Sooudi S. K. and Thomas F. T. STEALTH matters: a novel paradigm of durable primate allograft tolerance. *Immunol Rev* 2001;183: 223-33
234. Jonker M., Ringers J., Ossevoort M. A., Slingerland W., van den Hout Y., Haanstra K., Wubben J., Kuhn E., Friend P. and Calne R. Long-term kidney graft survival by delayed T cell ablative treatment in rhesus monkeys. *Transplantation* 2002;73 (6): 874-80
235. Levin B., Hoppe R. T., Collins G., Miller E., Waer M., Bieber C., Girinsky T. and Strober S. Treatment of cadaveric renal transplant recipients with total lymphoid irradiation, antithymocyte globulin, and low-dose prednisone. *Lancet* 1985;2 (8468): 1321-5
236. Chow D., Saper V. and Strober S. Renal transplant patients treated with total lymphoid irradiation show specific unresponsiveness to donor antigens the mixed leukocyte reaction (MLR). *J Immunol* 1987;138 (11): 3746-50
237. Saper V., Chow D., Engleman E. D., Hoppe R. T., Levin B., Collins G. and Strober S. Clinical and immunological studies of cadaveric renal transplant

=

- recipients given total-lymphoid irradiation and maintained on low-dose prednisone. *Transplantation* 1988;45 (3): 540-6
238. Strober S., Dhillon M., Schubert M., Holm B., Engleman E., Benike C., Hoppe R., Sibley R., Myburgh J. A., Collins G. and et al. Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *N Engl J Med* 1989;321 (1): 28-33
239. 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. Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation* 2003;76 (1): 120-9
240. Kirk A. D., Tadaki D. K., Celniker A., Batty D. S., Berning J. D., Colonna J. O., Cruzata F., Elster E. A., Gray G. S., Kampen R. L., Patterson N. B., Szklut P., Swanson J., Xu H. and Harlan D. M. Induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80 and CD86 delays the onset of acute renal allograft rejection in non-human primates. *Transplantation* 2001;72 (3): 377-84
241. 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., Swanson S. J., Tadaki D. K., TenHoor C. N., White L., Knechtle S. J. and Harlan D. M. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 1999;5 (6): 686-93
242. Pierson R. N., 3rd, Chang A. C., Blum M. G., Blair K. S., Scott M. A., Atkinson J. B., Collins B. J., Zhang J. P., Thomas D. W., Burkly L. C. and Miller G. G. Prolongation of primate cardiac allograft survival by treatment with ANTI-CD40 ligand (CD154) antibody. *Transplantation* 1999;68 (11): 1800-5
243. Kenyon N. S., Chatzipetrou M., Masetti M., Ranuncoli A., Oliveira M., Wagner J. L., Kirk A. D., Harlan D. M., Burkly L. C. and Ricordi C. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96 (14): 8132-7
244. 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. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94 (16): 8789-94

