Université de Nantes

Faculté de Médecine

ROLE DES LYMPHOCYTES LAG-3 POSITIFS EN TRANSPLANTATION

Thèse de Doctorat

Ecole Doctorale : Biologie Santé

Discipline : Médecine

Spécialité : Immunologie

Présentée

Et soutenue publiquement par

Thomas HAUDEBOURG

Le 2 juillet 2009, devant le jury ci-dessous

Président	Gilles BLANCHO, PUPH, Nantes
Rapporteurs	Alain LE MOINE, Professeur, Bruxelles
	Brigitte LE MAUFF, PU-PH, Caen
Examinateur	Frédéric TRIEBEL, Professeur, Châtenay Malabry
	Florence VILLEMAIN, Néphrologue, Angers
	Gilles BLANCHO, PUPH, Nantes
Directeur de thèse	Bernard VANHOVE, DR, Nantes

Table des matières

Abréviations **4**
Liste des figures **6**
Liste des tableaux **7**
Avant-propos **8**
Introduction **10**
La transplantation **11**
I. Les différents types de transplantation 11
- Xénogreffe 11
- Isogreffe 11
- Autogreffe 11
- Allogreffe 12

II. L'alloreconnaissance 12
1. Alloreconnaissance directe 13
2. Alloreconnaissance indirecte 16
3. Voie semi-directe 17

III. Le rejet d'allogreffe 19
1. Rejet hyper aigu 19
2. Rejet vasculaire aigu 19
3. Rejet cellulaire aigu 20
4. Dysfonction chronique de l'allogreffe (CAD) 21

Différentes sous populations T **23**
I. La différenciation 23
1. Les lymphocytes Th1 et Th2 23
2. Le lymphocyte Th17 24
3. Le lymphocyte T régulateur 26

II. Implications en transplantation 27
1. Rôle des Th1 et Th2 27
2. Rôle des Th17 28
3. Rôle des T régulateurs 30
4. La régulation 31

Utilisation des anticorps monoclonaux cytotoxiques en transplantation **33**
I. Mécanismes d'action des anticorps déplétants 34
II. Reconstitution des cellules T et prolifération homéostatique 35
III. Déplétion de toutes les cellules T 36
1. Immunoglobulines anti lymphocytaires 36
2. Anti CD52 (Campath-1) 37
3. Anti-CD3 38
4. Autres cellules cibles pan-T (TCR αβ, CD2, CD45, CD7…) 39

V. Cibler les sous populations T 40
1. CD4 40
2. CD8 41
3. CD28 42

VI. Cibler les marqueurs d'activation des lymphocytes T 43

1. CD154 (CD40Ligand) 43
2. IL2Ra/CD25 44
3. Les isoformes CD45 45
VII. Conclusion 47
Lymphocyte activated gene 3 : LAG-3 49
I. La molécule 49
1. Gène 49
2. Expression 50
3. Interaction 52
II. Les différents rôles de LAG-3 52
1. Un rôle d'activation 52
2. Un rôle de régulation 53
3. Un rôle de marqueur 55
III. LAG-3Ig 56
Résultats 59
I. Etude rongeur : article n° 1 60
Perspectives et discussions 67
II. Action d'anticorps anti-LAG-3 sur l'hypersensibilité retardée dans un modèle pré-clinique sur primate: article 2 (article correspondant en préparation) ... 74
Introduction 74
Matériels et méthodes 76
Discussion et perspectives 86
Conclusion 90
Bibliographie 93
Annexes 115
Annexe I : Brevet EPO N° 07290545.8-2406 116
Annexe II: collaboration Dugast AS 118
Annexe III: Communications 128

Abréviations

CAD: Chronic Allograft Dysfonction
CD40L: CD40 ligand
LAG-3: Lymphocyte Activated Gene-3
DTH: Delayed Type Hypersensitvity
IDR: Intra Dermal Reaction
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
TCR: T cell receptor
DC: Dendritic Cell
Gal: Galactosidase
ADCC : Antibody Dependent Cellular Cytotoxycity
HLA: Human Leucocyte Antigen
IL: Interleukine
IFN: Interféron
TNF: Tumor Necrosis Factor
NO: Oxyde Nitrique
FIAT: Fibrose Intersticielle et Atrophie Tubulaire
GA: Glomerulopathie d'Allogreffe
Th: T helper
Treg: T regulatrice
Ig: Immunoglobuline
STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF: Transforming Growth Factor
ROR: Retinoid related Orphan Receptor
IRF: Interferon Regulatory Factor
IRAK: Interleukin Receptor Associated Kinases
imDC: Immature Dendritic Cell
CTL: Cytotoxic T Lymphocyte
ARNm: Acide Ribonucleique messager
PGE2: Prostaglandin E2
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP: Monocyte Chemoattractant Protein
Gro: Growth related protein
AMP: Adénosine Monophosphate
CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
MLR: Mixed Lymphocyte Reaction
SIRS: Systemic Inflamatory Response Syndrom
ATG: Anti Thymocyte Globulin
MOG: Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
CsA: Cyclosporine A
FoxP3: Forkhead box P3
GVHD: Graft Versus Host Disease

Abréviations

MMF: Mycophenolate Mofétil
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell
NK: Natural Killer
NKT: Lymphocytes Natural Killer T
PD-1: Programmed Death 1

Liste des figures

Figure 1: alloreconnaissance directe 14
Figure 2 alloreconnaissance indirecte 17
Figure 3: alloreconnaissance semi-directe 18
Figure 4 : différenciation et régulation des T $CD4^+$ 32
Figure 5 : schema de LAG-3 51
Figure 6: courbe de survie de rat DSBT avec ou sans traitement anti-LAG-3 70
Figure 7 : Anti-LAG-3 dépléte les cellules régulatrices dans la DSBT 71
Figure 8: déplétion des cellules LAG-3 positives dans un modèle de greffe de rein anti-CD28 71
Figure 9: Suivi de l'urée et de la créatinine chez un animal tolérant greffé rénal traité par l'anticorps anti-LAG-3 72
Figure 10: courbe de survie du greffon dans un modèle anti-CD28+CsA traités anti-LAG-3 73
Figure 11 : cross réactivité de l'anticorps anti-LAG-3 80
Figure 12 : effet de l'anticorps anti-LAG-3 en MLR 81
Figure 13: Courbe de pharmcocinétique de l'anticorps anti-LAG-3 82
Figure 14 Elispot IFNγ de contrôle d'immunisation 83
Figure 15: Mesure de l'érythème 84
Figure 16 Immunohistochimie des biopsies des érythèmes à J4 85
Figure 17: Mesure des érythèmes 87
Figure 18: courbe de survie des animaux transplantés rénaux traités avec l'IMP731. .. 88
Figure 19: Concentration d'anticorps IMP731 dans l'animal greffé 88

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps déplétants les cellules T et leurs effets en transplantation. 48

Avant-propos

En cas de défaillance terminale d'un organe vital, la transplantation est un traitement de choix permettant la restauration de la fonction de l'organe, l'amélioration notable de la qualité de vie ainsi que le pronostic à long terme. Aujourd'hui, plus de 275 000 européens vivent avec un organe transplanté. L'augmentation du nombre de pathologies chroniques touchant les organes vitaux (reins, cœur, poumons, foie ou pancréas), ainsi que le vieillissement de la population tendent à faire augmenter le besoin en terme de greffons.

En France, le nombre de transplantations annuelles a augmenté de 38% depuis l'année 2000. En 2006, 13687 personnes étaient sur la liste d'attente d'une transplantation d'organe et 222 patients sont décédés faute de greffon (http://www.dondorganes.fr/). La baisse importante de la mortalité accidentelle et de la mortalité par accident vasculaire cérébral, conduit à une diminution du nombre total de donneurs potentiels. Il est indéniable que la situation de pénurie provoquant une augmentation de 4% par an du nombre de personnes inscrites sur la liste d'attente est installée durablement.

Le problème médical créé par cette pénurie vient s'ajouter à celui créé par le rejet, qui est le principal obstacle rencontré malgré un acte chirurgical parfaitement maîtrisé. Une transplantation d'organe implique l'administration de traitements immunosuppresseurs au long cours afin d'enrayer le rejet aigu. Cependant, ces traitements ne préviennent pas l'apparition et le développement d'une dysfonction chronique du greffon [1] et sont potentiellement toxiques. Ces médicaments favorisent aussi l'apparition d'infections opportunistes virales, bactériennes ou fongiques, et surtout de cancers viro-induits dont l'incidence est significativement augmentée après transplantation d'organes [2]. La recherche en transplantation est donc essentielle afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes immunitaires intervenant lors d'une transplantation, mais aussi pour développer de nouveaux traitements permettant de protéger le greffon tout en diminuant les effets secondaires. Ainsi le développement de nouveaux traitements immunosuppresseurs reste un axe majeur de recherche.

Avant propos

Dans cette thèse, je vais tout d'abord présenter les généralités de la transplantation (types de greffes, rejet, alloreconnaissances). Je me pencherai ensuite sur les cellules impliquées en transplantation. Je développerai ensuite une des stratégies d'immunosuppression, la déplétion par des anticorps monoclonaux, en détaillant pour finir une cible potentielle, LAG-3 (Lymphocyte activated gene-3). Il s'agit d'un antigène d'activation spécifique des cellules T, candidat cible pour des anticorps thérapeutiques. Enfin, je présenterai les résultats expérimentaux obtenus avec des anticorps anti LAG-3 dans un modèle de greffe cardiaque chez le rat et un modèle de DTH chez le babouin. En annexe sera rajoutée la liste des publications et communications effectuées au cours de ma thèse.

Introduction

La transplantation

I. Les différents types de transplantation

Selon l'espèce et la provenance des tissus greffés et des receveurs, on distingue différents types de greffes :

▪ Xénogreffe

On définit par xénogreffe une transplantation entre des individus d'espèces différentes. Elle n'est pour l'instant effectuée qu'à titre expérimental entre le porc et le singe dans le but un jour de pallier au problème de pénurie d'organes. Ce type de greffe est rejeté très rapidement. L'apport de nouvelles techniques de manipulations génétiques augmente l'intérêt porté aux xénogreffes. Bien qu'il reste des obstacles d'ordre immunologique et de risques infectieux, les résultats sont encourageants (pour revue [3]).

▪ Isogreffe

Transplantation de tissu entre individus identiques génétiquement. Ce type de greffe peut s'effectuer chez l'humain, lorsque les sujets sont des jumeaux identiques, ou chez les animaux, lorsqu'on est en présence de souche congéniques. Les molécules complexes d'histocompatibilité majeurs (CMH) et mineurs de ces individus sont identiques et il n'y a pas de rejet immunitaire.

▪ Autogreffe

Le donneur et le receveur sont le même individu. Les tissus transplantés ne sont pas rejetés.

- **Allogreffe**

L'allogreffe consiste en la transplantation de tissus entre individus non-identiques, appartenant à une même espèce. Dans la plupart des cas, ces tissus transplantés sont rejetés par le système immunitaire à cause du polymorphisme des CMH et autres antigènes mineurs.
Dans le cadre de l'allogreffe et de la xénogreffe, l'utilisation d'immunosuppresseurs est nécessaire

II. L'alloreconnaissance

Le système immunitaire a développé un mécanisme sophistiqué pour éliminer ou détruire les pathogènes. L'acquisition de la capacité à reconnaître non seulement des germes entiers mais aussi des peptides dérivés de protéines est une réalisation biologique remarquable. Après la réponse de l'immunité innée, afin d'améliorer la capacité et l'efficacité de la réponse contre les microorganismes, un concept de défense immune, l'immunité adaptative est apparue. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) se sont spécialisées pour signaler la présence de pathogènes envahissant et les lymphocytes T et B ont acquis la capacité de recevoir un signal de ces cellules et de mettre en place une réponse immune.
En transplantation, l'alloreconnaissance définit le phénomène par lequel le système immunitaire est capable de reconnaître les antigènes du donneur, considérés comme du non-soi, et de conduire, en l'absence d'immunosuppression, au rejet du greffon. La reconnaissance des alloantigénes, en particulier du complexe majeur d'histocompatibilité par le lymphocyte T est l'événement clé induisant l'activation des cellules alloréactives. Elle nécessite trois signaux. Le premier signal est la résultante de l'interaction spécifique du complexe CMH-peptide avec le TCR (T Cell Receptor) du lymphocyte T. Le second signal est induit par la liaison des molécules de costimulation présentes sur les CPA avec leurs récepteurs exprimés à la surface du lymphocyte T. La présence de ces 2 signaux engendre la production de cytokines, notamment de l'IL-2, qui va constituer le troisième signal.

1. Alloreconnaissance directe

A l'encontre des règles de restriction de reconnaissance de l'antigène par les molécules du CMH du soi, l'activation des cellules T par la voie directe implique la reconnaissance des molécules de CMH allogéniques (du non soi) intactes à la surface des cellules présentatrices d'antigène étrangères [4]. L'alloreconnaissance directe peut avoir lieu lors d'une grossesse, d'une transfusion ou lors d'une transplantation.

Cette voie d'activation des lymphocytes a été mise en évidence dès 1976. Lafferty et son équipe ont montré qu'elle jouait un rôle majeur dans le développement du rejet aigu [5]. En effet, la déplétion des leucocytes passagers du greffon par une culture in vitro préalable à la greffe [6; 7] permet de prévenir le rejet. In vivo, le placement du greffon dans un hôte intermédiaire permet de prolonger la survie [8]. Cette immunogenicité peut être restaurée en réinjectant des DC du donneur [8]. D'autres études ont montré que les cellules dendritiques migrent du greffon dans la rate du receveur [9], suggérant que l'alloréponse directe peut être initiée dans les tissus lymphoïdes, comme les réponses contre les pathogènes. Cette théorie est confirmée par l'observation qu'un greffon peut être immunologiquement ignoré dans un animal dépourvu d'organes lymphoïdes secondaires [10].

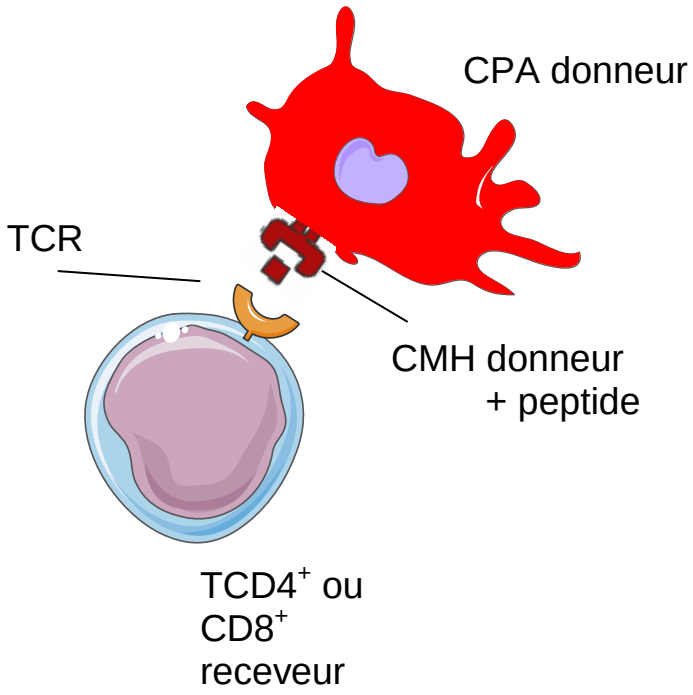


Figure 1: alloreconnaissance directe

Deux hypothèses sont émises pour expliquer ce phénomène :

La première hypothèse prend naissance dans l'observation que les résidus polymorphiques des molécules de CMH sont essentiellement localisés au niveau du sillon, lieu d'ancrage du peptide, et peu au niveau des zones en contact avec le TCR. Ainsi, les lymphocytes T alloréactifs reconnaissent les quelques parties polymorphiques des molécules de CMH allogéniques par leur TCR, indépendamment du peptide logé dans le sillon [11; 12]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que d'une part les cellules T sont capable de reconnaître la molécule de CMH en l'absence de peptides [13], et que, d'autre part un clone spécifique d'une molécule de CMH associé à un peptide peut réagir avec la même molécule de CMH associée à des peptides différents [11].

La deuxième hypothèse suggère une reconnaissance CMH/peptide impliquant de façon importante la reconnaissance peptidique. Par conséquent, ce sont les régions similaires entre les CMH syngéniques et allogéniques qui sont reconnues plutôt que les régions polymorphes des sites de contact CMH/TCR [14]. Par contre, le répertoire de peptides présenté par les CMH allogéniques étant différent de celui présenté par les CMH du soi, en raison des différences polymorphiques du sillon [15], tout se passe comme si un peptide étranger était présenté par un CMH du soi par voie classique. Cette voie a pour conséquence la mobilisation de lymphocyte T de spécificité très variée, représentant une proportion importante du répertoire T. Lors d'une greffe chez l'homme, la fréquence des lymphocytes T présentant une alloréactivité spécifique directe diminue avec le temps [16]. En effet, l'alloréactivité directe peut induire un rejet aigu mais pas le rejet chronique. Une autre étude [17] montre qu'on ne détecte pas d'alloréactivité directe dans le sang de patients greffés rénaux présentant un dysfonctionnement chronique du greffon. De plus, ce déclin est similaire chez les patients avec un rejet chronique et chez ceux présentant une bonne fonction du greffon, suggérant que la voie directe n'est pas un important médiateur du rejet chronique. De plus, des résultats montrent aussi qu'une présentation des alloantigènes par des cellules parenchymales du greffon peuvent induire une tolérance du greffon au lieu du rejet, comme le suggèrent les expériences dans lesquelles la coculture de cellules T $CD4^+CD45RO^+$ et des cellules épithéliales humaines d'origine thyroïdiennes ou rénales traitées par IFNγ induisent une tolérance allospécifique [18].

La reconnaissance directe n'est cependant pas l'unique mécanisme qui peut entraîner le rejet d'allogreffe. En effet, la reconnaissance indirecte semble suffisante et/ou nécessaire pour initier un rejet dans différents modèles d'allogreffe.

2. Alloreconnaissance indirecte

L'alloreconnaissance indirecte est un terme utilisé en immunologie de la transplantation pour désigner le processus classique de reconnaissance immune. En effet, il s'agit de la présentation de peptide au TCR par les CMH exprimées sur les CPA du soi. Les peptides présentés et reconnus par les cellules T du receveur sont les molécules du CMH du donneur qui ont été phagocytées suite à la destruction des cellules du donneur [8; 19]. En transplantation, cette alloreconnaissance indirecte a été corrélée avec l'apparition du rejet chronique [8; 20] En effet, même si au moment de la transplantation, le greffon contient assez de DC du donneur pour migrer du greffon jusqu'au tissu lymphoïde pour effectuer une présentation d'alloantigénes directe, cette population décline avec le temps. Le rejet chronique ne peut donc seulement être expliqué par la voie indirecte, au cours de laquelle s'effectue un passage constant de cellules dendritiques du receveur à travers le greffon, chargeant des antigènes solubles ou issus de cellules mortes du donneur qui sont processées et présentés par les CMH-II du soi au $CD4^+$ dans les organes lymphoïdes drainant. Cette hypothèse est supportée par des résultats expérimentaux : quand des cellules dendritiques $H2^k$ (exprimant la molécule H2-E) sont injectées dans un receveur $H\text{-}2A^b$ (H2-E négatif), dans les 2 jours suivants, la majorité des cellules dendritiques du receveur peut être marquée par un anticorps reconnaissant un peptide dérivé de la molécule H2-E dans les ganglions drainant, indiquant la tendance des molécules de CMH a être présentées comme un peptide par d'autres molécules de CMH [19]. De même, les receveurs CMH-I négatif peuvent rejeter des greffons CMH-II négatifs [21] et cela ne peut être expliqué que par l'existence d'un voie d'alloreconnaissance indirecte. Quelques études cliniques ont démontré une augmentation de la fréquence des cellules T $CD4^+$ avec une allospécificité anti-donneur indirecte chez des patients développant un rejet chronique. Plus tard, l'importance de la voie indirecte a également été démontrée dans le rejet aigu [22; 23]. D'autres études ont démontré que des greffons dépourvus de molécules du CMH de classe II sont rejetés très rapidement, ce qui démontre que la présentation directe étant inexistante, la présentation indirecte est suffisante pour induire le rejet de l'allogreffe [21; 24].

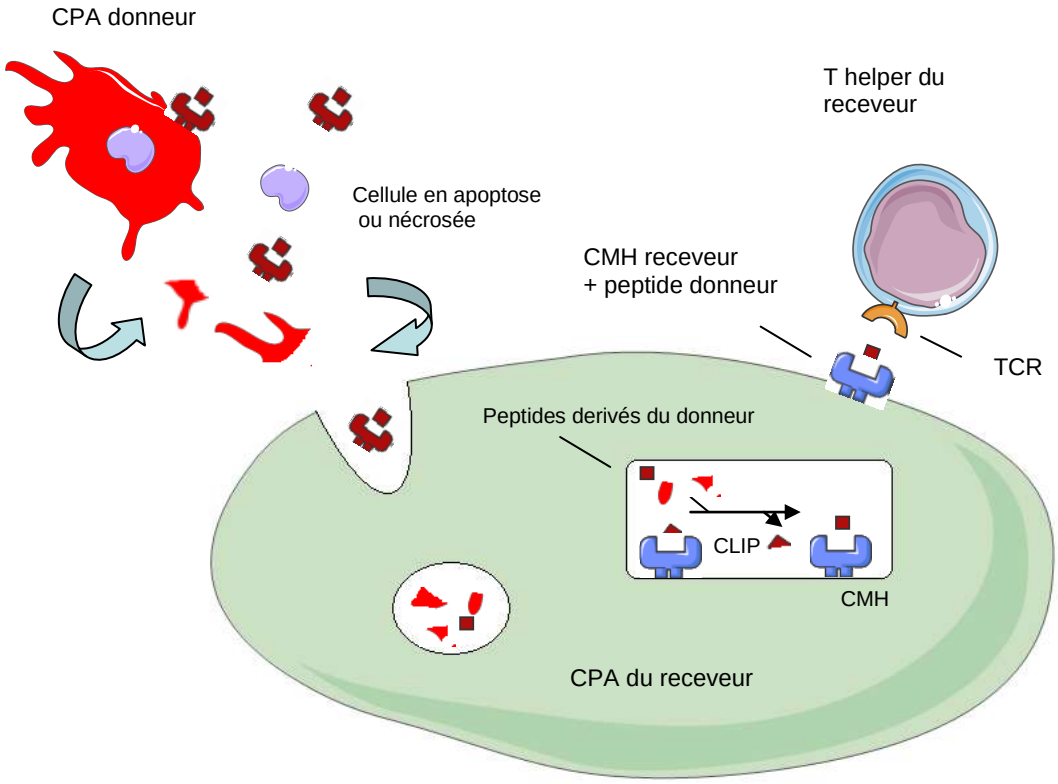


Figure 2 alloreconnaissance indirecte

3. Voie semi-directe

Une troisième voie de présentation d'alloantigènes a été récemment décrite, elle a été appelée par Lechler « alloreconnaissance semi-directe". Il s'agit d'une voie dans laquelle des complexes CMH : peptides intacts du donneur, sont présentés par les CPA du receveurs. L'acquisition de ces complexes se fait soit par contact cellule-cellule soit par utilisation des exosomes [25]. De cette façon, à la surface de la même cellule sont présentés des complexes CMH du donneur:peptide et CMH du receveur chargé avec un peptide dérivé du CMH du donneur. Ainsi, les cellules T $CD8^+$ allospecifiques liées à la CPA peuvent recevoir l'aide de cellules $CD4^+$ dans un modèle à trois cellules [26]. Des travaux récents ont confirmé que le transfert de CMH se fait in vivo [27-29], et que l'allo-CMH peut stimuler la réponse des cellules T au moment ils sont acheminés par exosomes [30]. Pêche et al. [31] ont démontré la possibilité de prolonger la survie

d'allogreffes cardiaques CMH-mismatched chez le rat grâce au transfert de CMH du donneur par exosomes. Toutefois, le transfert de molécules intactes du CMH du donneur peut également fournir un moyen par lequel les cellules T allospécificiques continuent à être stimulées après la déplétion des CPA du donneur, justifiant la longévité de la voie directe durant la transplantation. Le rôle précis de l'alloreconnaissance semi-directe dans le rejet et la tolérance en transplantation reste à être élucidé.

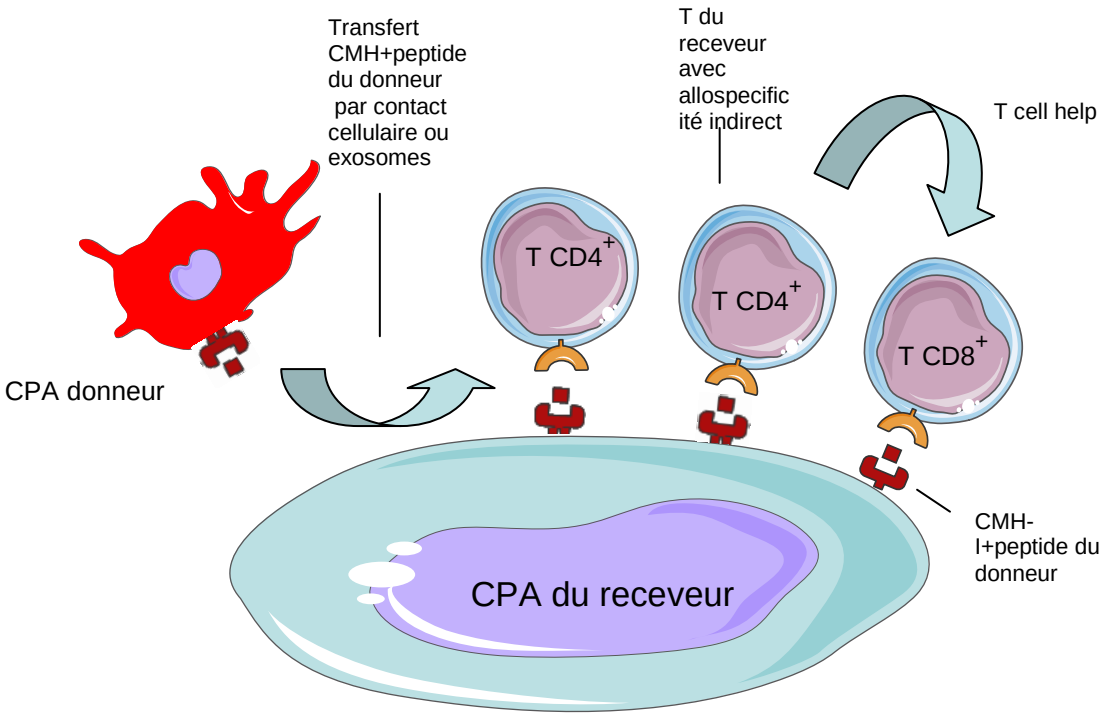


Figure 3: alloreconnaissance semi-directe

III. Le rejet d'allogreffe

Ce rejet est la conséquence de facteurs immunologiques mais aussi non immunologiques (infections, ischémie/reperfusion, toxine…) qui vont induire des phénomènes inflammatoires non spécifiques [32]. On distingue trois types de rejet immunitaire que l'on classe selon une succession temporelle d'événements en : rejet hyper aigu, rejet aigu et chronique.

1. Rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu survient très peu de temps après la greffe, en quelques heures voire quelques minutes. Il est dû à la présence d'anticorps préformés dirigés contre des alloantigénes du donneur, ces receveurs sont dits hyperimmunisés. Ces anticorps se lient aux antigènes reconnus, notamment au niveau de l'endothélium, entraînant l'activation du complément et une coagulation intravasculaire aboutissant à la perte du greffon. Ces anticorps sont souvent dirigés contre les protéines déterminant le groupe sanguin ou contre des molécules du CMH du donneur. Ces anticorps sont naturels (comme les anticorps anti-Gal causant le rejet hyper aigu en xénogreffe, ou les anticorps anti A ou B des groupes sanguins) ou acquis lors de phénomènes immunogènes antérieurs (comme une transfusion, une grossesse ou une greffe). Pour éviter ce type de rejet humoral en clinique, une recherche de compatibilité HLA entre le donneur et le receveur (test du cross match) est effectuée afin de déterminer la présence d'anticorps préformés avant greffe.

2. Rejet vasculaire aigu

Le rejet vasculaire aigu survient plus tard, dans les semaines suivant la greffe, ou encore plus tardivement. Ce rejet est dû à la formation après greffe d'alloanticorps qui ciblent l'endothélium [33]. Le dépôt des alloanticorps sur l'endothélium va entraîner un rejet par ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) et activation de la voie classique du complément (anaphylotoxine et complexe d'attaque membranaire).

Le rejet vasculaire aigu se caractérise selon la classification de Banff par 3 signes cardinaux : morphologique (lésions tissulaires aigues), immunopathologique (dépôt C4d dans les capillaires péritubulaires et sérologique (présence d'anticorps anti-HLA ou anti-cellules endothéliales dirigés contre le donneur) [34].

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 [35; 36]. Chez l'homme, elle peut survenir notamment lors de greffes ABO incompatibles, effectuées dans certains centres compte tenu de la pénurie d'organe, où des anticorps dirigés contre des antigènes du groupe sanguins du donneur peuvent être retrouvés alors que le greffon ne présente pas de signes biologiques ou histologiques de rejet [37]. Au moment de la greffe, des précautions sont prises pour minimiser les risques. Les receveurs sont désensibilisés par le biais d'injections d'immunoglobulines en intraveineuses, de plasmaphérèses, d'injection de Rituximab (anticorps anti-CD20), de splénectomie et d'immunosuppresseurs (sérum anti-thymocytaire, anti-IL-2). Pour autant, lorsqu'ils sont de nouveau détectés, ils ne provoquent pas systématiquement de rejet vasculaire [38]. Ceci semble être lié à des modifications au niveau de l'endothélium avec la surexpression de molécules anti-apoptotiques lors de l'exposition à de faibles taux d'anticorps anti-HLA [38; 39].

3. Rejet cellulaire aigu

Le rejet cellulaire aigu survient dans une période comprise entre une semaine et quelques mois après la greffe. La fréquence d'apparition de ce rejet est actuellement beaucoup plus faible grâce à l'utilisation d'immunosuppresseur. De plus, il est dorénavant réversible.

Ce phénomène est dépendant de l'activation des lymphocytes T du receveur spécifiques d'alloantigénes portés par le greffon. Les différentes sous population T (T $CD4^+$, T helper $CD4^+$, T cytotoxique) [40-42] sont activées au niveau des organes lymphoïdes secondaires par présentation directe ou indirecte. Les lymphocytes T activés prolifèrent puis recirculent 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. Chaque lymphocyte va agir selon sa spécificité dans le but de détruire le greffon. Les T cytotoxiques vont agir selon la voie Fas/FasL et la sécrétion de perforine/granzyme [43], d'autres vont sécréter des cytokines proinflammatoires (IFNγ, TNFα, IL-1) pour attirer les macrophages qui vont sécréter de l'oxyde nitrique (NO), IFNγ et des radicaux libres. Tant que l'élément étranger n'est pas détruit, la cascade d'événements continue, aboutissant à un infiltrat massif composé de lymphocytes T et B, de macrophages et de cellules phagocytaires.

4. Dysfonction chronique de l'allogreffe (CAD)

Il est la cause majeure des rejets de greffe dans les 5 à 10 ans suivant la transplantation. Ce rejet est mal contrôlé par les immunosuppresseurs, suggérant que des phénomènes immunologiques et non immunologiques agissent en synergie pour détruire le greffon. En effet, une des causes majeures du CAD est la Fibrose Interstitielle et Atrophie Tubulaire (FIAT) dont les étiologies possibles sont considérées comme non immunologiques, telles que définies dans la dernière classification du Banff [44]. Une autre forme du CAD est le rejet chronique médié par les anticorps, ou Glomerulopathie d'Allogreffe (GA). Ce rejet est défini histologiquement par un doublement des membranes basales glomérulaires, une atteinte des capillaires péri tubulaires, une possible présence de FIAT, un épaississement des parois des artères, et, dans tous les cas, la présence d'un produit issu de l'activation du complément, le C4d. Le C4d est un indicateur de l'intervention d'anticorps, ainsi que la présence d'anticorps dirigés contre le HLA du donneur ou d'autres antigènes. Les mécanismes moléculaires de ce rejet chronique, qui limitent la durée de vie des organes transplantés, sont mal connus. Le diagnostic actuel est basé sur une biopsie du greffon, geste invasif et non sans danger pour le patient, qui met en évidence des lésions importantes du greffon, ne permettant ainsi qu'un intervention thérapeutique tardive. C'est pourquoi une partie de notre équipe recherche des biomarqueurs présents dans le sérum dont la présence constituerait un diagnostic permettant de différencier, à un stade précoce et par une technique peu

invasive, une GA d'une FIAT. Ce type de test permettrait de suivre l'évolution du greffon et l'efficacité des traitements.

Actuellement, on tend à croire qu'une meilleure gestion du rejet aigu pendant la première année qui suit la greffe peut retarder et diminuer la fréquence de survenue de rejet chronique à long terme. Plusieurs autres facteurs sont à prendre en considération pour ralentir l'évolution vers le rejet chronique et favoriser une plus longue durée de survie de l'organe greffé comme le respect de la compatibilité HLA entre donneur et receveur, l'utilisation de nouvelles drogues anti-rejet, mais aussi des facteurs non immunologiques comme le conditionnement du greffon et le délai écoulé entre le moment de son prélèvement et celui de sa réimplantation (temps d'ischémie froide).

Différentes sous populations T

L'identification de deux sous-populations de lymphocytes T CD4+ *helper* (Th) par Coffman et Mossman, Th de type 1 (Th1) et Th de type 2 (Th2), dans les années 1980, a permis une avancée formidable dans la compréhension des fonctions des cellules T et de leur rôle en pathologie [45]. Ces deux sous-populations sont incriminées dans plusieurs pathologies, notamment les maladies auto-immunes pour le lymphocyte Th1 et les allergies pour le lymphocyte Th2 [46; 47]. Depuis, la famille des lymphocytes T CD4+ s'est élargie et compte quatre sous-populations : Th1, Th2, Th de type 17 (Th17) et T régulateur (Treg). Les trois sous-populations de lymphocytes Th1, Th2 et Th17 sont des sous-populations effectrices alors que la sous-population de lymphocytes Treg est une sous-population régulatrice. La différenciation vers l'une des sous-populations dépend du mode de stimulation, du type d'antigènes, de l'intervention des molécules de costimulation et des cytokines présentes dans le milieu [48]. Chacune de ces sous-populations joue un rôle dans le rejet en transplantation soit direct soit indirect. Dans cette partie, je vais donc m'appliquer à détailler leur différenciation, leur rôle dans la transplantation et leur régulation.

I. La differentiation

1. Les lymphocytes Th1 et Th2

Mosmann et son équipe ont initialement proposé que les T $CD4^+$ puissent être divisés en deux sous populations indépendantes, les cellules T helper 1 (Th1) et les cellules T helper 2 (Th2), chacune caractérisée par des fonctions effectrices distinctes et un profil cytokinique différent [45]. Les cellules Th1 produisent une large quantité d'IFNγ, interleukine (IL)-2, GM-CSF en réponse à un antigène présenté par une CPA. Elles sont principalement impliquées dans l'élimination de pathogènes intracellulaires via l'activation de macrophages et la production d'immunoglobulines fixant le complément (IgG2a chez la souris). Les cellules Th2 sont caractérisées par la production des interleukines IL-4, IL-5, IL-13 et IL-25, et participent à l'élimination de pathogènes

extracellulaires et de parasites via la production d'immunoglobulines de types IgG1 et IgE. Les cellules Th1 sont aussi impliquées dans les réponses de type cellulaire et dans les réponses d'hypersensibilité retardée (DTH) alors que les cellules Th2 sont associées aux réponses allergiques.

La différenciation des cellules effectrices T helper est initiée par la combinaison de signaux provenant du TCR, des molécules de costimulation, des récepteurs cytokiniques et de facteurs de transcriptions. La différenciation des cellules Th1 est initiée par l'activation des cellules T en présence d'IFNγ. Cela mène à l'activation de STAT-1 et du facteur de transcription spécifique de Th1, T-bet. T-bet induit la production d'IFNγ et permet la fixation de l'IL-12 via l'expression de la chaîne IL12Rβ2. La fixation de l'IL-12 sur son récepteur induit la phosphorylation de STAT-4 qui coopère davantage avec T-bet pour transcrire le gène *IFNγ.* Il s'ensuit un feedback positif dans laquelle l'augmentation de l'IFNγ surrégule davantage T-bet et favorise la différenciation Th1. La différenciation des cellules Th2 est induite par l'IL-4 et médiée par le facteur de transcription spécifique GATA-3. L'engagement du récepteur de l'IL-4 mène à la phosphorylation de STAT-6 qui se lie au promoteur de l'IL-4 et induit davantage la production de l'IL-4, ce qui établit un feedback positif augmentant la différenciation Th2 [49; 50].

2. Le lymphocyte Th17

La différenciation du lymphocyte Th naïf en lymphocyte Th17 peut être schématisée en trois phases : une phase de différenciation initiale, une phase d'amplification et une phase de stabilisation.

La première phase est initiée par la liaison de deux cytokines à leurs récepteurs : le *transforming growth factor* β (TGFβ) et l'interleukine 6 (IL-6). Cette liaison induit l'activation du facteur de transcription *retinoid related orphan receptor* γt (RORγt) [51] par l'intermédiaire du facteur de transduction SMAD [52] pour le TGFβ et du *signal transducer and activator of transcription* (STAT3) pour l'IL-6. En plus du RORγt, deux autres facteurs nucléaires ont été récemment mis en évidence : le RORα qui joue le même rôle que le RORγt et l'*interferon regulatory factor* 4 (IRF4) qui semble impliqué

dans l'expression de RORγt [49; 53]. La mise en jeu de ces voies de signalisation aboutit à la sécrétion de cytokines caractéristiques du lymphocyte Th17 : l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22.

La seconde phase d'amplification est dominée par la sécrétion de l'IL-21 qui exerce un feedback positif sur le lymphocyte Th17 et permet sa multiplication et son amplification par la voie des STAT-1 et STAT-3 [54]. L'IL21 induit également l'expression du récepteur de l'IL-23 sur le lymphocyte Th17.

La troisième phase est essentiellement sous le contrôle de l'IL-23, membre de la famille des IL-12 et produite par les CPA (cellules dendritiques et macrophages). Elle n'intervient pas dans la différenciation initiale du lymphocyte Th17 (médiée par l'IL-6 et le TGFβ), mais dans la phase de stabilisation et de maintien du phénotype [55-57]. Le lysophospholipide, sphingolisine 1 phosphate (S1P), semble exercer le même type d'action que l'IL23 sur les T CD4+ spléniques en se liant à son récepteur de la famille des récepteurs des protéines G (*G-protein-coupled receptors*) et en activant le NFAT [58]. L'IL-1 est une autre cytokine qui agit en synergie avec l'IL-6 et l'IL-23. Son récepteur utilise la voie du MyD88 et de l'IL-1 *receptor associated kinases* (IRAK) pour activer les facteurs nucléaires AP1 et NFκB [53].

Si les choses semblent bien établies chez les rongeurs, l'origine des cellules Th17 chez l'homme, et en particulier le rôle du TGFβ dans leur différenciation, est encore soumise à débat. Plusieurs études ont montré que le TGFβ n'avait aucun effet sur la différenciation des T $CD4^+$ naïfs, voir même plutôt un effet inhibiteur [53; 59; 60]. Toutes ces études ont été réalisées avec des cellules T CD4+ naïves ($CD45RA^+$ $CD45RO^-$) extraites du sang périphérique d'adultes. Il se pose alors la question de la "vrai naïveté » de ces cellules et la mesure dans laquelle les cytokines agissent sur une véritable cellule naïve, ou sur la présence de T $CD4^+$ activées et/ou mémoires contaminantes [61]. Cependant, dans nombre de ces études, les cellules T $CD4^+$ naïves sont cultivées dans du sérum bovin ou humain, qui contiennent des traces de TGFβ, ce qui suggère une possible sous-estimation de son importance dans la différenciation des Th17. En effet, des études indépendantes [62-64] ont montré que le développement des cellules Th17 humaines nécessite l'activité de TGFβ, comme chez la souris, même si les

résultats de ces études ont été quelque peu contradictoires. En effet, Manel et al. [62] ont trouvé que le TGFβ, IL-1b, IL-6 et IL-21 ou TGFβ, IL-1b et IL-23 sont nécessaires et suffisant pour induire l'expression de l'IL-17 par des cellules naïve CD4+ issues du sang de cordon ombilical. Volpe et al. [63] a montré que l'absence de TGFβ induit un passage d'un profil Th17 à un profil de type Th1. Yang et al. [64] a constaté que TGFβ et IL-21 uniquement pouvaient promouvoir la différenciation.

3. Le lymphocyte T régulateur

Il est maintenant clair que les cellules T CD4 + CD25 + (Tregs) peuvent être issues de deux sources, à savoir celles en développement dans le thymus (dont la contribution peut donc diminuer avec l'âge) et celles de la périphérie.

- T régulateurs naturels

Les T régulateurs naturels se développent dans le thymus où il apparaît qu'ils sont sélectionnés positivement sur les cellules épithéliales du cortex médullaire [65]. La sélection des thymocytes CD4+CD25+ requiert un TCR ayant une affinité intermédiaire pour les peptides du soi puisque ceux exprimant un TCR avec une faible affinité ne seront pas sélectionnés par cette voie [66]. D'autres études suggèrent cependant qu'une sélection négative défaillante par les cellules épithéliales du thymus peut contribuer à enrichir le répertoire Treg en cellules autoréactives car ces précurseurs apparaissent résistants à la déplétion clonale induite par les ligands exprimés sur les cellules épithéliales [67; 68]. Pour le moment, rien ne permet de dire clairement si l'enrichissement du répertoire T reg en autoréactivité est dû à une sélection positive par les ligands du soi ou une défaillance de la sélection négative par l'épithélium du thymus, ou les 2.

- T régulateurs induits

Contrairement à la génération intrathymique des T régulateurs naturels, les T régulateurs induits sont générés en périphérie, probablement pour aider à stopper la réponse quand le pathogène est éliminé et secondairement pour éviter l'autoimmunité.