245. 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., Swanson S. J., Harlan D. M. and Kirk A. D. Combination induction therapy with monoclonal antibodies specific for CD80, CD86, and CD154 in nonhuman primate renal transplantation. *Transplantation* 2002;74 (10): 1365-9
246. Pearson T. C., Trambley J., Odom K., Anderson D. C., Cowan S., Bray R., Lin A., Hollenbaugh D., Aruffo A., Siadak A. W., Strobert E., Hennigar R. and Larsen C. P. Anti-CD40 therapy extends renal allograft survival in rhesus macaques. *Transplantation* 2002;74 (7): 933-40
247. Knechtle S. J., Hamawy M. M., Hu H., Fechner J. H., Jr. and Cho C. S. Tolerance and near-tolerance strategies in monkeys and their application to human renal transplantation. *Immunol Rev* 2001;183: 205-13
248. Elster E. A., Xu H., Tadaki D. K., Montgomery S., Burkly L. C., Berning J. D., Baumgartner R. E., Cruzata F., Marx R., Harlan D. M. and Kirk A. D. Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 2001;72 (9): 1473-8
249. Ringers J., Haanstra K. G., Kroczeck R. A., Kliem K., Kuhn E. M., Wubben J., Ossevoort M. A., Volk H. D. and Jonker M. Blockade of CD40-CD154 at the time of donor-specific blood transfusion does not lead to prolonged kidney allograft survival in nonhuman primates. *Transplantation* 2002;73 (6): 862-6
250. Thomas J. M., Neville D. M., Contreras J. L., Eckhoff D. E., Meng G., Lobashevsky A. L., Wang P. X., Huang Z. Q., Verbanac K. M., Haisch C. E. and Thomas F. T. Preclinical studies of allograft tolerance in rhesus monkeys: a novel anti-CD3-immunotoxin given peritransplant with donor bone marrow induces operational tolerance to kidney allografts. *Transplantation* 1997;64 (1): 124-35
251. Zeng D., Ready A., Huie P., Hayamizu K., Holm B., Yin D., Sibley R. K. and Strober S. Mechanisms of tolerance to rat heart allografts using posttransplant TLI. Changes in cytokine expression. *Transplantation* 1996;62 (4): 510-7
252. Zan-Bar I., Slavin S. and Strober S. Induction and mechanism of tolerance to bovine serum albumin in mice given total lymphoid irradiation (TLI). *J Immunol* 1978;121 (4): 1400-4
253. Slavin S., Strober S., Fuks Z. and Kaplan H. S. Induction of specific tissue transplantation tolerance using fractionated total lymphoid irradiation in adult mice:

- 
- long-term survival of allogeneic bone marrow and skin grafts. *J Exp Med* 1977;146 (1): 34-48
254. Slavin S., Fuks Z., Kaplan H. S. and Strober S. Transplantation of allogeneic bone marrow without graft-versus-host disease using total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 1978;147 (4): 963-72
255. Asiedu C. K., Dong S. S., Lobashevsky A., Jenkins S. M. and Thomas J. M. Tolerance induced by anti-CD3 immunotoxin plus 15-deoxyspergualin associates with donor-specific indirect pathway unresponsiveness. *Cell Immunol* 2003;223 (2): 103-12
256. Strober S., Benike C., Krishnaswamy S., Engleman E. G. and Grumet F. C. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 2000;69 (8): 1549-54
257. Aukrust P., Damas J. K. and Solum N. O. Soluble CD40 ligand and platelets: self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation? *J Am Coll Cardiol* 2004;43 (12): 2326-8
258. Henn V., Steinbach S., Buchner K., Presek P. and Krocze R. A. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001;98 (4): 1047-54
259. Vanhove B., Laflamme G., Coulon F., Mougin M., Vusio P., Haspot F., Tiollier J. and Souillou J. P. Selective blockade of CD28 and not CTLA-4 with a single-chain Fv-alpha1-antitrypsin fusion antibody. *Blood* 2003;102 (2): 564-70
260. Bushell A., Karim M., Kingsley C. I. and Wood K. J. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003;76 (3): 449-55
261. Bean M. A., Mickelson E., Yanagida J., Ishioka S., Brannen G. E. and Hansen J. A. Suppressed antidonor MLC responses in renal transplant candidates conditioned with donor-specific transfusions that carry the recipient's noninherited maternal HLA haplotype. *Transplantation* 1990;49 (2): 382-6
262. Hadley G. A., Anderson C. B. and Mohanakumar T. Selective loss of functional antidonor cytolytic T cell precursors following donor-specific blood transfusions in long-term renal allograft recipients. *Transplantation* 1992;54 (2): 333-7