Leur génération est dépendante de facteurs périphériques comme la maturation et la stimulation des CPA [69; 70], la disponibilité de cytokines tels que le TGFβ et la présence de faibles doses d'antigène. La différenciation des Treg induites semble contrôlée, au moins sous certaines conditions, par les DC immatures (imDC) puisque la stimulation répétée de cellules T naïves par imDC résulte dans le développement de cellules T avec une fonction suppressive [69]. Cependant, il a aussi été montré que des sous populations particulières de DC peuvent induire un phénotype de Treg indépendamment de leur état de maturation.

De plus, des études sur les Treg dans la tolérance en transplantation laissent présager que les Treg naturels jouent un rôle dans l'induction des Treg induits via un processus connu sous le nom de « linked-suppression » [71-73]. Dans ce modèle, le processus agit quand une cellule T potentiellement alloréactive subit l'influence d'une Treg quand les 2 cellules reconnaissent leur alloantigénes respectifs sur la même CPA [71; 72]. Durant le processus de « rééducation », la cellule T potentiellement alloréactive est convertie en Treg. En retour, elle peut induire une nouvelle T CD4+ avec un phénotype régulateur et ainsi propager la tolérance. La sécrétion de TGFβ et d'IL-10 par les Treg induits et leurs effets sur les T naïfs ou les CPA stimulé sont impliqués dans ce processus.

II. Implications en transplantation

1. Rôle des Th1 et Th2

Initialement, les cellules Th1 étaient considérées comme les effectrices majeurs dans le rejet d'allogreffe, alors que la polarisation Th2 de la réponse immune reflétait la tolérance [74-77]. Cette vision est supportée par les observations montrant que les cellules Th1 facilitent la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ (CTL) et déclenchent une réponse d'hypersensibilité retardée, l'activation de macrophage et la production d'anticorps fixant le complément. Plus tard, d'autres investigations révélèrent que les cellules T CD8+ par elles-mêmes influencent aussi la balance des réponses allogéniques Th1 et Th2. Dans le cas d'un mismatch CMH-I, les cellules T

$CD8^+$ alloréactives orientent les cellules T $CD4^+$ vers un type Th1. Une production précoce et abondante d'IFNγ et ensuite d'IL-12p70 par les cellules dendritiques allogéniques est à l'origine de cette orientation [78]. De plus, les expériences dans lesquelles les lymphocytes T $CD8^+$ sont déplétés ou ne peuvent être activés à la suite d'un matching CMH-I montrent une orientation vers la voie Th2 dans le rejet d'allogreffe [79]. De même, la neutralisation de l'IL-4 ou la déplétion des cellules $CCR3^+$ (un récepteur spécifiquement exprimé par les cellules Th2) retardent significativement le rejet d'allogreffe dans certains modèles [80; 81]. Par ailleurs, la neutralisation de l'IL-12 et/ou de l'IFNγ ne prolonge pas la survie de l'allogreffe cardiaque mais l'oriente plutôt vers une réponse immune de type Th2 et accélère le rejet [82; 83]. Ces différentes études indiquent que les rôles joués par les cytokines Th1 et Th2 s'avèrent plus complexes que prévu. Elles peuvent être considérées comme 2 voies alternatives du rejet d'allogreffe se régulant l'une l'autre.

2. Rôle des Th17

La compréhension des mécanismes de différenciation et d'action des lymphocytes Th17 a permis la réflexion et la mise en place de nombreuses études pour démontrer leur intervention dans plusieurs pathologies telles que les rejets d'allogreffes.

Le lymphocyte Th17 initie l'inflammation et l'infiltration des organes cibles par les cellules de l'inflammation. De ce fait, il se voit attribuer un rôle, de plus en plus important, dans les défenses de l'hôte contre le non soi [57; 84].

Le rejet d'allogreffe est le résultat d'une dualité entre les mécanismes immunologiques de tolérance et les promoteurs du rejet. Le rejet est un processus inflammatoire en premier lieu. Il fait intervenir les cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, IL-2, IL-6 et IL-15) sécrétées localement par les cellules épithéliales du greffon et par les lymphocytes qui ont infiltré ce greffon. Les études dans les modèles de rejet aigus chez le rat ont également montré une élévation de l'ARNm de l'IL-17 (dans l'allogreffe rénale) et de la protéine IL-17 (dans l'infiltration de cellules mononucléées) dès le deuxième jour post-transplantation [90]. De même, le taux d'IL-17 est élevé dans le sang et les urines de

sujets en phase de rejet subclinique de greffe rénale, alors que chez le patient contrôle (non-rejet), IL-17 n'est pas détectable ni dans l'échantillon de biopsie, ni dans le sédiment urinaire [90].

La principale fonction de l'IL-17 est d'être un médiateur pro-inflammatoire. Localement, l'IL-17 stimule la production d'IL-6, de NO et de la prostaglandine E2 (PGE2) [85-87], alors que la synergie avec d'autres cytokines inflammatoires telles que IL-1β, le facteur de nécrose tumorale (TNF)α, IFNγ [88-90] et CD40 ligand (en augmentant les niveaux de surface CD40) [91] conduit à une surrégulation de l'expression des gènes et à une progression et amplification de l'inflammation locale. De plus, l'IL-17 médie le chimiotaxisme des neutrophiles et des monocytes vers les sites d'inflammation par le biais de l'IL-8, de la MCP (monocyte chemoattractant protein) -1 et de la Gro (growth related protein)-α [90; 92-94]. Le dernier mode d'action de l'IL-17 est la production de facteurs de croissance hématopoïétiques, tels que les granulocytes et de facteur de stimulation des colonies (G-CSF) et de granulocytes et de macrophages (GM)-CSF [95; 96], qui favorisent la croissance et la maturation des cellules myéloïdes recrutés.

Dans la transplantation pulmonaire chez l'homme, l'IL-17 est également présent dans le liquide de lavage alvéolaire, lors du rejet des greffes pulmonaires avant l'invasion par les neutrophiles. Cette augmentation de l'IL-17 prouve l'implication des lymphocytes TH17 dans le rejet d'allogreffes [48; 97; 98].

Dans les modèles d'allogreffe cardiaque, l'antagonisme du réseau de l'IL-17 (l'utilisation d'une IL-17R-immunoglobin fusion protein) peut réduire la production de cytokines inflammatoires (notamment l'IFNγ) et de prolonger la survie de la greffe [99]. Toutefois, cette approche est plus efficace pour prévenir les rejets aigus plutôt que les rejets chroniques ou vasculaires [100] et indique un rôle plus important pour l'IL-17 en début plutôt qu'en fin de rejet de greffe cardiaque. Il y a, en outre, peut être un rôle pour l'IL-17 dans l'induction de maturation des cellules dendritiques alloréactives [101].

3. Rôle des T régulateurs

Contrairement aux autres T $CD4^+$, comme leur nom l'indique, les T régulateurs ont un rôle de contrôle des T effecteurs. Les T reg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ inhibent la prolifération des lymphocytes T naïfs et leur différenciation en cellules T effectrices in vivo. In vitro les Tregs répriment la prolifération et la production de cytokines (en particulier de l'IL-2) des cellules T intervenant lorsque les deux populations sont en coculture et stimulées par un antigène en présence de CPA [102; 103]. Plusieurs mécanismes de médiation de suppression des Treg ont été proposés et notamment la sécrétion par les Treg de cytokines immunosuppressives, la suppression dépendante du contact cellulaire, la modification fonctionnelle ou la mise à mort de l'APC. Par exemple, l'IL-10 et le TGFβ contribuent à la suppression des maladies inflammatoires de l'intestin chez la souris induites par la déplétion des Treg [104]. Une étude a montré que les Treg $Foxp3^+$ produisent principalement la cytokine immunosuppressives IL-35, un nouveau membre de la famille de l'IL-12 [105]. Par ailleurs, l'absorption de cytokines par les Tregs peut induire l'apoptose des cellules T effectrices [106]. Les Tregs peuvent aussi tuer les cellules T ou les APC par le biais d'un contact cellule à cellule par un mécanisme dépendant de granzyme ou perforine, ou par délivrance d'un signal négatif aux cellules T effectrices. Les signaux négatifs possibles incluent la surrégulation intracellulaire de l'AMP cyclique, ce qui conduit à l'inhibition de la prolifération des cellules T et de la production de l'IL-2, ou la génération de l'adénosine catalysée par le CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) et le CD73 (ecto-5'-nucléotidase) exprimé par les Tregs. Les Tregs activés peuvent également sous réguler l'expression de CD80/86 sur les APC ou stimuler des cellules dendritiques pour former l'enzyme indoleamine 2, 3-dioxygénase, qui catabolise le tryptophane en kynurenines qui sont toxiques pour les cellules T, les deux semblent être dépendants de l'expression de CTLA-4 par Tregs.

L'absence de certaines molécules exprimées par les Treg (comme LAG-3, granzymes, et l'IL-35) peuvent empêcher l'inhibition in vitro par les Treg, mais ne parviennent pas à causer l'autoimmunité in vivo, car d'autres modes d'action peuvent compenser la fonction manquante. Parmi les différentes molécules impliquées dans la répression in vivo ou in vitro, CTLA-4 a une importance critique pour les raisons suivantes. Les

Tregs Foxp3+ expriment constitutivement CTLA-4, Foxp3 contrôle directement l'expression de CTLA-4, et le blocage de CTLA-4 abroge la répression. Des études additionnelles sont nécessaires pour élucider les bases moléculaires de la répression médiée par les Tregs. Le sort des lymphocytes T effecteurs qui sont réprimés par les Tregs est également inconnu, on ne sait pas s'ils restent non activés, meurent par apoptose, ou deviennent anergiques.

4. La régulation

La régulation croisée permet la différenciation du lymphocyte Th naïf vers l'une des sous-populations tout en inhibant les autres. Cette régulation s'exerce entre le lymphocyte Th1 et le lymphocyte Th2 qui s'inhibent mutuellement par l'intermédiaire de leurs cytokines respectives. En effet, l'IL-4 inhibe le lymphocyte Th1 et l'INFγ inhibe le lymphocyte Th2. Le même type de régulation entre les lymphocytes Treg et Th17 a été récemment décrit, mais les mécanismes exacts de cette régulation ne sont pas totalement élucidés [107].

De plus, il existe une régulation croisée entre les lymphocytes Th1-Th2 et Th17-Treg. Ainsi, le TGFβ, nécessaire à la différenciation des lymphocytes Th17 et Treg, inhibe celles des lymphocytes Th1 et Th2 et inversement l'IL-4 et l'INFγ inhibent la différenciation vers le lymphocyte Th17. Cette différenciation peut être également inhibée par l'IL-25 secrétée par le lymphocyte Th2, par l'IL-2 qui est connue comme étant un facteur de croissance des lymphocytes T [108].

Récemment, Bouguermouh et son équipe ont montré l'importance des molécules de costimulation B7 dans la régulation négative du développement des Th17. En effet, l'ajout dans les MLR de CTLA-4Ig, agent bloquant les interactions CD28/B7 et CTLA-4/B7, favorise la différenciation Th17 [109]

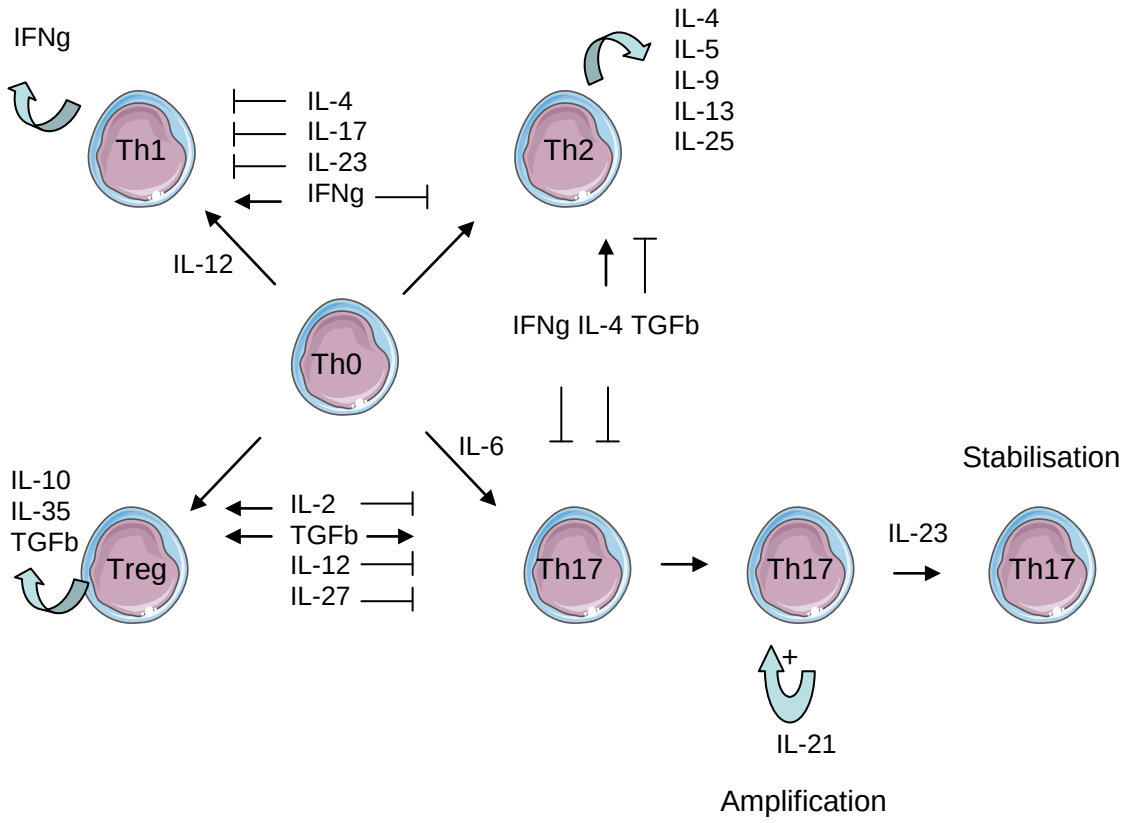


Figure 4 : différenciation et régulation des T CD4$^+$

Utilisation des anticorps monoclonaux cytotoxiques en transplantation

Depuis la première greffe réussie chez l'homme en 1954, la quête du meilleur traitement occupe chercheurs et médecins. La médecine des transplantations tente de résoudre ce problème de trois façons :

- Une minimisation et personnalisation du traitement d'entretien qui englobe dans la majorité des cas une trithérapie (inhibiteur calcineurine, anti métabolite et corticostéroïdes)
- Le développement de nouveaux immunosuppresseurs spécifiques de certaines lignées cellulaires
- Le développement du protocole thérapeutique visant à induire une tolérance immunologique

Le recours aux anticorps joue un rôle de plus en plus important dans cette approche puisqu'il autorise, après induction, une diminution de l'immunosuppression, est hautement spécifique et forme une base solide dans les traitements de tolérance ayant fait leur preuve chez les rongeurs ou le primate.

Partant de l'observation que le rejet d'allogreffe est en majeure partie dû à un processus médié par les lymphocytes T, la déplétion des lymphocytes T du receveur semble être la meilleure approche pour contrecarrer le rejet aigu chez le rat, le primate non humain et l'homme. Cependant, une déplétion totale du compartiment T ne pourrait pas être favorable à l'induction d'une tolérance immunologique.

Actuellement sur les 13 anticorps utilisés en transplantation, seulement 4 sont déplétants. Parmi ces 4, un est actuellement en phase II d'essai clinique (TCR$\alpha\beta$) et trois sont utilisés en clinique : Muronomab (OKT3), Alemtuzumab et le Rituximab. Dans un premier temps, l'OKT3 était, comme l'Alemtuzumab, utilisé lors de la phase d'induction (traitement peri transplantation) avec un effet extrêmement bénéfique pour le greffon. Cependant, les nombreux effets indésirables tels que le « systemic inflammatory response syndrom » (SIRS), les infections par des germes opportunistes et le développement de tumeurs malignes ont fait qu'il n'est plus utilisé que comme

traitement anti rejet. Le Rituximab est lui aussi un traitement anti rejet pour la déplétion des cellules B.

Au cours de cette partie, je vais traiter certains aspects de la déplétion des cellules T et de leurs sous populations définies par l'expression d'antigènes cibles, avec une attention particulière à l'induction de mécanismes régulateurs dans l'expérimentation de transplantation d'organes (cf tableau I).

I. Mécanismes d'action des anticorps déplétants

Les paramètres clés influençant la cytotoxicité des anticorps sont l'isotype et l'affinité de l'anticorps, la densité de l'antigène à la surface de la cellule cible et la modulation de l'antigène ou l'internalisation du complexe antigène/anticorps. Ce dernier peut diminuer la capacité de l'anticorps à induire la mort cellulaire [110]. L'expression des protéines régulatrices du complément de la cellule cible [111] est également d'une importance considérable. Dans la majorité des cas, on estime que la cytotoxicité complément dépendante et la cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps représentent les mécanismes d'action dominants des anticorps monoclonaux non conjugués, bien que l'induction de l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire puissent être prédominants dans d'autres cas [112; 113]. Les protocoles thérapeutiques à base d'anticorps utilisent une combinaison de ces mécanismes pour dépléter les cellules cibles [114]. En ce qui concerne la transplantation d'organe, quelque soit le mécanisme, il semble que l'effet thérapeutique ne concerne pas seulement l'efficacité de la déplétion, mais aussi de la réactivité immunitaire de cellules résiduelles qui risquent de se développer et de contribuer soit à la tolérance soit au rejet.

II. Reconstitution des cellules T et prolifération homéostatique

Considérant que la fonction thymique décline chaque année après l'adolescence, la reconstitution des cellules T naïves est altérée après une lymphopénie sévère. Cependant, les lymphocytes T qui n'ont pas été déplétés subissent une prolifération homéostatique afin de remplir l'espace laissé « libre » [115]. Ce processus est sous contrôle des cytokines IL-7, IL-15 et IL-21 [116]. IL-15 est relarguée en grande quantité après une déplétion profonde des lymphocytes T. IL-15 et IL-21 ont peu d'effet sur la prolifération des cellules T naïves, mais sont importantes pour la fonction des cellules T CD8 mémoires, leur expansion et leur survie. Indépendamment de ces cytokines, l'exposition post-transplantation aux alloantigénes contribue également à l'expansion des cellules T CD4 et CD8 mémoires et à la modification des cellules T naïves, qui acquièrent un phénotype semblable aux effectrices-mémoires. Ces cellules perdent progressivement l'expression de CD62L, surexpriment CD44 et sont moins sensibles à la costimulation par CD28. Leur activité cytotoxique, leur capacité de prolifération et la production de cytokines sont également renforcées. En contraste avec les cellules activées, les cellules T ne surexpriment pas les marqueurs d'activation CD25 et CD69 [117]. Par conséquent, les cellules T mémoire s'expandent de façon démesurée après d'importantes lymphodéplétion et deviennent le principal type de cellules chez l'homme [118] ou chez les modèles expérimentaux [119]. Dans le cas des rongeurs, la prolifération homéostatique et le phénotype mémoire sont responsables de la résistance à l'induction de tolérance après une importante lymphodéplétion. En outre, les Tregs sont déplétés de façon aussi efficace que les cellules T naïves par les stratégies actuelles de déplétion, mais peut-être de façon moins adaptée à la prolifération homéostatique que les cellules T mémoires [117]. Comme prédit, les cellules-T présentes après une déplétion médiée par des anticorps chez l'homme sont des cellules T de type activée mémoire. Les patients traités avec des agents déplétants sans immunosuppression observent un rejet dans le premier mois, malgré la déplétion de 97% des cellules T, dû essentiellement à l'action du résidu de cellules T activés mémoire, qui sont

prédominantes aussi bien en périphérie que dans le greffon lors du rejet [120]. Ainsi, la prolifération homéostatique qui suit une lymphodéplétion pourrait entraver le développement de la tolérance de la transplantation. Comme décrit ci-après, les cellules régulatrices peuvent, toutefois, également s'expandre de façon massive lors de la phase de réplétion des cellules T, avec un possible effet bénéfique qui doit être évalué.

III. Déplétion de toutes les cellules T

1. Immunoglobulines anti lymphocytaires

La première solution d'anticorps utilisée depuis les années 1960 est un anticorps polyclonal anti thymocyte globuline (ATG, de lapin ou cheval). L'ATG induit une rapide et profonde lymphopénie attribuée classiquement à une cytolyse complément dépendante, une cytolyse anticorps dépendante médiée par les cellules, une opsonisation et ultérieurement à la phagocytose des macrophages. De plus, l'ATG génère différents signaux de transduction aux cellules cibles qui vont interférer avec les signaux d'activation ce qui peut déclencher un phénomène de mort cellulaire par activation [121]. Après une immunisation MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein) dans le modèle de souris EAE, le traitement à l'ATG dépléte les cellules T effectrices, renforce l'expansion des Treg MOG spécifiques ($CD4^+FoxP3^+$) et altère la réponse cellulaire autoantigène spécifique des T pathogéniques par une réponse protectrice des cellules Treg. Par conséquent, il se pourrait que les effets thérapeutiques de l'ATG ne se produisent pas seulement en raison de la déplétion des lymphocytes, mais aussi en raison de l'augmentation du nombre de cellules Treg et de leur fonction [122].

De même, in vitro l'ATG de lapin peut provoquer l'augmentation de la fonction des Treg en convertissant les cellules T $CD4^+$ $CD25^-$ par une augmentation transcriptionnelle de NFAT1, conférant à son tour l'expression de FoxP3 et l'activité régulatrice [123; 124]. Toutefois, aucune étude en transplantation rénale n'a établi l'induction de tolérance chez des primates non humains ou chez l'homme après administration d'ATG, à l'exception des études qui combinaient l'ATG avec une irradiation lymphoïde totale et une greffe de cellules souches hématopoïétiques [125].

En clinique, les résultats obtenus en transplantation rénale, après traitement avec de l'ATG, ne différent pas de ceux observés avec des traitements d'induction non déplétants tels que les anticorps monoclonaux anti CD25, ce qui ne suggère pas de façon claire un effet bénéfique en termes de potentiel pro-tolérogénique de ATG [126].

2. Anti CD52 (Campath-1)

L'antigène CD52 est fortement exprimé sur les lymphocytes, monocytes et éosinophiles. Campath-1 (Alemtuzumab) est un anticorps fortement cytotoxique qui a été utilisé pendant plusieurs années pour traiter les tumeurs malignes lymphoïdes [127]. Il a aussi été utilisé pour des traitements de différentes maladies auto-immunes comme l'arthrite, sclérose en plaque, la vascularite, les cytopénies auto-immunes, etc., et dans le cadre d'un prétraitement avant une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques [128]. Cet anticorps a été utilisé en monothérapie en transplantation rénale avec de faibles doses de cyclosporine A (CsA) dans l'espoir d'établir des propriétés de tolérance ou de s'en approcher [129]. Toutefois, il n'y a pas eu à ce jour d'étude prospective randomisée sur le long terme qui a déterminé le protocole immunosuppresseur optimal à utiliser avec campath-1. La variation d'expression de CD52 à la surface des sous population des cellules T suggère que les mécanismes de cytotoxicité de Campath-1, médiés et non médiés par le complément, ne peuvent induire de façon équivalente la mort de toutes les sous populations T in vivo. La transformation du phénotype des cellules $CD52^+$ en $CD52^-$ peut aussi moduler l'action des anticorps cytotoxiques anti-CD52 [130]. Bien que le rôle précis de CD52 ne soit pas connu, il ne joue pas un rôle essentiel dans la co-stimulation lors de l'activation d'une cellule T. Quand un cross-linking s'opère, l'anticorps anti CD52 peut transduire un signal d'activation dépendant de la calcineurine aux cellules T au repos [131]. Récemment, il a été démontré que le signal CD52 induit par Campath-1 induit également des cellules Treg qui peuvent être amplifiées en culture avec de l'IL-2 et protégées d'une GVHD (graft versus host disease) xénogénique provoquée par des PBMC humains dans les souris SCID [132]. Une augmentation des cellules T régulatrices FoxP3+ a en effet été observée chez les patients transplantés rénaux traités par Campath-1. Celle ci n'est pas

entièrement expliquée par leur prolifération homéostatique après déplétion, par l'augmentation de production du thymus, ou par l'échappement des Treg, ce qui suggère une production/expansion de novo [133]. Chez les patients transplantés rénaux traités par Campath-1 qui ont reçu une faible dose de mycophénolate mofétil (MMF) et de tacrolimus, il a aussi été signalé un repeuplement par les cellules T de phénotype $CD8^+CD28^-$. Ces cellules inhibent la prolifération des cellules $TCD4^+$ ex-vivo. En conséquence, des cellules $TCD8^+CD28^-$ cultivées pourraient entrer en compétition pour combler l'espace immunitaire avec les cellules $TCD4^+$, en inhibant leur prolifération, et donc en retardant la régénération des cellules $TCD4^+$ [134]. La déplétion des cellules effectrices, l'interférence directe avec les signaux des lymphocytes T et la surrégulation des cellules Treg ne peuvent être considérées comme les seuls mécanismes d'action des anticorps anti-CD52. Un traitement d'induction avec Campath-1 chez les transplantés renaux cause également une réduction importante et prolongée du nombre de cellules dendritiques (DC) périphériques et un changement significatif des DC myéloïdes en DC plasmacytoïdes immunorégulatrices dès le 1er mois post-transplantation [135].

3. Anti-CD3

Après liaison sur les cellules cibles T, l'anticorps monoclonal anti-CD3 (OKT3) n'induit seulement que 20-50% de déplétion des cellules T, due non seulement à l'ADCC et à l'activation du complément, mais aussi à l'induction d'apoptose par transduction directe du signal, indépendamment de la partie Fc de l'anticorps. In vitro, il a été établi que les cellules T activées entrent préférentiellement en apoptose alors que les cellules T au repos sont résistantes à l'action de l'anticorps original de souris OKT3 ou de l'anticorps anti-CD3 humanisés [136; 137]. D'autres cellules cibles qui ne sont pas déplétées in vivo perdent leur expression de CD3 à la suite de l'internalisation de l'antigène [138]. Initialement reconnus comme un immunosuppresseur non spécifique, pendant de nombreuses années, les anticorps anti-CD3 ont démontré leur capacité à induire une tolérance de la greffe cardiaque, mais pas de la greffe de peau chez les rongeurs [139].

L'augmentation des cellules régulatrices après administration d'anticorps anti-CD3 a été montrée dans le modèle de diabète spontané chez la souris NOD où les cellules T reg $CD4^+CD25^+CD62L^+$ qui produisent un taux élevé de TGFβ augmentent en nombre et sont capables de transférer une protection contre le diabète [140]. L'explication de phénomène pourrait être que l'anticorps monoclonal anti-CD3 imite l'action d'un peptide altéré qui pourrait aussi induire la tolérance [141]. La déplétion par des anticorps anti-CD3 dans les greffes rénales chez le singe inhibe le rejet aigu cellulaire, mais pas le rejet humoral [142]. Même si aucune corrélation avec la prolongation de survie n'a pas pu être prouvée chez les primates, l'utilisation d'un anticorps anti-CD3 induit cependant une fréquence élevée de cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+$ [143; 144].

4. Autres cellules cibles pan-T (TCR αβ, CD2, CD45, CD7…)

Cibler l'antigène CD2 avec des anticorps déplétants entraîne une survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat résultant d'une déplétion transitoire mais profonde des cellules T et de mécanismes immunorégulation qui sont apparemment impliqués dans le maintien de la tolérance à long terme [145]. Chez le primate, un anticorps monoclonal de rat anti-CD2 inhibant in vitro les réponses mitogéniques et allogéniques provoque une déplétion rapide des cellules T périphérique et prolonge légèrement la survie de l'allogreffe rénale [146]. Des données récentes issues de patients recevant une greffe de cellules hématopoïétiques haploidentiques, sans myeloablation, traités avec des anticorps anti-CD2 montrent une augmentation de cellules T régulatrices $CD4^+CTLA4^+FOXP3^+$ [147]. En effet, il a été observé des niveaux élevés d'ARNm FoxP3 dans une petite cohorte de receveurs de greffe rénale, traités avec des anticorps anti CD2 combinés à une greffe de moelle osseuse. Chez ces patients, il a été possible de stopper tout traitement immunosuppresseur 9 à 14 mois après la transplantation et la fonction rénale est restée stable pendant de nombreuses années [148]. La déplétion des cellules T en ciblant le TCRαβ [149] dans la transplantation cardiaque chez le rat entraîne une tolérance similaire, ce qui suggère que c'est bien la déplétion des cellules T en tant que telle qui importe, plutôt que de la spécificité de la cible moléculaire.

V. Cibler les sous populations T

1. CD4

Puisque les lymphocytes T CD4 helper orchestrent les réponses humorales et cellulaires, leur déplétion en utilisant des anticorps anti-CD4 semble être la meilleure stratégie pour parvenir à la tolérance des greffes de cœur [150] ou d'allogreffes de peau chez la souris [151] et le rat [152], seul ou en combinaison avec une injection donneur-spécifiques prétransplantation [153; 154]. La déplétion des lymphocytes $TCD4^+$ en allotransplantation rénale est moins efficace que ce soit chez le rat [155], le chien [156] ou le singe [157], la prolongation de survie est faible et la tolérance ne peut pas être atteinte. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'allogreffe de foie chez le rat [158]. Toutefois, la tolérance a été atteinte chez les rongeurs par dépétion des cellules T helper $CD4^+$ dans les allogreffe d'îlots [159], les allogreffes de pancréas et les xénogreffes d'îlots [160-162]. En outre, les anticorps déplétants anti-CD4 soignent les cas de diabète néoinduit, préviennent le diabète récurrent autoimmun, et retardent le rejet d'allogreffe d'îlots chez la souris NOD [163]. Par conséquent, la spécificité de l'organe est apparemment importante et la souche de souris semble aussi un facteur d'importance [162]. Il est intéressant de noter que la déplétion des cellules $TCD4^+$ modifie la réponse humorale aux alloantigènes qui a lieu par la suite. Lors des allogreffes cardiaques, on observe uniquement une production d'alloanticorps IgM à la place d'IgG [164]. Cela pourrait expliquer que la déplétion en cellules $TCD4^+$ protége du développement de vasculopathie chronique d'allogreffe chez la souris [165]. Enfin, alors que la déplétion des cellules Tregs naturelles ($CD4^+CD25^{high}$) par des anticorps anti-CD4 déplétant est considérée comme un problème majeur, Yi et al [166] ont publié récemment que les anticorps anti-CD4 déplétaient moins efficacement les Treg que les autres cellules T, ce qui entraîne une augmentation du ratio $CD4^+CD25^+/CD25^+CD4^-$ en périphérie, et donc favorise l'induction de la tolérance.

2. CD8

Les lymphocytes $TCD8^+$ cytotoxiques avec un phénotype mémoire ($CD45RO^+RA^-$ $CD45^+CD25^-$) sont très agressifs à l'égard des allogreffes [167] et résistants à la régulation immune [168]. Par conséquent, il apparaît important de dépléter spécifiquement ces cellules en transplantation. Curieusement, pourtant, la déplétion des cellules T cytotoxiques par des anticorps anti-CD8 n'est pas suffisante pour prévenir ou traiter le rejet aigu chez le mini porc [169], chez le chien [156] ou chez la souris [160; 170]. Bien que non protectrice contre le rejet, la déplétion des cellules $TCD8^+$ murines entraîne au niveau du greffon la production de cytokines de la voie Th2 au lieu de Th1 et augmente l'infiltrat de cellules éosinophiles, de grandes cellules mononucléaires et des cellules de type fibroblastes [170]. Chez le mini porc, même si la déplétion des lymphocytes $TCD8^+$ ne prolonge pas significativement la survie de la greffe en association avec la CsA, une inhibition de la prolifération dans ces greffons a été observée, suggérant que la déplétion des cellules $TCD8^+$ pourrait protéger de la vasculopathie chronique d'allogreffe [169]. Cependant, la déplétion des cellules $TCD8^+$ n'a aucun effet sur vasculopathie chronique d'allogreffe chez le rat [171] et augmente la gravité du rejet des allotransplantations de foie [158]. Dans une étude pilote menée sur 6 patients, la déplétion des cellules $TCD8^+$ a complètement stoppé le rejet aigu chez deux d'entre eux, par contre elle a été inefficace sur les quatre autres [172]. En revanche, la déplétion des cellules $TCD8^+$ induit un tolérance non donneur spécifique [117] dans le cas d'une transplantation de l'intestin grêle chez la souris, ce qui suggère que les cellules $TCD8^+$ joueraient un rôle important dans un rejet de ce type. Plus récemment, il a été décrit que la déplétion des cellules T mémoires par des anticorps anti-CD8, en combinaison avec une faible irradiation totale du corps, une irradiation du thymus, de l'ATG, des anticorps anti-CD154, un court traitement d'inhibiteurs de calcineurine, accompagnés d'une transplantation de moelle du donneur, pourrait induire la tolérance d'une allogreffe de rein transplanté précédemment chez le primate non humain. Dans ce modèle, la déplétion des cellules $TCD8^+$ est nécessaire pour induire la tolérance [168].

3. CD28

CD28 est constitutivement exprimée sur la plupart des cellules $TCD4^+$ et sur 50% des cellules $TCD8^+$. Bien que la plupart des anticorps anti-CD28 aient été utilisés pour stimuler [173] ou en tant qu'antagoniste [174] pour les cellules T, certains anticorps peuvent provoquer une déplétion des cellules cibles. En effet, même si le rôle physiologique de CD28 est de surréguler les gènes anti-apoptotiques dans le lymphocyte T après une stimulation antigénique, un fort signal de CD28 peut également conduire à l'apoptose des cellules T. Ceci est confirmé par l'observation que des cellules T humaine CD28 null manifestent une résistance à l'apoptose chez les patients souffrant d'arthrite ou de sclérose [175]. Yu et al ont étudié l'effet d'un anticorps anti-CD28 agoniste (clone 37.51) chez la souris et ont constaté une inhibition de l'expansion des cellules T du donneur. Ils ont aussi mis en évidence que cet anticorps empêche la GVHD par une déplétion sélective des cellules T allogéniques activées du donneur via l'apoptose, de manière IFNγ dépendante, mais épargne les cellules T qui ne reconnaissent pas les alloantigénes du receveur [176]. L'inconvénient d'éliminer les cellules $TCD28^+$ pourrait être de bloquer la régulation immunitaire puisque CD28 est exprimé par une sous-population de cellules Treg et est primordial pour leur expansion et leur survie [177]. Toutefois, certaines cellules régulatrices sont contrôlées par ICOS et non pas par CD28 [178] et d'autres sous populations T régulatrices, les cellules $CD8^+CD28^-$, fonctionnent indépendamment de CD28 [179; 180]. Par conséquent, la déplétion des cellules $TCD28^+$ pourrait encore être favorable, ou au moins épargner le développement ultérieur de certaines cellules Treg. A la différence des rongeurs et des primates, un agoniste des anticorps anti-CD28 ne peut pas être utilisé chez l'homme car il cause un relargage de cytokines (« cytokine storm »). Des anticorps agonistes anti-CD28 ont entraîné une défaillance de multiples organes chez six des volontaires sains dans une étude de phase I [73].

VI. Cibler les marqueurs d'activation des lymphocytes T

La déplétion sélective des lymphocytes T activés en tant que traitement immunosuppresseur peut entraîner le développement de cellules régulatrices capables d'induire la survie à long terme de l'allogreffe. La preuve de concept a été obtenue chez des souris conçues de telle sorte que les cellules T porteuse de la thymidine kinase qui métabolise le Ganciclovir, drogue non toxique, en un métabolite qui est toxique uniquement pour les cellules en division. Après la transplantation, cette approche déplète donc les cellules alloréactives en division. Le résultat a été un important retard dans le rejet de greffes de peau et de cœur et l'induction d'une tolérance immunitaire pour une partie des receveurs [181]. La transposition thérapeutique de cette stratégie requiert le ciblage d'un antigène qui serait hautement spécifique pour les cellules T activées. Jusqu'à présent, la cible parfaite est encore à identifier. C'est pourquoi nous avons orienté notre recherche vers LAG-3, décrit dans la dernière partie. LAG-3, en s'appuyant sur les résultats des études sur l'anticorps anti CD154, parait un cible idéale de part sa présence sur les lymphocytes et NK activés uniquement. Ainsi son utilisation permettrait de préserver un système immunitaire intact dans tous les compartiments et de cibler uniquement les cellules s'activant au niveau du greffon.

1. CD154 (CD40Ligand)

Le CD40 ligand est une molécule de costimulation de la famille des récepteurs membranaires au TNF exprimés principalement sur les lymphocytes $TCD4^+$ activés. Il est également exprimé à différents niveaux par les mastocytes, les macrophages, les basophiles, les cellules NK, les lymphocytes B, ainsi que les cellules non hématopoïétiques. Le CD40 ligand se lie au CD40 présent sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et induit l'activation de celle ci. Il régule aussi la fonction des cellules B en s'engageant avec le CD40 exprimé à la surface. Il est exprimé par les plaquettes au repos, et est rapidement exposé après stimulation. En effet, plus de 95% de CD154 exprimé dans le sang est présent sur les plaquettes. Cette molécule sert de récepteur pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ présente sur les plaquettes stimulées. L'interaction CD154/$\alpha IIb\beta 3$ est impliquée dans la stabilisation des thrombus artériels. L'importance

de cette interaction a été mise en évidence après l'administration d'un anticorps humanisé anti-CD154 qui a induit une thrombose chez les patients, un événement indésirable qui a entraîné l'interruption des essais cliniques en attendant une nouvelle évaluation pré clinique. Or, des phénomènes de thromboses ont été trouvés sur 4 des 9 animaux traités avec l'anticorps anti-CD154 (5C8.33) [182] dans un modèle primate non humain de greffe de rein qui implique un protocole incluant une irradiation totale du corps non myeloablative, une irradiation thymique, de l'ATG, une injection de moelle osseuse du donneur et un mois de cyclosporine A. L'administration de l'héparine pourrait, cependant, réduire l'incidence des complications thromboemboliques. Dans un premier temps, les traitements de courte durée avec l'anticorps anti-CD154 induisant une survie à long terme de la greffe chez les souris et les primates [183; 184] ont été interprétés comme ayant un effet bloquant sur la costimulation. Toutefois, Monk et al.[183] a montré qu'une grande partie de l'efficacité de la thérapie anti-CD154 ne découle pas d'un blocage de la costimulation, mais de la déplétion des cellules T activées. Le résultat est une déplétion sélective des cellules T potentiellement agressives qui ont reconnu l'antigène. De plus, anti-CD154 semble épargner les cellules T régulatrices qui, bien qu'exprimant CD154, pourraient exposer peu d'antigènes ou avoir une fonction plus importante après le blocage CD154 [129].

2. IL2Ra/CD25

Le récepteur à l'IL-2 est composé de 3 protéines : la chaîne α, β et γ, la première étant l'antigène CD25. CD25 n'est pas exprimé sur les lymphocytes non stimulés, mais il est rapidement transcrit et exprimé sur les cellules T activées [185].

L'administration de l'anticorps anti-CD25 chez les rongeurs en synergie avec une dose sous thérapeutique de cyclosporine induit une tolérance à l'allogreffe d'îlots pancréatiques [186]. La tolérance peut être atteinte dans plusieurs modèles expérimentaux de transplantation en utilisant des anticorps anti-CD25 (revu par Strom et al [187]), probablement parce que beaucoup de cellules T activés IL-2R+ sont déplétées.

Toutefois, CD25 est également exprimé sur les cellules Treg à des niveaux très élevés, et les anticorps anti-CD25 pourraient bloquer ces cellules. L'administration d'un anticorps anti-CD25 déplétant (clone PC61) a réduit le taux de cellules Treg $CD4^+CD25^+$ dans le foie et la rate du receveur et induit le rejet aigu [188] dans un modèle de souris où l'allogreffe de foie est acceptée spontanément. Un effet semblable a été observé dans un modèle souris de greffe cardiaque de souris de souche bm 12 sur des receveuses C57BL/6 où l'administration de l'anticorps PC61 induit une diminution significative du pourcentage des cellules $TCD4^+$ $TCD8^+CD25^+$ dans la rate et casse la tolérance pourtant induite par l'administration d'anticorps anti-CD4 [189]. De plus, la déplétion des cellules $TCD25^+$ induit le rejet [189] dans le modèle où la greffe de peau male CBA / Ca est spontanément acceptée par la receveuse femelle CBA / Ca exprimant un récepteur cellulaire T anti-HY (antigène mâle). Dans la pratique clinique, les deux anticorps monoclonaux anti-CD25 disponibles (Dacluzimab et Basiliximab; antagonistes du récepteur à IL2) montrent une diminution dans la capacité de tuer directement les cellules $TCD25^+$ par rapport à leurs homologues murins et n'interférent pas avec le compartiment T reg dans le rein [190]et le cœur [191] transplantés. En outre, le Daclizumab est décrit comme induisant une baisse graduée du taux circulant de cellules $TCD4^+$ et $CD8^+$ et une expansion des cellules régulatrices NK $CD56^{bright}$ chez les patients atteints de la sclérose en plaques. Ces cellules régulatrices agissent négativement sur les cellules T activées et pourraient participer à l'effet thérapeutique de l'anticorps [192].