263. van Twuyver E., Mooijaart R. J., ten Berge I. J., van der Horst A. R., Wilmink J. M., Kast W. M., Melief C. J. and de Waal L. P. Pretransplantation blood transfusion revisited. *N Engl J Med* 1991;325 (17): 1210-3
264. Baatard R., Dantal J., Hourmant M., Cantarovich D., Cesbron A., Bignon J. D. and Souillou J. P. Effect of the number of pregraft blood transfusions in kidney graft recipients treated with bioreagents and cyclosporin A. *Transpl Int* 1991;4 (4): 235-8
265. Alexander J. W., Light J. A., Donaldson L. A., Delmonico F. L., Diethelm A. G., Wilkinson A., Rosenthal J. T., Thistlethwaite J. R., Hunsicker L. G., Matas A. J., First M. R., Reinsmoen N. L. and Rose S. M. Evaluation of pre- and posttransplant donor-specific transfusion/cyclosporine A in non-HLA identical living donor kidney transplant recipients. Cooperative Clinical Trials in Transplantation Research Group. *Transplantation* 1999;68 (8): 1117-24
266. Satoh S., Sugimura J., Omori S., Seino K. and Fujizuka I. Long-term graft survival with or without donor-specific transfusion in cyclosporine era in one haplo-identical living-related renal transplant recipients beyond the first year: a 19-year experience. *Tohoku J Exp Med* 2002;197 (4): 201-7
267. Trivedi H. L., Shah V. R., Vanikar A. V., Gera D., Shah P. R., Trivedi V. B., Khemchandani S., Mehta A., Dalal S. S., Shah S. A., Shah T. P. and Visana K. V. High-dose peripheral blood stem cell infusion: a strategy to induce donor-specific hyporesponsiveness to allografts in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2002;6 (1): 63-8
268. Kawai T., Cosimi A. B., Colvin R. B., Powelson J., Eason J., Kozlowski T., Sykes M., Monroy R., Tanaka M. and Sachs D. H. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 1995;59 (2): 256-62
269. Kawai T., Cosimi A. B., Wee S. L., Houser S., Andrews D., Sogawa H., Phelan J., Boskovic S., Nadazdin O., Abrahamian G., Colvin R. B., Sach D. H. and Madsen J. C. Effect of mixed hematopoietic chimerism on cardiac allograft survival in cynomolgus monkeys. *Transplantation* 2002;73 (11): 1757-64
270. Thomas J., Carver M., Cunningham P., Park K., Gonder J. and Thomas F. Promotion of incompatible allograft acceptance in rhesus monkeys given posttransplant antithymocyte globulin and donor bone marrow. I. In vivo parameters and immunohistologic evidence suggesting microchimerism. *Transplantation* 1987;43 (3): 332-8

271. Thomas J., Alqaisi M., Cunningham P., Carver M., Rebellato L., Gross U., Patselas T., Araneda D. and Thomas F. The development of a posttransplant TLI treatment strategy that promotes organ allograft acceptance without chronic immunosuppression. *Transplantation* 1992;53 (2): 247-58
272. Spitzer T. R., Delmonico F., Tolkoff-Rubin N., McAfee S., Sackstein R., Saidman S., Colby C., Sykes M., Sachs D. H. and Cosimi A. B. Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism. *Transplantation* 1999;68 (4): 480-4
273. Buhler L. H., Spitzer T. R., Sykes M., Sachs D. H., Delmonico F. L., Tolkoff-Rubin N., Saidman S. L., Sackstein R., McAfee S., Dey B., Colby C. and Cosimi A. B. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation* 2002;74 (10): 1405-9
274. Sayegh M. H., Fine N. A., Smith J. L., Rennke H. G., Milford E. L. and Tilney N. L. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors. *Ann Intern Med* 1991;114 (11): 954-5
275. Jacobsen N., Taaning E., Ladefoged J., Kristensen J. K. and Pedersen F. K. Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor. *Lancet* 1994;343 (8900): 800
276. Helg C., Chapuis B., Bolle J. F., Morel P., Salomon D., Roux E., Antonioli V., Jeannet M. and Leski M. Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1994;58 (12): 1420-2
277. Butcher J. A., Hariharan S., Adams M. B., Johnson C. P., Roza A. M. and Cohen E. P. Renal transplantation for end-stage renal disease following bone marrow transplantation: a report of six cases, with and without immunosuppression. *Clin Transplant* 1999;13 (4): 330-5
278. Sellers M. T., Deierhoi M. H., Curtis J. J., Gaston R. S., Julian B. A., Lanier D. C., Jr. and Diethelm A. G. Tolerance in renal transplantation after allogeneic bone marrow transplantation-6-year follow-up. *Transplantation* 2001;71 (11): 1681-3
279. Hamawi K., De Magalhaes-Silverman M. and Bertolatus J. A. Outcomes of renal transplantation following bone marrow transplantation. *Am J Transplant* 2003;3 (3): 301-5