3. Les isoformes CD45

CD45 est une protéine tyrosine phosphatase impliquée dans la transduction du signal et le début de l'activation par l'IL-2, IFNγ et TNFα. De multiples isoformes de CD45 sont exprimées à différentes densités sur les cellules hématopoïétiques, selon l'état de différenciation [193]. Les cellules T cytotoxiques, les cellules T helper et la plupart des thymocytes expriment CD45RB. Les cellules $CD4^+$ qui expriment une forte densité de CD45RB ($CD45RB^{high}$, chez la souris) et CD45RC ($CD45RC^{high}$, chez le rat) à la surface sont des cellules naïves qui ont été identifiées comme étant la cause d'un certain

nombre de maladies auto-immunes. L'auto-immunité provoquée par ces cellules $CD45RB^{high}$ est inhibée par les cellules $CD4^{+}CD45RB^{low}$. De plus, les cellules $CD45RB^{high}$ sont associées avec le rejet de greffe du pancréas [194]. En revanche, les cellules $CD45RB^{low}$ expriment FoxP3 [195], exercent une activité de régulation et inhibent le rejet d'allogreffe [196]. Les souris transplantées rénales recevant un traitement d'induction composé d'anticorps anti-CD45RB (clone MB23G2) acquièrent une fonction rénale du greffon normale [197]. Au niveau cellulaire, MB23G2 cause une baisse significative du nombre de lymphocytes circulants, suivi d'un retour à la normale une semaine après. Ces cellules présentent ensuite une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine PLCγ1, ce qui est une propriété des cellules T anergiques [198]. Dans un modèle de greffe cardiaque, le même anticorps anti-CD45RB induit un enrichissement de la population $CD45RB^{low}$, prolonge la survie en monothérapie et induit la tolérance s'il est associé à la Rapamicine. Par conséquent, la balance $CD45RB^{low}/CD45RB^{high}$ correspond à l'élément critique dans l'induction de tolérance par ce traitement [195]. L'anticorps anti-CD45RB induit également la tolérance aux allogreffes d'îlots pancréatiques [199].

L'infiltrat autour des îlots dans les animaux traités montre une légère augmentation des cellules CD4, une diminution des cellules CD8, et une réduction dans l'intensité d'expression des CD45RB, associées à une augmentation de l'expression des transcrits dans le greffon pour l'IL-4 et l'IL-10.

Ceci correspond à l'émergence d'une sous population distincte de cellule T régulatrices [199].

Les isoformes CD45RA et CD45RO sont utilisées chez l'homme afin de faire la différence entre les cellules T naïves et mémoires, respectivement [200; 201]. Dans le sang périphérique, les cellules $CD45RA^{+}$ expriment également des niveaux élevés de CD45RB, alors que les cellules CD45R0 expriment peu de CD45RB. Un anticorps de souris anti-CD45 humain (clone 6G3) a été testé en monothérapie chez les primates et a retardé le rejet de greffes de rein, à plus de 200 jours pour 2 des 6 animaux (durée médiane de survie = 27 jours) [202]. Dans ces essais, le ratio $CD45RB^{high}/CD45RB^{low}$ a diminué au cours du traitement et était de nouveau à la normale un mois après. En bithérapie avec le Tacrolimus, la durée médiane de survie a été prolongée à 72 jours [202].

VII. Conclusion

Que la déplétion des cellules T entraîne ou empêche le développement de la tolérance immunitaire n'est pas encore claire car d'une part, elle peut dépléter les cellules régulatrices, mais d'autre part, ces cellules peuvent dans un deuxième temps dominer à la suite d'une expansion sélective. D'autres investigations seront nécessaires pour comprendre si la déplétion sélective de sous population cellules T effectrices, en épargnant les cellules régulatrices existantes, pourrait être une meilleure stratégie. La cible idéale, toutefois, exprimée par des cellules effectrices alloréactives mais pas par les cellules au repos et les cellules T régulatrices, doit encore être défini.

Tableau 1 : Anticorps déplétants les cellules T et leur effet en transplantation.

Molecule cible/ réactif	Mécanisme d'action	Impact sur la tolérance du transplant
Toutes les cellules T		
Thymocyte (ATG)	Rapide et importante lymphopénie CDC/ADCC/opsonisation/phagocytose	• Expansion des Treg dans les allogreffe de rein chez l'homme [125]
CD52 (Campath-1)	Cytotoxicité	• Expansion des Treg et mutation des myeloïde en DC plasmacytoide régulatrice dans les allogreffes de rein humains [203; 138]
CD3	Activation du complément /ADCC / apotose	• Inhibition du rejet aigu mais pas humorale [142]. • Haute fréquence de Treg $CD4^+CD25^+$ dans les allogreffes de rein chez les NHP [143; 144]. • Tolérance pour les greffes de Coeur mais pas pour la peau chez les rongeurs [139]
CD2	Transitoire mais importante déplétion des cellules T Inhibition des réponses mitogéniques et allogéniques	• Survie au long terme de greffe de coeur chez le rat [145] • Prolongation de survie des reins chez les NHP [146] • Haut taux d'ARNm de FoxP3 dans les greffes rein chez l'homme [148]
TCR $\alpha\beta$	Déplétion transitoire des cellules T	• Tolérance chez les rongeurs [149]
Sous populations cellules T		
CD4	Importante déplétion des cellules T CD4	• Tolérance des greffes de Coeur, peau et îlots chez le rat [150-152; 159] • Pas de tolérance; modeste prolongation des modèles de rein et foie (souris, chien et NHP) [155-158] • Prolongation des greffes de pancréas et d'îlots xéno chez les rats [160-162]
CD8	Transitoire mais importante déplétion des cellules T CD8 Déplétion des cellules T CD8 donneur spécifique	• Pas d'effet sur les greffes de coeurs chez la souris et le mini pig [169-171] • Prolongation modérée pour les greffes de reins chez le chien [156] • Tolérance non donneur-spécifique pour la greffe d'intestin chez la souris [117] • Tolérance avec une faible dose d'irradiation totale du corps, irradiation thymique, antithymocyte globuline, anticorps anti-CD154 et un court traitement d'inhibiteur de calcineurine + transplantation de moelle osseuse du donneur dans rein chez primates [168]
CD28	Apoptose induite par mort cellulaire	• Prévention de graft versus host disease [176]
Marqueurs d'activation des cellules T		
CD154 (Hu5C8)	Apoptose de cellules T activées	• Tolérance possible des greffes de rein chez les primates et greffe de peau chez souris [182; 204]
LAG-3	Cytotoxicité cellulaire complément dépendante	• Prolongation des survies de greffes de coeur chez le rat mais pas tolérance [205]
IL2/CD25 (PC61/immunotoxine)	Déplétion /immunotoxycité	• Pas de tolérance de greffes de foie ou coeurs chez la souris [188]
CD45 (MB23G2/6G3)	Enrichissement des cellules T CD45RBlow	• Tolérance des greffes de rein chez la souris [197] • Prolongation de survie et tolérance avec la rapamycine dans greffes de cœur chez souris [195] • Prolonge survie de greffes de rein chez les primates [202]

Lymphocyte activated gene 3 : LAG-3

I. La molécule

1. Gène

LAG-3 a pour particularité d'être très proche de CD4 tant au niveau génétique que protéique. Le séquençage, l'organisation exon/intron et la localisation chromosomique (chromosome 12 (band p13.3)) montrent que *lag3* et *cd4* sont localisés sur le même locus, seulement séparé par 6kb [206]. Certains émettent la possibilité que *lag3* résulte d'une duplication de gène [207; 208]. En effet, les gènes *lag3* et *cd4* partagent peut-être même quelques éléments de régulation [209]. La transcription est initiée par 2 sites : une GC box, 80 paires de bases en amont du site majeur de transcription, forme un promoteur minimal qui est régulé par 2 régions en amont contenant des éléments régulateurs positifs et négatifs avec de multiples sites de liaison de protéine ; et une région de 100 paires de bases en aval du site de départ de transcription est impliquée dans le contrôle cellulaire spécifique [209]. Ces motifs semblables à ceux trouvés sur le gène *cd4* laissent penser que *lag3* pourrait être contrôlé par des éléments régulateurs de *cd4*.

Du fait de sa structure, LAG-3 fait partie de la superfamille des Ig (IgSF). Il s'agit d'une protéine membranaire de 498AA avec 4 domaines extracellulaires ayant une forte homologie entre les domaines 1 et 3, ainsi que 2 et 4 avec la particularité d'inclure une extraloop au milieu du domaine D1 [208]. Cette protéine est très bien conservée entre les espèces puisqu'au niveau de la séquence codante l'homologie rat-homme et rat-souris est respectivement de 83% et 88%. Au niveau protéique cela se traduit par 67% et 84% [210]. Les transcrits du gène *lag3* ne se retrouvent pas dans tous les organes. En effet, son ARNm n'est retrouvé qu'au niveau du thymus, de la rate, du cerveau, du foie, du poumon et de l'intestin grêle. Aucun transcrit n'est détecté dans les reins, le cœur ou la peau chez l'homme. La souris se distingue en exprimant l'ARMm LAG-3 dans la peau mais pas dans les poumons et le foie [210; 211]. Cependant, l'expression de LAG-

3 à la surface des cellules est restreinte aux sites inflammés. Ainsi, LAG-3 n'est trouvé ni dans les organes lymphoïdes primaires (thymus adulte et moelle) ni dans les organes lymphoïdes secondaires en conditions normales, comme la rate et les ganglions. Différents types cellulaires expriment LAG-3 : les cellules T activées, les cellules NK activées, les cellules B activées en présence de T [212], et récemment sa présence sur les pDC a été évoquée [213].

2. Expression

LAG-3 n'est pas une protéine ubiquitaire. L'expression de LAG-3 varie en fonction des cellules (6 fois plus exprimée sur les T que sur les B)[212], de leur phénotype (63% CD3, 53%CD25, 58% CD4 60% CD8, 3% CD3-) [214] et des organes. En effet, elle est principalement exprimée in vivo sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ activés résidant dans des organes lymphoïdes secondaires ou des tissus inflammés, comme les tumeurs, les greffons ou les amygdales inflammées [215], mais pas dans la rate, le thymus ou le sang. Au niveau des tumeurs, 11 à 48% des lymphocytes infiltrant les tumeurs sont LAG-3+, et CD8+ pour la plupart (dans les lymphomes comme dans les mélanomes) [216].

L'activation in vitro de PBMC permet d'évaluer clairement la cinétique d'expression de cette molécule au cours d'une activation du système immunitaire. La détection de LAG-3 se fait dès J1, l'expression à la surface de la cellule est à son maximum à J2, puis décroît jusqu'à J8 pour finalement devenir indétectable à J11. Cette expression peut être induite par l'ajout d'IL-2 alors que l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, le TNFα, le TNFβ et l'IFNγ n'ont aucun effet [209; 217; 218]. L'expression de LAG-3 sur les cellules T activées peut être surrégulée en présence de différentes cytokines telles que l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-12. En effet cette dernière est nécessaire pour une induction optimale de LAG-3 [219]. L'expression de LAG-3 sur les cellules TCD4$^+$ activées humaines apparaît comme préférentiellement associée à la voie d'activation/différentiation qui mène à la production d'IFNγ, la voie Th1 [215]. Cette distinction est confirmée par l'absence d'ARNm codant pour LAG-3 dans les clones Th2 [215].

Différentes études ont montré l'existence d'une protéine LAG-3 de 70kDa et d'une autre de 45kDa. Ces protéines correspondent au LAG-3 complet et au LAG-3 soluble (sLAG-3) clivé au niveau de la membrane. Le clivage est fait au niveau du CP (connecting peptide) de 20aa situé entre la région transmembranaire et le domaine D4 et il est indispensable et suffisant pour le clivage. Ce clivage est réalisé par des métalloprotéases ADAM-10 et ADAM-17. ADAM-10 semble assurer un clivage régulier de LAG-3 puisque sLAG-3 est réduit de 90% dans les souris ADAM10-/-. ADAM-17 jouerait un rôle plus important lors de l'activation car son activation est dépendante du signal TCR induit par PKC. Il existe donc 2 voies indépendantes susceptibles de cliver LAG-3 membranaire [220]. La production de sLAG-3 est détectable à J2 et continue d augmenter jusqu'à J6 [221]. La quantité de sLAG-3 varie en fonction des cellules, les pDC activés produisent 5 fois plus de sLAG-3 que les T activés [213].

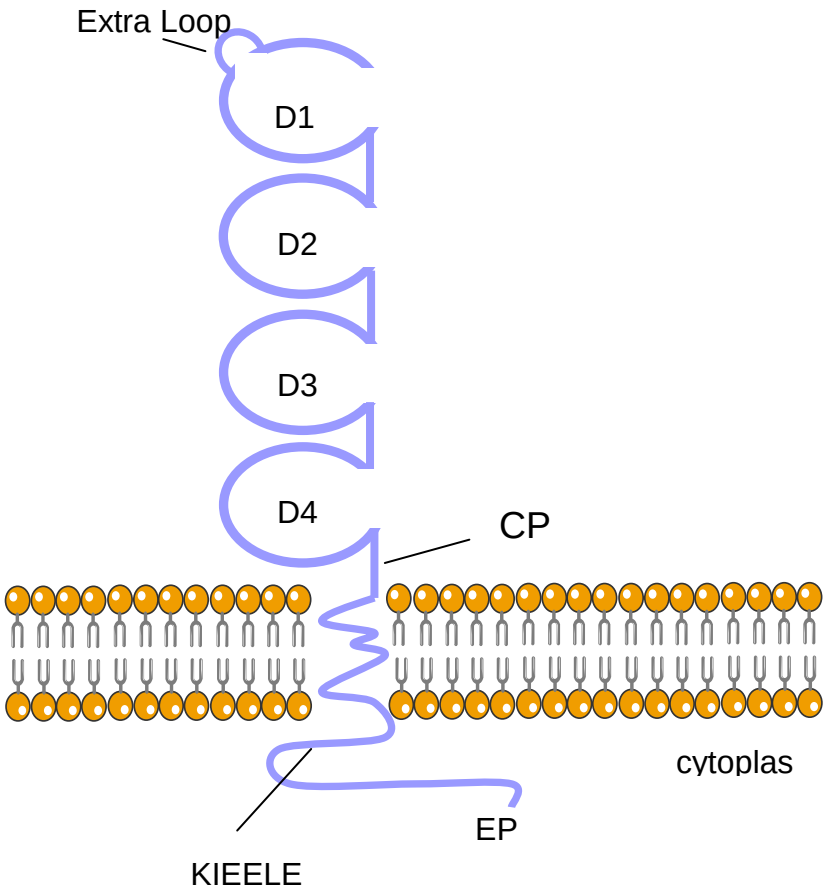


Figure 5 : schema de LAG-3

3. Interaction

LAG-3 est spécifiquement associé avec le complexe CD3. LAG-3 est une molécule codistribuée avec le CD8 et faiblement avec le CD4. Diverses études ont montré que LAG-3 est associé avec le CMH-II. Ainsi, de ces distributions et associations résulte un assemblage CD3/CD8/LAG-3/CMH-II organisé en radeau lipidique, un phénomène connu pour réguler les événements précoces d'une activation des T [222]. L'activité de la protéine LAG-3 nécessite des interactions intra et extracellulaires. Au niveau extracellulaire, différents études ont montré une interaction LAG-3 : CMH-II [223]. Les résidus des régions déterminant la complémentarité (CDR 1 et 2) situées à la base de l'extraloop sur le domaine D1 sont essentiels soit pour la liaison (D30, H56, Y77, R103) soit pour la répulsion (R73, R75, R76) du CMHII [224]. En utilisant une protéine de fusion LAG-3Ig ayant une avidité intermédiaire (Kd=60nM, 37°C) comme compétiteur dans un test d'adhésion cellulaire CD4 :CMH-II dépendant, Huard a montré que cette molécule recombinante était capable de bloquer l'interaction CD4 :CMHII. Par contre, aucune inhibition n'était observée dans le cas d'un test de cytotoxicité CD4 :CMH-II dépendant. Ces résultats suggèrent que le coengagement du TCR avec le CD4 altère l'interaction CD4 :CMH-II devenant insensible à la compétition avec le LAG-3Ig [225]

II. Les différents rôles de LAG-3

1. Un rôle d'activation

L'expression de LAG-3 ne se faisant qu'entre 24 et 48 heures après l'activation du lymphocyte, cette molécule contrairement à d'autres ligands du CMH comme le CD4 ou le CD8 ne joue pas de rôle dans la phase d'induction de l'activation de la cellule T [224]. Cependant sa présence à la surface de celui-ci va jouer un rôle dans l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. En effet l'interaction LAG-3 :CMH-II, avec l'interaction CD40-CD40L entraîne la production de l'IL12 et de l'IFNγ par les CPA, in vitro [219]. Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) exprimant comme les CPA, la molécule de CMH-II, il a été étudié si le contact entre cellules T via l'interaction CMH-II :LAG-3 avait une influence sur la reconnaissance des cellules tumorales. Au cours de cette étude, l'ajout d'un anticorps anti-LAG-3 n'a d'influence ni sur la cytotoxicité des

cellules T $CD8^+$ ni sur la reconnaissance entre une cellule transfectée LAG-3 et une RCC (renal cell carcinomas). Par contre, la protéine de fusion LAG-3Ig induit une maturation de DC. Ces résultats soutiennent l'idée d'un rôle des TIL $LAG\text{-}3^+$ dans l'engagement du CMH-II des CPA et, par conséquent, ils contribuent à l'activation des CPA et à l'engagement Th1/Tc1 sans diminuer la cytotoxicité.

Une étude sur des souris $LAG3^{-/-}$ a révélé un problème dans le compartiment des cellules NK plutôt que le compartiment des cellules T. En effet, la mort des cellules tumorales est inhibée ou abolie alors que la lyse dépendant du CMH-I est intacte. Ces résultats laissent apparaître que LAG-3 joue un rôle de récepteur ou corécepteur qui définit un mode spécifique des NK chez la souris [226]. Ces résultats ne sont cependant pas transposables chez l'homme puisqu'aucun anticorps ou protéine recombinante n'a un effet positif ou négatif sur la cytotoxicité. LAG-3 n'a donc pas d'effet dans la cytotoxicité des NK, réfutant la théorie d'un mode spécifique chez l'homme [227]. LAG-3 a un effet sur les T et pas sur les NK. Or les NKT ont les propriétés intrinsèques des NK et des T. C'est pourquoi Byun et son équipe ont évalué si LAG-3 avait un effet sur les NKT $CD1d^+$. Les résultats montrent que l'expression de LAG-3 entraîne une sous régulation de la prolifération des NKT les bloquant en phase S du cycle cellulaire [228]. LAG-3 a donc une forte implication dans l'activation des T et des NKT.

2. Un rôle de régulation

LAG-3 molécule régulatrice plutôt qu'activatrice comme CD4 a été suggérée par les résultats de Huard. Il a montré qu'un anticorps anti-LAG-3, en bloquant l'interaction LAG-3 :CMH-II, augmentait l'activation des cellules T CD4+ [229]. Par la suite, les effets régulateurs de LAG-3 sur le signal d'activation induit par le TCR ont été démontrés sur des cellules T activées. Le cross linking de LAG-3 induit une inhibition du flux calcique et une anergie de la cellule [230]. Dans un premier temps, cette régulation a été expliquée par une compétition entre LAG-3 et le CD4 pour interagir avec le CMH-II. Cette hypothèse était d'autant plus plausible que LAG-3 a une plus forte avidité que CD4 pour le CMH-II [229]. Cependant, Workman montra que LAG-3 dépourvu de sa partie cytoplasmique et plus particulièrement du domaine conservé KIEELE ne pouvait inhiber la fonction des cellules T CD4. Il est alors plus probable

que LAG-3 inhibe directement les cellules T par un signal intracellulaire plutôt qu'en bloquant les interactions [231].

Workman a par la suite avec l'utilisation de souris LAG-$3^{-/-}$ montré que LAG-3 n'avait pas d'autres fonctions que régulatrices au niveau des cellules T. Les cellules LAG-$3^{-/-}$ prolifèrent de la même façon que les cellules LAG-3^{+} face à une stimulation SEB ou antigène. Cependant, leur expansion est plus faible à cause d'une mortalité plus importante. En effet, ces cellules continuent de produire de l'IL-2 et de l'IFNγ même après la stimulation. Vignali a observé que ces cellules ont un retard dans le cycle cellulaire entraînant une surmortalité et qui pourrait expliquer le phénomène. L'absence de LAG-3 empêche une régulation de l'activation de la cellule, en limitant le nombre de division cellulaire, et donc en accroissant la mortalité des cellules [232]. Cette régulation directe des T effecteurs a été confirmée dans des travaux de la même équipe. L'interaction CMH-II :LAG-3Ig entraîne une sous régulation de la prolifération des cellules TCD4+ Ag spécifique et des cytokines sécrétées. Cet effet inhibiteur est observé au niveau des cellules effectrices et non des APC. Ceci suggère un rôle de LAG-3 dans le contrôle de la réponse des cellules $TCD4^{+}$. Cette interaction est médiée par un contact entre cellules T, vraisemblablement par un signal négatif du CMH-II dans la cellule T [223]. Contrairement aux conclusions tirées des premières analyses des souris LAG-$3^{-/-}$ de Miyasaki, LAG-3 joue un rôle important dans la régulation de l'expansion des T primaires activés et dans le développement de T mémoires, [226; 233]. En effet, ces souris présentent un nombre de T plus important lors d'une infection. LAG-3 régule donc l'expansion et contrôle la taille du pool T mémoires [234]. Ces résultats suggèrent que bloquer LAG-3 par un anticorps pourrait être un moyen d'augmenter le nombre de cellules mémoires après une vaccination [235]. Au niveau biochimique, bloquer LAG-3 entraîne une augmentation de CD69 (molécule de surface induite au début de l'activation), une expansion des cellules T et une hausse de la production des cytokines Th1 (IFNγ, IL-2, TNFα mais pas IL-4, IL-5, IL-10) mais pas d'effet sur cytokine Th2 [236]

LAG-3 possède une activité cellulaire régulatrice intrinsèque et extrinsèque ([237; 238]. En effet, l'expression de LAG-3 sur les T effecteurs permet une régulation de leur homéostasie (comme vu précédemment) mais LAG-3 est aussi exprimé sur les T régulatrices et leur confère une fonction suppressive. Les cellules T régulatrices vont

agir sur la prolifération des cellules T mais aussi sur la maturation des DC [239]. Dans un modèle d'anterior chamber associated immune deviation ACAID, un modèle systémique de tolérance immune, les cellules T $CD4^+CD25^+$Foxp3+ exprimant CTLA4 et LAG-3 jouent un rôle important dans l'induction de l'ACAID et sont une importante sous population des Treg [240]. Pendant l'interaction des Treg avec les DC, la liaison LAG-3 :CMH-II induit une voie inhibitrice par un signal ITAM, impliquant l'activation ERK et le recrutement de SHP-1 qui supprime la maturation des DC et leur capacité d'immunostimulation [241]. Il a été montré que le signal LAG-3 était important dans la régulation par les Treg $CD4^+$ des réponses autoimmunes. Grosso démontre que LAG-3 maintien la tolérance des antigènes du soi et des tumeurs par un effet direct des cellules T $CD8^+$ spécifiques d'antigène. En effet, l'expression de LAG-3 qui est faible sur les cellules T CD8+ naïfs augmente avec une stimulation par un antigène exprimé par un organe ou une tumeur. Or le blocage par anticorps de LAG-3 ou sa suppression par modification génétique entraînent une augmentation du nombre des cellules $TCD8^+$ effectrices spécifiques d'antigène dans les tumeurs ou organes exprimant cet antigène. Le blocage combiné avec une vaccination spécifique antitumorale entraîne une perturbation au niveau de la tumeur. Ces résultats montrent un rôle direct sur les T $CD8^+$ et suggère que le blocage de LAG-3 peut être un traitement contre le cancer [242]. Dans le cadre de maladies chroniques telles que l'hépatite B ou C, les cellules T $CD8^+$ effectrices sont corégulées par de nombreux récepteurs diminuant petit à petit leur capacité de réponses. PD1 et LAG-3 font partie des récepteurs principaux, bloquer les 2 simultanément permet une restauration de la fonctionnalité des T $CD8^+$ et par conséquences une diminution de la charge virale [243]

3. Un rôle de marqueur

La molécule LAG-3 constitue un excellent marqueur en biologie cellulaire. Ayant une fonction d'activation, LAG-3, plus particulièrement sLAG-3, se trouve être un marqueur d'activation de la voie Th1. En effet, sLAG3 est présent en forte concentration dans le sérum des personnes atteintes de la SEP qui est une maladie due à une réponse Th1/Th0. LAG-3 soluble est ainsi un marqueur d'une réponse Th1, de la même manière que sCD30 marque une réponse TH2 [215]. Avant la découverte de son

expression sur les lymphocytes B, Vignali avait souligné que LAG-3 serait un meilleur marqueur des T activés que CD69 bien qu'ayant une expression plus lente [211].

CD25 est actuellement utilisé comme marqueur des Treg non pas parce qu'il leur confère une activité régulatrice mais parce que ces cellules régulatrices subissent une activation pour effectuer leur régulation ce qui génère du CD25 [237]. C'est pourquoi certains expriment l'idée que LAG-3 serait un meilleur marqueur pour les cellules régulatrices. LAG-3, bien que n'étant pas indispensable à un effet inhibiteur pour toutes les cellules T [231; 232], marque la population ayant une activité régulatrice et contribue à leur activité de suppression. En effet, LAG-3 module in vitro et in vivo la fonction suppressive et l'expression ectopique de LAG-3 est suffisante pour conférer l'activité régulatrice [237].

En plus, d'être un marqueur de la voie Th1 et des principales cellules régulatrices (T $CD4^{+}CD25^{+}$), la forme soluble de LAG-3 peut constituer un biomarqueur. L'étude sur une cohorte de 246 malades a montré que la rémission ou la survie pour les cancers avec une tumeur positive aux récepteurs estrogènes ou progestérones sont corrélées avec la détection de sLAG-3 dans le sérum. Cela signifie que sLAG-3 peut être un marqueur de pronostique dans certaines formes de cancers du sein [244]. Son rôle de biomarqueur ne s'arrête pas au cancer du sein puisqu'il semblerait que dans les angines de poitrines instables LAG-3 sur les T soit corrélé avec sCD8 dans le sang [245].

III. LAG-3Ig

LAG-3Ig (IMP731, Immutep, France) appelé aussi sLAG-3 est une protéine de fusion contenant la partie extracellulaire de LAG-3 et une partie Fc humaine. Cette molécule est destinée à être utilisée dans le domaine de la cancérologie. Les expériences in vitro montrent qu'il a un effet puissant sur la différenciation des monocytes. En effet, il diminue la différenciation des monocytes en macrophage et en DC. Les DC obtenues ont une plus faible capacité de présentation. Par contre, son action, après différenciation des monocytes, sur la maturation des DC obtenue est différente [246]. Il induit un phénotype de maturation des DC dérivés de monocytes et la production de chimiokines et cytokines comme le TNFα, augmentant ainsi la capacité des imDC à activer des T naïfs par un facteur 4. En association avec des doses optimales ou sous optimales de

hCD40L, il fonctionne comme un puissant facteur de costimulation et induit une pleine activation des DC avec forte production d'IL-12p70. LAG-3 a donc un rôle crucial dans l'interaction T- DC, quand il est exprimé par les cellules T, et il envoie un signal essentiel dans la voie d'activation pour augmenter la quantité d'IL12 produite [247]. D'autres études ont établi que lors d'une immunisation contre un antigène (particulaire ou soluble), l'IMP321 favorise une réponse CTL plus forte, une prolifération des splénocytes et une meilleure réponse Th1 mais pas Th2. Le traitement avec du LAG-3Ig engendre des très bons résultats chez la souris. Aussi bien sur des souris immunisées où il induit un titre d'anticorps contre l'antigène supérieur à la normal que sur les souris ayant une tumeur où il permet d'augmenter la réponse. Ces résultats suggèrent que LAG3Ig est un bon adjuvant [248] [249] d'autant plus qu'il est bien toléré chez l'homme. Cependant, il semble le seul à avoir un effet activateur sur la DC. En effet, LAG-3 membranaire a un effet inhibiteur et LAG-3 soluble après clivage n'a aucun effet sur la DC que ce soit activateur ou inhibiteur. La question qui subsiste est donc de savoir si la présence d'un fragment Fc sur le LAG-3Ig lui confère une activité biologique [241] particulière.

Cette protéine de fusion avec activité adjuvante devient un outil thérapeutique prometteur en cancérologie. Comme évoqué précédemment, sLAG-3 peut être un marqueur pronostique dans certaines formes de cancers du sein. On ne connait cependant pas le rôle biologique propre de sLAG-3, comme par exemple son rôle potentiel dans l'activation des DC. Son rôle potentiel peut être soit direct sur la régression des tumeurs soit indirect en inhibant les Treg LAG-3^+ spécifiques de tumeur par une compétition avec le CMH-II [244]. En effet, un traitement LAG-3Ig et GM-CSF augmente la survie du rat dans un modèle de myelome B16 par rapport à une monothérapie classique. Ce traitement induit des cytokines de types Th1 et Th2, une augmentation du nombre de T CD8+ secrétant IFNγ, une infiltration plus rapide des TCD8^+ effecteurs activés et une augmentation de la réponse humorale. Cette activation du système immunitaire entraîne une protection contre la tumeur qui implique une coordination des T et des B [250].

Dans le cancer du sein, les résultats préliminaires sont encourageants. En effet, associé avec le paclitaxel, on observe une réponse clinique de 50% contre 25% avec le paclitaxel seul. L'IMP321 ne se cantonne pas au cancer du sein. En effet, en tout 8

essais cliniques sont réalisés, en cours ou planifiés pour 2009. Ces essais sont faits dans le cadre de protocole d'adjuvant de vaccination , de monothérapie dans le cancer du rein, ou de chimio-immunothérapie (cancer du sein et pancréas). Depuis quelques mois, cette molécule fait l'objet d'un essai clinique en phase I dans le cadre d'une tumeur pancréatique. L'IMP321 est associé au gemcitabine à différentes doses en sous cutané. Cette étude permettra d'établir sa pharmacocinétique, pharmacodynamique, immunogenicité, son effet et son mécanisme d'action sur cette tumeur.

Résultats

I. Etude rongeur : article n° 1

Depletion of LAG-3 Positive Cells in Cardiac Allograft Reveals Their Role in Rejection and Tolerance

Thomas Haudebourg,[1] Anne-Sophie Dugast,[1] Flora Coulon,[1] Claire Usal,[1] Frederic Triebel,[2] and Bernard Vanhove[1,3]

Background. Lymphocyte-activated gene-3 (LAG-3, CD223) is upregulated during the early stages of T-cell activation and could be the target of cytotoxic antibodies for induction therapy in transplantation.
Methods. Fully vascularized heterotopic allogeneic heart transplantation was performed in rats across a full major histocompatibility complex–mismatch barrier (LEW.1W into LEW.1A). Recipients received two injections (day 0 and 3) of cytotoxic antibodies directed to the extra-loop of LAG-3 immunoglobulin (Ig)-like N-terminal domain or control antibodies.
Results. LAG-3 mRNA transcripts accumulated in cardiac allografts undergoing rejection, but not in peripheral lymphoid organs. Administration of anti-LAG-3 antibodies on the day of transplantation did not modify alloreactivity of T lymphocytes from the spleen and did not change the alloantibody response. However, it inhibited graft infiltration by effector mononuclear cells, reduced intragraft levels of interferon-γ mRNA and prolonged allograft survival from 6 days in controls to a median of 27 days. Anti-LAG-3 antibodies were also active in prolonging survival when administered in a delayed manner, after rejection onset. LAG-3 being also expressed by activated regulatory T (Treg) cells, we tested the effect of anti-LAG-3 antibodies on graft acceptance after donor blood transfusions, a Treg-dependent tolerance induction model. We found that tolerance induction was prevented by anti-LAG-3 antibodies.
Conclusions. Targeting LAG-3-positive cells with cytotoxic antibodies is immunosuppressive in transplantation by depleting effectors T cells and therefore may represent a treatment for rejection episodes focused only on pathogenic cells. However, it might not be compatible with tolerance-induction strategies.

Keywords: CD223, Acute rejection, Cytotoxic antibodies, Heart graft, Rat.

(*Transplantation* 2007;84: 1500–1506)

Selectively depleting activated T lymphocytes might represent an immunosuppressive induction treatment able to result in the development of regulatory cells supporting a long-term survival of allogeneic organs in mice and primates (*1*). This has actually been demonstrated with anti-CD154 antibodies that deplete in vivo activated T cells through a Fc-dependent mechanism (*2*). However, anti-CD154 antibodies also target activated platelets in humans and affect the stability of arterial thrombi (*3*). Therefore, the development of monoclonal antibodies to other molecules specific for T-cell activation has catalyzed attempts to achieve a tolerogenic immunosuppression. One such molecule is lymphocyte-activated gene-3 (LAG-3, CD223), which engages Class II dendritic cells (DC) with a high affinity, enabling DC to become activated (*4–6*). The LAG-3 protein is expressed in vivo in activated $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes residing in inflamed secondary lymphoid organs or tissues but not in spleen, thymus or blood (*7*). In addition, LAG-3 can function as a negative regulator of activated human CD4 and CD8 T cells by inhibiting early events in primary activation (*8*). Unstimulated $CD4^+CD25^+$ regulatory T (Treg) cells, although expressing high levels of LAG-3 mRNA, do not express LAG-3 protein on cell surfaces in mice. However, they do so after activation and their optimal function is dependent on LAG-3 (*9*). $CD4^+CD25^+$ Treg cells expressing LAG-3 have also been described in the rat (*10*).

Because LAG-3 is expressed specifically on activated T cells, we predicted that an induction treatment with anti-LAG-3 antibodies that deplete target cells might prevent development of alloreactive effector T cells and represent an effective treatment of rejection in transplantation. However, a depletion of activated Treg cells, which also express LAG-3, might on the long-term counterbalance the immunosuppressive effect of anti-LAG-3 antibodies. Here, we present evidence in a rat heart transplantation model supporting that hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Transplantations

Eight- to 12-week-old male Lewis 1W (LEW.1W, haplotype $RT1^u$) and Lewis 1A (LEW. 1A, haplotype $RT1^a$) congeneic rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), differed in their entire major histocompatibility complex (MHC) region. Heterotopic LEW.1W heart transplantation was performed as previously described (*11*). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall.

Anti-LAG-3 Antibodies

A synthetic peptide corresponding to the extraloop domain of the rat LAG-3 protein (NCBI accession no DQ438937; peptide DQPASIPALDLLQGMPSTRRHPPHR) was linked to ovalbumin and used to immunize two rabbits (performed at NeoMPS, Strasbourg, France). Preimmune

This work was supported in part by the Progreffe foundation and by a research grant from Immutep S.A.
[1] INSERM, UMR643; ITERT; and the University of Nantes School of Medicine, Nantes, France.
[2] Immutep S.A., Orsay, France.
[3] Address correspondence to: Dr. Bernard Vanhove, ITERT, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France.
E-mail: bernard.vanhove@univ-nantes.fr
Received 22 June 2007. Revision requested 27 July 2007.
Accepted 5 September 2007.
Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins
ISSN 0041-1337/07/8411-1500
DOI: 10.1097/01.tp.0000282865.84743.9c

and immune sera, collected on day 63 after the fourth immunization, were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on immunogen and free peptide and by flow cytometry on Con A activated rat spleen cells. Preimmune sera were negative in both assays. Pooled immune sera presented a titer (dilution for 50% signal) of 1/60,000 by ELISA and of 1/1000 by fluorescence-activated cell sorting (FACS), and presented specificity for activated T cells. Control peptide from the rat $RT1^u$ protein was a gift from Prof. J.P. Soulillou (INSERM, Nantes).

Complement-Dependent Cytotoxicity Assay

Complement-mediated antibody-dependent cytotoxicity was tested using rabbit sera against Lewis 1A T cells in a ^{51}Cr release assay. A total of 2×10^6 Lewis 1A T cells were labeled with 30 μCi of ^{51}Cr (GE Healthcare, Brussels, Belgium) for 90 min at 37°C in Roswell Park Memorial Institute solution (RPMI; Sigma, L'Isle D'Abeau Chesnes, France) with 10% fetal calf serum (FCS; Biowest, Nuaille, France). After three washes, T cells were distributed in 96 V-bottomed plates and incubated with rabbit complement (Sigma) and serial dilutions of heat-inactivated rabbit immune or preimmune sera. After 4 h at 37°C, ^{51}Cr release was measured in the supernatant using a scintillation counter (Perkin Elmer, Machelen, Belgium). Specific cytotoxicity was calculated according to the following formula: (experimental release–spontaneous release)×100/(maximum release–spontaneous release).

Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Assay

Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity was tested in a ^{51}Cr release assay. Then 2×10^6 LEW.1A T cells were labeled with 30 μCi of ^{51}Cr for 90 min at 37°C in RPMI (Sigma) with 10% FCS, distributed in 96 V-bottomed wells plates and incubated with LEW.1W $CD161^+$ cells and serial dilutions of heat-inactivated rabbit immune or preimmune sera. After 4 h at 37°C, ^{51}Cr release was measured in the supernatant. Specific cytotoxicity was calculated according to the following formula: (experimental release–spontaneous release)×100/(maximum release–spontaneous release).

In Vivo Antibody-Induced Cytotoxicity

Cytotoxic activity of anti-LAG-3 antibodies against $LAG\text{-}3^+$ cells was evaluated in vivo as previously described (*12*). ConA (20 mg/kg was injected intravenously into LEW.1W recipients together with anti-LAG-3 or control antibodies. After 24 h, recipients were sacrificed and the splenocytes were analyzed by flow cytometry.

KLH Immunizations

LEW.1A rats were immunized in the footpad with 50-μg keyhole limpet hemocyanin (KLH; Sigma) in complete Freund's adjuvant. Draining lymph nodes were harvested 11 days after injection. Quadruplicate 0.2-mL cultures of draining lymph node cells (3×10^5/well) were cultured in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 2-ME, glutamine, nonessential amino acids, sodium pyruvate, and antibiotics, with 0 to 50 μg/mL KLH. The cultures were incubated for 72 h and were pulsed with [^{3}H]thymidine (GE Healthcare; 1.0 μCi/10 μL/well) for the last 8 hours.

Mixed Leukocyte Reactions

Mixed leukocyte reactions (MLRs) were performed as previously described (*13*). Spleen dendritic cells, used as antigen-presenting cells (APCs), were enriched from LEW.1W spleens by a 14.5% Nicodenz (Gentaur, Paris, France) gradient as previously reported (*14*). T cells were purified by warm nylon wool adherence followed by depletion of OX6 (MHC II) and 3.2.3 (CD161) positive cells with magnetic beads (Dynal, Compiègne, France). Proliferations were measured after 5 days.

Alloantibody Detection

Alloantibodies were analyzed by flow cytometry, by incubating splenocytes with diluted (1/20) sera, as described (*15*).

Immunostaining

Graft samples were embedded in Tissue Tek (OCT Compound, Torrance, CA), snap-frozen in liquid nitrogen, cut into 5-μm sections and fixed in acetone. Endogenous biotin activity was blocked using the Dako biotin blocking system (Dako, Trappes, France). Sections were then labeled by a three-step indirect immunoperoxidase revelation. The area of each immunoperoxidase-labeled tissue section infiltrated by cells was determined by quantitative morphometric analysis. Positively stained cells on each slide were counted by morphometric analysis using point counting analysis (*16*) with a 121-intersection squared grid in the eyepiece of the microscope. Briefly, the percentage of the area of each graft section occupied by cells of a particular antigenic specificity (area infiltrate) was calculated as follows: [number of positive cells under grid intersection/total number of grid intersections]×100. The graft sections were examined at a magnification of×400. The accuracy of the technique is proportional to the number of points counted. Thus, to maintain a standard error of <10%, 15 fields were counted for each labeled section. Results are expressed as the percentage of the area of the tissue section infiltrated by stained leukocytes. Detection of Treg cells in the spleen was performed by flow cytometry after permeabilization with 0.1% saponin and staining with anti-rat CD4-FITC, anti-rat CD25-PE (BD Bioscience, Le Pont de claix, France) and anti-rat FoxP3-APC antibodies (eBioscience, San Diego, CA).

Graft-Infiltrating Cell Extraction

Dilacerated hearts were digested with collagenase D (2 mg/mL; Boehringer Mannheim) for 10 min at 37°C. Cells were then collected by extraction through a stainless steel mesh. The resulting suspension was then clarified by Ficoll isolation (GE Healthcare).

Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 Sequence Detection System using SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following oligonucleotides (purchased at MWG, Roissy, France) were used in this study: rat LAG-3: upper primer is 5′-ATATGAATTCACAGAGGAGATGAGGCAG-3′ and lower primer is 5′-ATATGAATTCTCCTGGTCAGAG-

CTGCCT-3′. Rat interferon (IFN)-γ: upper primer is 5′-TGGATGCTATGGAAGGAAAGA-3′ and lower primer is 5′-GATTCTGGTGACAGCTGGTG-3′. Rat HPRT: upper primer is 5′-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC-3′ and lower primer is 5′-TTCGCTGATGACACAAACATGA-3′. A constant amount of cDNA corresponding to the reverse transcription of 100 ng of total RNA was amplified in 25 μl of PCR mix containing 300 nM of each primer; 200 μM dATP, dGTP, dCTP; 400 μM dUTP; 3 mM $MgCl_2$; 0.25 U of uracyl-N-glycosylase; 0.625 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase. The mix was subjected to 40 cycles of amplification. The real-time PCR data were plotted as the ΔR_n fluorescence signal vs. the cycle number. The ΔR_n values were calculated by the Applied Biostystems 7700 sequence detection software using the formula: $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, where R_n^+ is the fluorescence signal of the product at any given time, R_n^- is the mean fluorescence signal during cycles 3–13 and referred to as the baseline. The C_t value is defined as the cycle number at which the ΔR_n crosses a threshold. The threshold is set above the background fluorescence to intersect the exponential portion of the amplification curve of a positive reaction. The Ct is inversely proportional to the log amount of template within the PCR.

Donor-Specific Blood Transfusions

Donor-specific blood transfusions (DSBTs) were performed as previously described (*17*). Briefly, 1 mL whole blood was injected intravenously on days −14 and −7 before heart transplantation.

Statistical Analyses

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

RESULTS

LAG-3 mRNA Expression in Rejected Allograft and Lymphoid Organs

LAG-3 is expressed by activated T cells in inflamed lymphoid organs and tissues (*7*). In order to see if LAG-3 is also expressed in rejected allografts, hearts grafts from LEW.1W to LEW.1A rat recipients were analyzed on day 5 after transplantation (rejection occurring between day 5 and 6). Messenger RNA for LAG-3 was analyzed and compared with allografts receiving a tolerance-inducing regiment (anti-CD28 antibodies + CSA, as described [*18*]) and with isografts. Rejected allografts presented a 7-fold and a 25-fold accumulation of LAG-3 mRNA as compared with tolerated and syngeneic grafts, respectively (Fig. 1A). Such an accumulation was not detected in lymph nodes (Fig. 1B) or in the spleen of rejecting recipients (Fig. 1C).