280. Ravanan R., Dudley C. R., Smith R. M., Burton C. J., Lear P. A. and Unsworth D. J. Use of skin grafting to demonstrate tolerance before kidney transplantation without immunosuppression in the recipient of a previous bone marrow transplant. *Transplantation* 2005;79 (3): 375-6
281. Gajewski J. L., Ippoliti C., Ma Y. and Champlin R. Discontinuation of immunosuppression for prevention of kidney graft rejection after receiving a bone marrow transplant from the same HLA identical sibling donor. *Am J Hematol* 2002;71 (4): 311-3
282. Matthes-Martin S., Peters C., Konigsrainer A., Fritsch G., Lion T., Heitger A., Kapelari K., Kronberger M., Offner F., Wrba F., Margreiter R. and Gadner H. Successful stem cell transplantation following orthotopic liver transplantation from the same haploidentical family donor in a girl with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 2000;96 (12): 3997-9
283. 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. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation* 2002;73 (9): 1386-91
284. Matthews J. B., Ramos E. and Bluestone J. A. Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant* 2003;3 (7): 794-803
285. Ciancio G., Miller J., Garcia-Morales R. O., Carreno M., Burke G. W., 3rd, Roth D., Kupin W., Tzakis A. G., Ricordi C., Rosen A., Fuller L. and Esquenazi V. Six-year clinical effect of donor bone marrow infusions in renal transplant patients. *Transplantation* 2001;71 (7): 827-35
286. Ciancio G., Burke G. W., Moon J., Garcia-Morales R., Rosen A., Esquenazi V., Mathew J., Jin Y. and Miller J. Donor bone marrow infusion in deceased and living donor renal transplantation. *Yonsei Med J* 2004;45 (6): 998-1003
287. Kadry Z., Mullhaupt B., Renner E. L., Bauerfeind P., Schanz U., Pestalozzi B. C., Studer G., Zinkernagel R. and Clavien P. A. Living donor liver transplantation and tolerance: a potential strategy in cholangiocarcinoma. *Transplantation* 2003;76 (6): 1003-6
288. Donckier V., Troisi R., Tounougou M., Colle I., Van Vlierberghe H., Jacquy C., Martiat P., Stordeur P., Zhou L., Boon N., Lambermont M., Schandene L., Van Laethem J. L., Noens L., Gelin M., de Hemptinne B. and Goldman M. Donor stem