Cytotoxic Action of Anti-LAG-3 Antibodies

Anti-LAG-3 antibodies were produced in rabbits by immunization with a synthetic peptide from the extra loop of LAG-3 Ig-like N-terminal domain, involved in the interaction of LAG-3 with Class II (*19*). Postimmune serum, as well as the immunoglobulin (Ig) G fraction, labeled <1% of rat spleen cells and 40% of rat spleen cells activated for 48 h with ConA, PMA + ionomycin, or PHA (data not shown). Preimmune serum was negative. An excess of LAG-3 extraloop peptide competed out that staining (Fig. 2A), indicating its specificity. In order to characterize the effect of anti-LAG-3 antibodies on $LAG\text{-}3^+$ cells, complement and antibody dependent cell cytotoxicity-dependent cytotoxicity was assayed in vitro. Fifteen percent of ConA-activated spleen cells were lysed in the complement-dependent cytotoxicity assay (Fig. 2B). Given that only 40% of the ConA-activated target cells expressed LAG-3, this assay revealed that about 37% of the $LAG\text{-}3^+$ spleen cells present in the preparation were lysed in vitro as a result of complement activation.

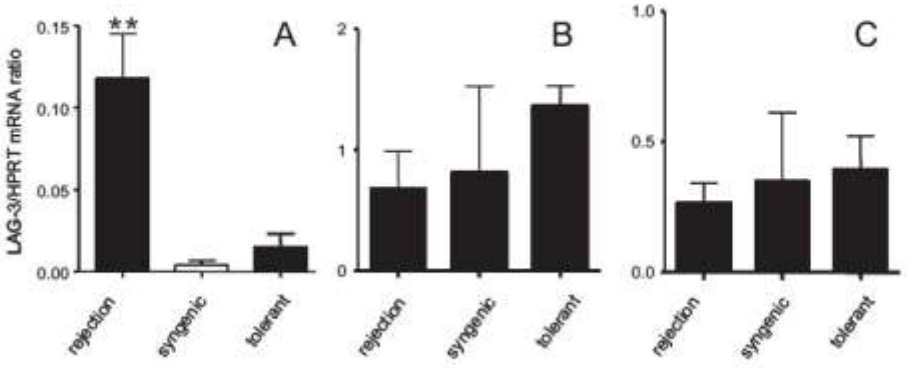


FIGURE 1. LAG-3 mRNA expression in cardiac allograft. Expression of LAG-3 mRNA in heart grafts recipients at day 5 was measured by quantitative RT-PCR and compared with housekeeping HPRT transcripts expression. Rejection: allograft without treatment. Syngeneic: isograft. Tolerant: allograft in recipient receiving a tolerogenic (CsA+anti-CD28 antibodies) treatment. (A) Heart graft. (B) Mesenteric lymph nodes. (C) Spleen. Results are means±SD from 5 animals, each measurement being realized in triplicate. $^{**}P<0.05$ for syngenic and tolerant vs. rejection.

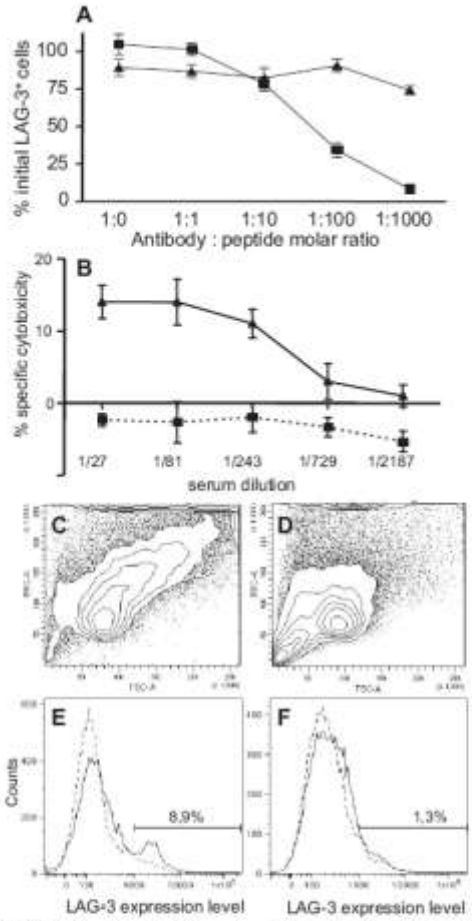


FIGURE 2. Specificity and cytotoxicity of anti-LAG-3 antibodies. (A) Competition assay for anti-LAG-3 antibodies. ConA-activated rat spleen cells were incubated with anti-LAG-3 rabbit IgG at a concentration of 50 μg/mL together with increasing amounts of LAG-3 extraloop peptides (square symbols) or with irrelevant peptides from the rat RT1^a protein (triangles). Bound IgG were revealed with a FITC-labeled antirabbit immunoglobulins by flow cytometry. Depending on the stimulation conditions (timing, dose of ConA), the percent of positive cells ranged from 25% to 40% of the spleen cells. Indicated are mean percent±SD of the staining of three measurements, as compared with the condition where no peptide were added. (B) In vitro complement-dependent cytotoxicity assay. ConA-stimulated target cells were labeled with ^{51}Cr and mixed with rabbit complement and anti-LAG-3 (full line) or preimmune (dotted line) serum at the indicated dilution. Percent cytotoxic activity is calculated as indicated in the Material and Methods section. (C–F) In vivo cytotoxicity assay. Twenty mg/kg Con A were injected intravenously to rats, as previously described (*12*). Recipients were simultaneously treated by an intravenous injection of 600 μL of control (C, E) or anti-LAG-3 serum (D, F). Twenty-four hours after injection, recipients were sacrificed and spleen cells were analyzed by flow cytometry. Cell morphology (forward scatter and side scatter parameters: C and D) and expression of LAG-3 (E and F) were measured. Shown is one experiment representative of three. Indicated percentages are LAG-3$^+$ cells after deduction of the background staining.

To test if cell-mediated, Fc-dependent lysis could also play a role, we mixed LAG-3$^+$ target cells with NK (CD161$^+$) effector cells in the presence of anti-LAG-3 antibodies. In that case, no lysis could be observed (data not shown). Since our anti-LAG-3 antibodies are directed against the extraloop domain, they might also modify cognate interactions of T cells with allogenic APCs and interfere with T-cell proliferation. In mixed lymphocyte reactions, however, we noted that anti-LAG-3 antibodies (IgG fractions from the serum, tested at a concentration up to 80 μg/mL) did not modify T-cell responses (150,000±12,000 specific cpm after 5 days in MLR). Also, using purified T cells stimulated by anti-CD3 + anti-CD28 antibodies, T-cell proliferation was not modified by anti-LAG-3 antibodies, even when stimulation was titrated out (data not shown).

In vivo, the depleting activity of anti-LAG-3 antibodies was estimated by measuring the fate of activated T cells induced in the spleen by intravenous injection of ConA, as previously described (*12*). One day after intravenous injection of 600 μL of anti-LAG-3 immune serum, the proportion of blast cells, as determined by flow cytometry, declined from 20% in control serum-treated animals to 7% (Fig. 2C, D). LAG-3$^+$ cells represented 8.9% of the spleen cells and only 1.3% after treatment (Fig. 2E, F). We obtained concordant results using the adoptive transfer of carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-labeled ConA-activated T cells into irradiated rat recipients. In that case, only half the amount of CFSE$^+$/CD4$^+$ and CFSE$^+$/CD8$^+$ cells could be recovered from the spleen after 24 h if recipients were given anti-LAG-3 antibodies (data not shown).

Anti-LAG-3 Antibodies Inhibit T-Cell Responses to KLH Immunization

In order to further characterize the effect of anti-LAG-3 antibodies on T-cell responses in vivo, we challenged rats immunized with KLH in complete Freund's adjuvant. Eleven days after immunization, draining lymph nodes lymphocytes from control-treated rats showed a robust, dose-dependent proliferation in secondary response to KLH in vitro. This response was significantly reduced by >70% (P=0.0003) in rats treated with anti-LAG-3 antibodies (data not shown).

Anti-LAG-3 Antibodies Delay Heart Allograft Rejection

From preliminary pharmacokinetic observations, we established that two intravenous injections of 600 μL of anti-LAG-3 rabbit serum on days 0 and 3 resulted in the maintenance of anti-LAG-3 binding activity in recipient's serum for at least 2 weeks. This treatment delayed cardiac allograft rejection from 6 days in untreated and control-treated recipients to a median of 27 days. All recipients, however, eventually rejected their graft within 10 weeks (Fig. 3A). On day 5, grafts from control-treated recipients were heavily infiltrated

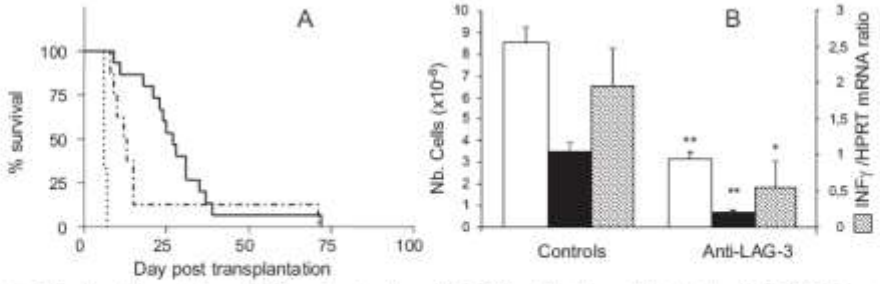


FIGURE 3. Heart graft survival and GICs analysis after anti-LAG-3 antibodies administration. (A) LEW.1A recipients of fully allogenic (class I and II mismatch) LEW.1W hearts were treated by injections on days 0 and 3 of 200 μL (dashed line; n=8) or 600 μL (full line; n=15) rabbit anti-LAG-3 serum or of 600 μL preimmune serum (dotted line; n=3). Graft survival was evaluated by daily evaluation of heartbeat. $P<0.002$ for 600 μL rabbit anti-LAG-3 serum vs. preimmune serum. (B) GICs were extracted from cardiac allografts on day 5, counted and analyzed by flow cytometry for the expression of LAG-3. White bars: total number of GICs. Black bars: LAG-3$^+$ GICs measured by flow cytometry ($P<0.01$). Total RNA was also extracted from GICs and messenger for IFN-γ were quantified by quantitative PCR, relative to HPRT expression level (dashed bars and scale on the right; $P<0.05$).

by activated T cells and this infiltrate was less important in anti-LAG-3 treated recipients. Infiltration by CD25$^+$ cells and NK cells, however, was not modified by the treatment (Table 1). Since our anti-LAG-3 antibodies do not recognize LAG-3 in immunohistology, LAG-3 expression by graft infiltrating cells (GICs) was analyzed by flow cytometry after extraction. An average of $8.5\ 10^6 \pm 0.76$ GICs could be recovered from control rejected grafts. From heart allografts from anti-LAG-3 treated recipients, only $3.16 \pm 0.44\ 10^6$ GICs could be recovered (n=3; $P<0.005$). GICs contained $41.17 \pm 1\%$ LAG-3$^+$ cells in controls (i.e. $3.5\ 10^6$ cells) versus $22.2 \pm 0.9\%$ in treated animals (i.e., $0.7\ 10^6$ cells; n=3; $P<0.0005$; Figure 3B). Analysis of mRNA transcript reinforced these observations that infiltration was reduced since we measured four times less IFNγ mRNA molecules in treated grafts (Fig. 3B). In order to investigate whether anti-LAG-3 antibodies might serve as a treatment of an ongoing acute allograft rejection episode, heart allograft recipients were treated after the rejection onset, on days 3 or 4. Control-treated recipients rejected the allografts on day 6, whereas anti-LAG-3 antibodies-treated recipients had a median survival of 12 days (Table 2).

TABLE 1. Immunohistological analysis of cardiac allografts

Antibodies	R7/3 (TCRβ)	W3/25 (CD4)	OX8 (CD8)	OX39 (CD25)	3.2.3 (CD161)
Control-treated (%)	8.7	13.9	16.8	6.2	9.5
Anti-LAG-3 treated (%)	6.8	9.2	10.6	7.2	10.75

Heart allograft from control-treated and anti-LAG-3-treated recipients were harvested on day 5 and processed for immunohistology. Indicated antibodies were used and revealed as described in the Material and Methods section. The percentage of the area of each graft section occupied by cells of a particular antigenic specificity (area infiltrate) represented here is the mean of quantifications from five heart grafts.

Alloreactivity After Administration of Anti-LAG-3 Antibodies

The alloreactivity of spleen cells from heart graft recipients was tested in mixed lymphocyte reactions on day 5 after transplantation. Control as well as anti-LAG-3 antibody–treated recipient spleen cells, or T cells purified from the spleen, proliferated normally against donor and third-party APCs, indicating that donor-reactive T cells had not been deleted or anergized in the spleen (data not shown). Antidonor MHC alloantibodies were also measured by FACS analysis using donor-type spleen cells as target. Sera from heart recipients harvested on day 16 posttransplantation were used for this analysis, at dilutions of 1:5 to 1:320. No significant difference in the positive IgM and IgG responses could be seen between control- or anti-LAG-3 antibodies-treated animals (data not shown).

Anti-LAG-3 Antibodies Prevent Donor-Specific Blood Transfusion–Induced Allograft Tolerance

The expression of LAG-3 on regulatory T cells (*9, 10*) suggests that anti-LAG-3 antibodies might block the activity of regulatory T cells in transplantation. To test that hypothe-

TABLE 2. Anti-LAG-3 antibodies prolong allograft survival when administered after rejection onset

Treatment	Day of rejection	Median survival (days)
Control serum on day 3	5, 5, 5	5
Control serum on day 4	5, 5, 5	5
Anti-LAG-3 serum on day 3	12, 13, 9	12 ($P<0.05$ vs. control)
Anti-LAG-3 serum on day 4	10, 13, 13, 19	12.5 ($P<0.05$ vs. control)

Heart graft recipients were treated on day 3 or 4 with control or anti-LAG-3 antibodies. Rejection was monitored by daily heart palpation.

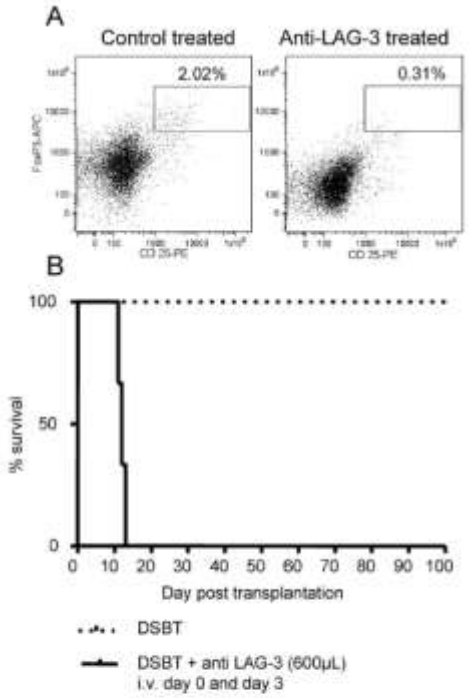


FIGURE 4. Anti-LAG-3 antibodies block DSBT-induced heart graft tolerance. Prior to transplantation, LEW.1A heart graft recipients received donor (LEW.1W) blood to induce tolerance, as described (*17*). Recipients where then treated by injections on days 0 and 3 of 600 µL rabbit anti-LAG-3 serum (full line; n=3) or of 600 µL preimmune serum (dotted line; n=3). In one group (3 preimmune serum-treated and 3 anti-LAG-3-treated animals) spleen cells were extracted on day 5 and $CD25^+FoxP3^+$ T cells were analyzed by flow cytometry (A). In another group (3 preimmune serum-treated and 3 anti-LAG-3-treated animals) graft survival was evaluated by daily evaluation of heartbeat (B).

sis, we used a well-described system where tolerance induced in transplanted rats by DSBT is maintained by the activity of Treg cells (*20*). We observed that administration of anti-LAG-3 antibodies (600 µL intravenously on days 0 and 3) to DSBT-treated allograft recipients reduced by 85% the number of $CD25^+FoxP3^+$ T cells in the spleen (Fig. 4A) and blocked tolerance induction, leading to early graft loss within 3 weeks (n=3; graft loss on days 16, 16, and 17) instead of more than 3 months (n=5; >100 days, Fig. 4B).

DISCUSSION

We found that cells expressing LAG-3 can be eliminated in rats by administration of cytotoxic rabbit antibodies against the extraloop domain of LAG-3. Administration of anti-LAG-3 antibodies resulted in the inhibition of T cell priming after KLH immunization. In the context of heart transplantation, we found $LAG\text{-}3^+$ mRNA expression increased in rejected heart allografts and not in the periphery. Targeting LAG-3 as induction monotherapy delayed acute rejection by reducing graft infiltration by T cells and monocytes. Further, we showed that anti-LAG-3 antibodies can prolong survival after rejection onset and therefore constitute a possible treatment for acute rejection.

Experiments showing that short courses of CD154 antibody therapy could achieve long-term graft survival in mice and primates have been initially interpreted as an effect of costimulation blockade. However, Monk et al. (*2*) showed that much of the efficacy of anti-CD154 therapy derives, in addition to costimulation blockade, from destruction of activated T cells. The outcome is a selective purging of potentially aggressive T cells that have experienced antigen. These findings suggest that any antigen expressed by activated T cells might serve as a target for cytotoxic antibodies. Anti-CD154, however, seem to spare regulatory T cells that, although expressing CD154, might expose less antigen or have an enhanced function after CD154 blockade (*21*). In the rat, although depletion of $CD154^+$ cells have not been demonstrated directly, anti-CD154 antibodies synergize with DSBT to result in tolerance to heart allografts (*22*). The LAG-3 antigen might also be a target for cytotoxic antibodies in a therapeutic approach, resulting in the selective destruction of activated T cells. Indeed our data show that ConA-activated $LAG\text{-}3^+$ cells disappear after treatment, T-cell responses to priming by KLH are inhibited, and T-cell responses leading to heart allograft rejection are delayed. However, here, anti-LAG-3 antibodies blocked, rather than synergized with, DSBT. That Treg cells can express LAG-3 (*9, 10*) and our observations that anti-LAG-3 antibodies prevent tolerance induction by DSBT suggest that the treatment has also eliminated or blocked regulatory cells. Our observation that fewer $CD25^+FoxP3^+$ T cells are detected in the spleen of DSBT-treated animals argued for a direct Treg cell depletion after anti-LAG-3 antibodies administration. This major difference with anti-CD154 antibodies suggested different mechanisms of action, or alternatively that target $CD154^+$ cells are not similar to $LAG\text{-}3^+$ cells. Anti-LAG-3 antibodies might have an agonist activity and therefore could directly inhibit T cells since LAG-3 is a negative regulator. Alternatively, LAG-3-specific antibodies with antagonist activity can promote T-cell expansion and T-helper 1 cytokine production (*8*). On the other hand, blocking antibodies would also prevent LAG-3 binding to Class II, an interaction that is involved in DC maturation (*23*). However, in vitro, our anti-LAG-3 antibodies did not modify the responses of alloreactive T cells in proliferation assays, suggesting that they were not agonist nor antagonist. Rather, our observations suggested that the major mechanism of action of the antibodies used here is physical elimination of $LAG\text{-}3^+$ cells.

Ex vivo, spleen cells from grafted recipients harvested on day 5 still proliferated against donor cells. This suggested that alloreactive T cells do express LAG-3 and become targets for anti-LAG-3 antibodies only after graft infiltration and not in the spleen. Anti-LAG-3 antibodies reduced by 60% the amount of GIC otherwise found in untreated, rejected grafts. Since GICs from untreated recipients contained only 41% of $LAG\text{-}3^+$ cells, these data suggest that the antibody prevented infiltration by $LAG\text{-}3^+$ cells, and that this resulted also in a reduced infiltration by other, $LAG\text{-}3^-$ cells. Our observation that LAG-3 positive cells infiltrate heart allograft undergoing

rejection suggested that anti-LAG-3 based therapies might be useful to fight acute cellular rejection. This was confirmed by our experiment showing that anti-LAG-3 antibodies still prolonged graft survival when given after rejection onset (Table 2).

In conclusion, a selective depletion of activated alloreactive T cells could be obtained with cytotoxic anti-LAG-3 antibodies in vivo and this resulted in the suppression of an acute rejection episode. In our rat model, these antibodies also target regulatory T cells and therefore do not promote tolerance induction when it is dependent on regulatory T cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ms. H. Smit, Mrs. E. Merieau, and B. Martinet for help in microsurgery and animal care.