=

- cell infusion after non-myeloablative conditioning for tolerance induction to HLA mismatched adult living-donor liver graft. *Transpl Immunol* 2004;13 (2): 139-46
289. Ringden O., Soderdahl G., Mattsson J., Uzunel M., Remberger M., Hentschke P., Hagglund H., Sparrelid E., Elmhorn-Rosenborg A., Duraj F., Zetterquist H. and Ericzon B. G. Transplantation of autologous and allogeneic bone marrow with liver from a cadaveric donor for primary liver cancer. *Transplantation* 2000;69 (10): 2043-8
290. Calne R. Y. Prope tolerance: the future of organ transplantation--from the laboratory to the clinic. *Transplantation* 2004;77 (6): 930-2
291. Calne R., Friend P., Moffatt S., Bradley A., Hale G., Firth J., Bradley J., Smith K. and Waldmann H. Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* 1998;351 (9117): 1701-2
292. Knechtle S. J., Pirsch J. D., H. Fechner J J., Becker B. N., Friedl A., Colvin R. B., Lebeck L. K., Chin L. T., Becker Y. T., Odorico J. S., D'Alessandro A. M., Kalayoglu M., Hamawy M. M., Hu H., Bloom D. D. and Sollinger H. W. Campath-1H induction plus rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant* 2003;3 (6): 722-30
293. Swanson S. J., Hale D. A., Mannon R. B., Kleiner D. E., Cendales L. C., Chamberlain C. E., Polly S. M., Harlan D. M. and Kirk A. D. Kidney transplantation with rabbit antithymocyte globulin induction and sirolimus monotherapy. *Lancet* 2002;360 (9346): 1662-4
294. Starzl T. E., Murase N., Abu-Elmagd K., Gray E. A., Shapiro R., Eghtesad B., Corry R. J., Jordan M. L., Fontes P., Gayowski T., Bond G., Scantlebury V. P., Potdar S., Randhawa P., Wu T., Zeevi A., Nalesnik M. A., Woodward J., Marcos A., Trucco M., Demetris A. J. and Fung J. J. Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 2003;361 (9368): 1502-10
295. Shapiro R., Jordan M. L., Basu A., Scantlebury V., Potdar S., Tan H. P., Gray E. A., Randhawa P. S., Murase N., Zeevi A., Demetris A. J., Woodward J., Marcos A., Fung J. J. and Starzl T. E. Kidney transplantation under a tolerogenic regimen of recipient pretreatment and low-dose postoperative immunosuppression with subsequent weaning. *Ann Surg* 2003;238 (4): 520-5; discussion 525-7

296. Kamada N., Brons G. and Davies H. S. Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation* 1980;29 (5): 429-31
297. Zimmermann F. A., Davies H. S., Knoll P. P., Gokel J. M. and Schmidt T. Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation* 1984;37 (4): 406-10
298. Qian S., Demetris A. J., Murase N., Rao A. S., Fung J. J. and Starzl T. E. Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology* 1994;19 (4): 916-24
299. Calne R. Y., White H. J., Yoffa D. E., Binns R. M., Maginn R. R., Herbertson R. M., Millard P. R., Molina V. P. and Davis D. R. Prolonged survival of liver transplants in the pig. *Br Med J* 1967;4 (580): 645-8
300. 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. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969;223 (205): 472-6
301. Bishop G. A. and McCaughan G. W. Immune activation is required for the induction of liver allograft tolerance: implications for immunosuppressive therapy. *Liver Transpl* 2001;7 (3): 161-72
302. Takatsuki M., Uemoto S., Inomata Y., Egawa H., Kiuchi T., Fujita S., Hayashi M., Kanematsu T. and Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 2001;72 (3): 449-54
303. Starzl T. E., Murase N., Demetris A. J., Trucco M., Abu-Elmagd K., Gray E. A., Eghtesad B., Shapiro R., Marcos A. and Fung J. J. Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. *Transplantation* 2004;77 (6): 926-9
304. Zoller K. M., Cho S. I., Cohen J. J. and Harrington J. T. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. *Kidney Int* 1980;18 (1): 110-4
305. Uehling D. T., Hussey J. L., Weinstein A. B., Wank R. and Bach F. H. Cessation of immunosuppression after renal transplantation. *Surgery* 1976;79 (3): 278-82
306. Owens M. L., Maxwell J. G., Goodnight J. and Wolcott M. W. Discontinuance of immunosuppression in renal transplant patients. *Arch Surg* 1975;110 (12): 1450-1
307. Burlingham W. J., Grailer A. P., Fechner J. H., Jr., Kusaka S., Trucco M., Kocova M., Belzer F. O. and Sollinger H. W. Microchimerism linked to cytotoxic T

=

- lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. *Transplantation* 1995;59 (8): 1147-55
308. Christensen L. L., Grunnet N., Rudiger N., Moller B. and Birkeland S. A. Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. *Tissue Antigens* 1998;51 (6): 637-44
309. Fischer T., Schobel H. and Barenbrock M. Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;70 (2): 217-9
310. VanBuskirk A. M., Burlingham W. J., Jankowska-Gan E., Chin T., Kusaka S., Geissler F., Pelletier R. P. and Orosz C. G. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest* 2000;106 (1): 145-55
311. 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 K. J. and Tanaka K. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4 (12): 2118-25
312. Brouard S., Dupont A., Giral M., Louis S., Lair D., Braudeau C., Degauque N., Moizant F., Pallier A., Ruiz C., Guillet M., Laplaud D. and Souillou J. P. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 2005;5 (2): 330-40
313. Alvarez C. M., Opelz G., Giraldo M. C., Pelzl S., Renner F., Weimer R., Schmidt J., Arbelaez M., Garcia L. F. and Susal C. Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant* 2005;5 (4 Pt 1): 746-56
314. Ciubotariu R., Vasilescu R., Ho E., Cinti P., Cancedda C., Poli L., Late M., Liu Z., Berloco P., Cortesini R. and Suciu-Foca Cortesini N. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum Immunol* 2001;62 (1): 15-20
315. Cortesini R., Renna-Molajoni E., Cinti P., Pretagostini R., Ho E., Rossi P. and Suciu-Foca Cortesini N. Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. *Hum Immunol* 2002;63 (11): 1010-8
316. Fallarino F., Grohmann U., Hwang K. W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M. L., Fioretti M. C., Alegre M. L. and Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4 (12): 1206-12

- 
- =
317. Sauve D., Baratin M., Leduc C., Bonin K. and Daniel C. Alloantibody production is regulated by CD4+ T cells' alloreactive pathway, rather than precursor frequency or Th1/Th2 differentiation. *Am J Transplant* 2004;4 (8): 1237-45
318. Le Moine A., Goldman M. and Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. *Transplantation*. 2002;73 (9): 1373-81
319. Terasaki P. I. and Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4 (3): 438-43
320. Souillou J. P., Bignon J. D., Peyrat M. A., Guimbretiere J. and Guenel J. Systematic transfusion in hemodialyzed patients awaiting grafts: kinetics of anti-t and b lymphocyte immunization and its incidence on graft function. *Transplantation* 1980;30 (4): 285-9

=

# **ANNEXES**

## ***Contribution à l'étude de la tolérance en allotransplantation***

**Mots-clés** : Tolérance, Allotransplantation, Cellules dendritiques, Vaccination

### **Résumé**

L'allotransplantation, qui s'est considérablement développée au cours des dernières décennies, implique l'administration d'immunosuppresseurs au long cours, source de nombreuses complications. L'obtention d'une tolérance spécifique permettrait de réduire ces risques et améliorerait la qualité et la durée de vie des patients transplantés. Cette thèse, en deux parties, aborde la tolérance en allotransplantation. Tout d'abord, la déplétion des greffons en cellules dendritiques du donneur, principales responsables de l'allorecognition directe, est analysée dans un modèle animal d'allogreffe où leur présence est indispensable à l'induction de tolérance. Nous avons ensuite étudié les caractéristiques cliniques de quelques patients greffés rénaux présentant une tolérance opérationnelle, ainsi que leur réponse à une stimulation immune connue (la vaccination anti-grippale), afin de préciser si leur statut immunologique correspond à une immunodépression globale ou une tolérance spécifique.

## **Contribution to tolerance study in allotransplantation**

**Key-words** : Tolerance, Allotransplantation, Dendritic cell, Vaccination

### **Summary**

Allotransplantation has notably been developed during last decades but implies immunosuppressive treatment, leading to many complications. Specific tolerance could reduce these risks and allow a better survival in transplanted patients. This thesis is composed of two parts dealing with tolerance in allotransplantation. In the first part, graft donor dendritic cell (major source of direct allorecognition) depletion was analysed in an animal allograft model where they are necessary to tolerance induction. Secondly, we studied clinical characteristics of few operational tolerant kidney recipients and their response to a known stimulation (influenza vaccination) to determine if their immunological status corresponds to a global immunodeficiency or to a specific tolerance.