REFERENCES

1. Waldmann H. The new immunosuppression: just kill the T cell. *Nat Med* 2003; 9: 1259.
2. Monk NJ, Hargreaves RE, Marsh JE, et al. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003; 9: 1275.
3. Andre P, Prasad KS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin–dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8: 247.
4. Avice MN, Sarfati M, Triebel F, et al. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 1999; 162: 2748.
5. Andreae S, Piras F, Burdin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 2002; 168: 3874.
6. Andreae S, Buisson S, Triebel F. MHC class II signal transduction in human dendritic cells induced by a natural ligand, the LAG-3 protein (CD223). *Blood* 2003; 102: 2130.
7. Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends Immunol* 2003; 24: 619.
8. Macon-Lemaitre L, Triebel F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. *Immunology* 2005; 115: 170.
9. Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21: 503.
10. Holm TL, Lundsgaard D, Markholst H. Characteristics of rat CD4(+)CD25(+) T cells and their ability to prevent not only diabetes but also insulitis in an adoptive transfer model in BB rats. *Scand J Immunol* 2006; 64: 17.
11. Ono K, Lindsey E. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967; 57: 225.
12. Cao Q, Batey R, Pang G, et al. IL-6, IFN-gamma and TNF-alpha production by liver-associated T cells and acute liver injury in rats administered concanavalin A. *Immunol Cell Biol* 1998; 76: 542.
13. Haspot F, Villemain F, Laflamme G, et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228.
14. Voisine C, Hubert FX, Trinite B, et al. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002; 169: 2284.
15. Haspot F, Seveno C, Dugast AS, et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 2005; 5: 2339.
16. McWhinnie DL, Thompson JF, Taylor HM, et al. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies. *Transplantation* 1986; 42: 352.
17. Cuturi MC, Josien R, Cantarovich D, et al. Decreased anti-donor major histocompatibility complex class I and increased class II alloantibody response in allograft tolerance in adult rats. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1627.
18. Dong VM, Yuan X, Coito AJ, et al. Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection. *Transplantation* 2002; 73: 1310.
19. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5744.
20. Kitade H, Kawai M, Rutgeerts O, et al. Early presence of regulatory cells in transplanted rats rendered tolerant by donor-specific blood transfusion. *J Immunol* 2005; 175: 4963.
21. Jarvinen L, Blazar B, Adeyi O, et al. CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation* 2003; 76: 1375.
22. Sebille F, Brouard S, Petzold T, et al. Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 169.
23. Fougeray S, Brignone C, Triebel F. A soluble LAG-3 protein as an immunopotentiator for therapeutic vaccines: Preclinical evaluation of IMP321. *Vaccine* 2006; 24: 5426.

Perspectives et discussions

LAG-3 étant exprimé majoritairement sur les cellules T activées, nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement d'induction de tolérance avec un anticorps anti-LAG-3 déplétant pourrait prévenir le développement de cellules T effectrices alloréactives. Il serait alors un traitement efficace contre le rejet en transplantation. Cependant, une déplétion des cellules Treg activées, qui exprime aussi LAG-3, pourrait sur le long terme être un problème dans l'usage d'un anticorps anti-LAG-3. Dans ce premier article, nous avons démontré le bien fondé de cette hypothèse dans un modèle de greffe cardiaque chez le rat.

L'usage, en traitement d'induction dans un modèle de transplantation, d'un anticorps déplétant ciblant spécifiquement un marqueur des T activées a déjà été réalisé. En effet, l'administration d'anticorps anti-CD154 peut entraîner la survie à long terme des allogreffes chez la souris, le rat et le primate. Cependant, CD154 étant exprimé aussi par les plaquettes, des complications thromboemboliques ont empêché le développement clinique de cette stratégie thérapeutique [251]. L'action in vivo des anticorps anti-CD154 étant essentiellement due à la déplétion des cellules T alloréactives [204], nous avons exprimé l'hypothèse selon laquelle un anticorps dirigé contre un antigène d'activation différent mais plus spécifique du lymphocyte T puisse entraîner un effet immunomodulateur similaire sans les effets secondaires. Les cibles thérapeutiques spécifiques des lymphocytes T activés ne sont cependant pas très nombreuses. LAG-3 [252] est une de ces cibles potentielles. Contrairement à CD154, son expression est très spécifique des lymphocytes activés [217]. De plus, l'étude des transcrits présents dans différents greffons incite à utiliser LAG-3 comme cible. Dans le contexte d'une transplantation cardiaque, nous avons observé que l'expression des ARNm de LAG-3 était augmentée au niveau des greffons cardiaques rejetés et non en périphérie (figure 1 de l'article). Par des études in vitro (test de cytotoxicité) et in vivo (activation lymphocytaire polyclonale par injection de Concanavaline A), nous avons constaté que des cellules exprimant LAG-3 peuvent être éliminés chez le rat par l'administration d'un anticorps cytotoxique de lapin dirigé contre l'extraloop du domaine D1 de LAG-3. De plus, l'administration d'un anticorps anti-LAG-3 a entraîné l'inhibition des cellules T

primées après l'immunisation KLH. Ainsi cibler LAG-3 lors d'un traitement d'induction en monothérapie retarde le rejet aigu du greffon en diminuant l'infiltrat des cellules T et des monocytes. La médiane de survie du greffon observé avec un traitement court (J0/J3) est de 27 jours contre 5 jours sans traitement. De plus nous avons montré que les anticorps anti-LAG-3 peuvent prolonger la survie après la survenue de rejet, et donc constituer un traitement possible de rejet aigu. En effet, l'injection de l'anticorps au 4eme jour de greffe (soit la veille du rejet) permet de conserver le greffon en état de marche jusqu'au 12eme jour.

Les expériences montrant que les traitements courts avec des anticorps anti-CD154 pouvaient induire une survie à long terme de la greffe chez les souris et les primates ont d'abord été interprétées comme un effet bloquant la costimulation. Toutefois, Monk et al.[204] ont montré que l'efficacité de la thérapie anti-CD154 découle pour beaucoup, en plus du blocage de la costimulation, de la destruction des cellules T activées. Le résultat est une déplétion sélective des cellules T potentiellement agressifs. Ces résultats suggèrent que les antigènes exprimés par les cellules T activées pourraient servir de cible pour les anticorps cytotoxiques. Anti-CD154, toutefois, semblent épargner les cellules T régulatrices, exprimant CD154, peut être en exposant moins l'antigène ou elles ont une meilleure fonction après le blocage de CD154 [253]. Chez le rat, bien que la déplétion des cellules $CD154^+$ n'ait pas été démontrée directement, des anticorps anti-CD154 en synergie avec un traitement DSBT induisent la tolérance à l'allogreffe cardiaque [254]. Le modèle DSBT est un modèle de tolérance de greffe cardiaque chez le rat, cette tolérance est dépendante de cellules régulatrices T $CD4^+CD25^+$. Ce modèle permet donc d'étudier l'impact de l'anticorps anti-LAG-3 sur les cellules régulatrices. Contrairement à l'anticorps anti-CD154, l'anticorps anti-LAG-3 empêche la DSBT, plutôt que d'être en synergie. Etant donné l'expression de LAG-3 par les cellules Treg [237] et l'inhibition de l'induction de tolérance par DSBT avec l'anticorps anti-LAG-3, cela suggère que le traitement a également éliminé ou bloqué des cellules de régulation. Moins de cellules T $FOXP3^+$ $CD25^+$ sont détectées dans la rate des animaux DSBT traités, ce qui laisse penser à une déplétion directe des cellules Treg après l'administration de l'anticorps anti-LAG-3. Cette différence majeure avec les anticorps anti-CD154 suggère une différence dans le mécanisme d'action. Celui-ci peut être de deux types : 1) les anticorps anti-LAG-3 pourraient avoir une activité agoniste, et donc

inhiber les cellules T directement puisque LAG-3 est un régulateur négatif [236]. 2) D'autre part, les anticorps anti-LAG-3 bloquant, permettraient d'éviter la liaison LAG-3 :CMH-II, interaction qui est impliquée dans la maturation DC [255]. Cependant, nous avons noté qu'in vitro les anticorps anti-LAG-3 de lapin ne modifient pas les réponses des cellules T alloréactives dans les tests de prolifération, ce qui suggère une absence d'activité agoniste. Nos observations suggèrent que le principal mécanisme d'action de l'anticorps utilisé ici est l'élimination physique des cellules LAG-3^+.

Afin de comprendre le mécanisme d'action de cet anticorps anti-LAG-3, des expériences de prolifération sont effectuées sur des splénocytes de receveurs au $5^{ème}$ jour post greffe. Ex-vivo, les splénocytes se multiplient encore contre les cellules du donneur. Cette alloréactivité suggère que les cellules T expriment LAG-3 et deviennent des cibles pour les anticorps anti-LAG-3 seulement après infiltration au niveau de la greffe et non dans la rate. L'anticorps anti-LAG-3 réduit de 60% le nombre de GIC trouvées dans un greffon rejeté de rat non traité. Etant donné que 41% des GIC d'un receveur non traité sont LAG-3^+, ces données suggèrent que l'anticorps empêche l'infiltration par les cellules LAG-3^+ ce qui pourrait entraîner une diminution de l'inflammation et de l'infiltration par d'autres cellules qui sont LAG-3^-. Notre observation que les cellules LAG-3 positives infiltrent les allogreffes cardiaques et induisent le rejet suggére qu'une thérapie basée sur un anticorps anti-LAG-3 pourrait être utilisée pour combattre le rejet cellulaire aigu.

En conclusion, une déplétion sélective des cellules T activées alloréactives peut être obtenue avec des anticorps anti-LAG-3 cytotoxiques in vivo, et cela aboutit à la suppression d'un épisode de rejet aigu. Dans notre modèle de rat, ces anticorps également ciblent les cellules T régulatrices, et donc ne favorisent pas l'induction de tolérance quand il est dépendant de cellules T régulatrices.

Cet anticorps cytotoxique pourrait donc plutôt être utilisé pour traiter des épisodes de rejet aigu plutôt qu'au cours d'un traitement d'induction de tolérance. D'autant plus que lors de l'étude de différents modèles de tolérance en transplantation chez le rat, nous avons confirmé que les cellules T régulatrices étaient sensibles à l'anticorps anti-LAG-3 cytotoxique. Au cours de cette étude, nous avons utilisé comme outil notre anticorps cytotoxique polyclonal de lapin anti-LAG-3 et trois modèles de tolérance très bien

décrits (greffe cardiaque + DSBT, greffe cardiaque + (anti-CD28+CsA), greffe rénale + CD28).

Le modèle DSBT avec greffe cardiaque est un modèle de tolérance dans lequel les cellules régulatrices T CD4+CD25+FoxP3+ sont décrites comme maintenant et transférant la tolérance. L'administration d'un anticorps anti-LAG-3 dans un modèle de tolérance de DSBT soit au moment de la greffe à J0 soit une fois la tolérance établit à J100 induit le même effet, le rejet.

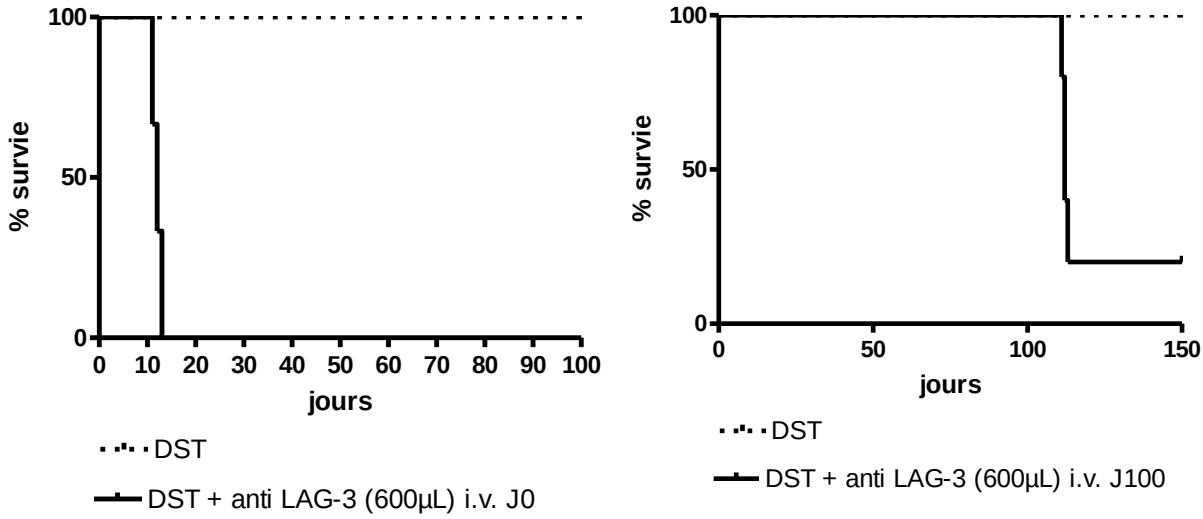


Figure 6: courbe de survie de rat DSBT avec ou sans traitement anti-LAG-3

Ce rejet est corrélé avec la déplétion des cellules régulatrices T CD4+ CD25+ FoxP3+ dont le rôle dans le maintien de la tolérance est décrit. Le pourcentage de cellules régulatrices passe de 2,02% à 0,31% 5 jours après le traitement.

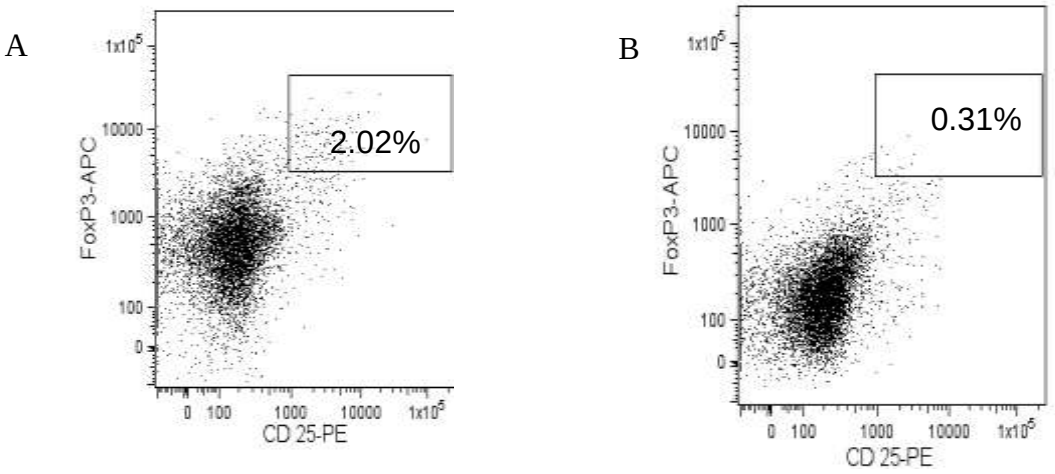


Figure 7 : Anti-LAG-3 dépléte les cellules régulatrices dans la DSBT
Le pourcentage de T $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ est de 2,02% dans un animal DSBT non traités (A) et de 0,31% dans un modèle DSBT 5 jours après l'administration d'anticorps anti-LAG-3

Le deuxième modèle utilisé est un modèle de greffe rénale traité anti CD28 (JJ319) dans lequel les cellules régulatrices identifiées sont des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) $T^{-}B7^{+}$ [256]. L'administration de l'anticorps anti-LAG-3 a le même effet déplétant que dans l'autre modèle. On observe en effet une déplétion des cellules LAG-3^{+} présentes.

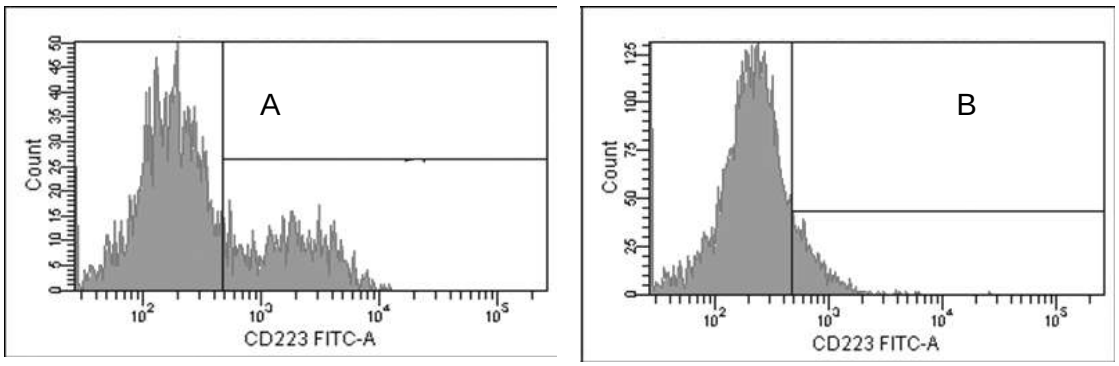


Figure 8: déplétion des cellules LAG-3 positives dans un modèle de greffe de rein anti-CD28
Le pourcentage de LAG-3^{+} est de 14% dans un animal non traités (A) et de 3% dans un modèle 5 jours après l'administration d'anticorps anti-LAG-3

Contrairement au modèle de DSBT, cette déplétion n'a pas pour conséquence un rejet sur tous les animaux. Cette étude a été menée sur 5 animaux tolérants (survie supérieure à 100j). Seul un animal a rejeté son greffon, 3 ont eu un épisode de rejet qui s'est résorbé de lui même et un animal n'a eu aucune conséquence sur sa fonction rénale. Le suivi des animaux est fait par mesure tous les 2 jours du taux sanguin de l'urée et de la créatinine. Une nouvelle étude est en cours pour évaluer si l'injection de l'anticorps anti-LAG-3 n'a pas de conséquences histologiques qui ne se refléteraient pas dans les analyses biologiques de la fonction rénale.

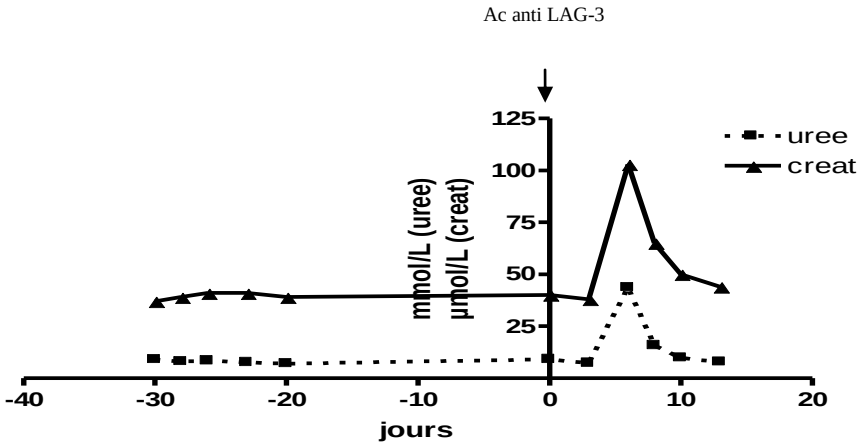


Figure 9: Suivi de l'urée et de la créatinine chez un animal tolérant greffé rénal traité par l'anticorps anti-LAG-3
Suivi de la fonction rénale par dosage de l'urée et de la créatinine dans le sérum du rat. L'urée est représentée par un carré et la créatinine par un triangle. Des prélèvements sont effectués tous les 2 jours.

Dans ce modèle les cellules T régulatrices ne jouent donc qu'un rôle partiel par rapport au MDSC décrites. Ainsi l'usage d'un anticorps anti-LAG-3 pour contrer un épisode de rejet ne dépléterait pas les cellules régulatrices de type MDSC.

Le dernier modèle étudié est un modèle d'allogreffe cardiaque traité anti-CD28+CsA. Dans ce modèle, les cellules nécessaires au maintien de la tolérance sont des cellules T^{-} $B7^{+}$ et ce modèle est décrit comme étant indépendant des cellules T régulatrices.[257]

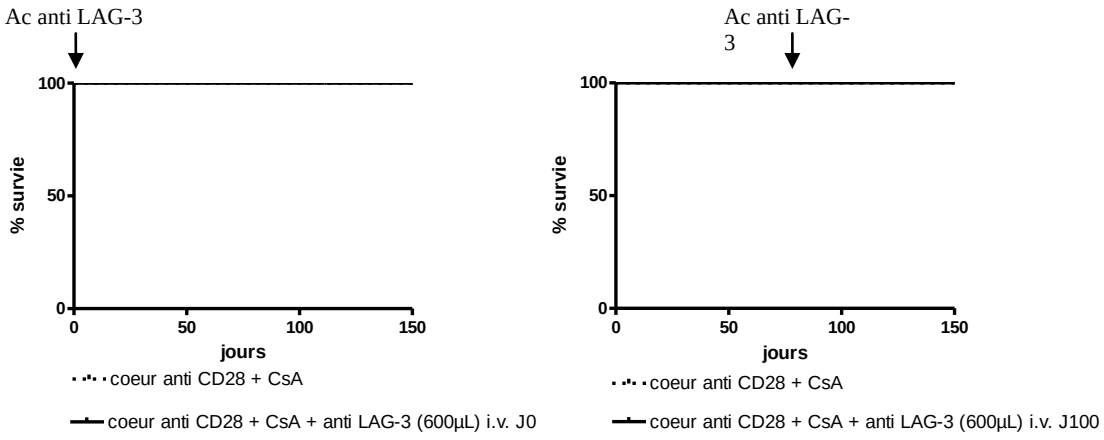


Figure 10: courbe de survie du greffon dans un modèle anti-CD28+CsA traités anti-LAG-3

Dans ce modèle, l'injection de l'anticorps anti-LAG-3 n'a aucun effet que ce soit dans l'induction de la tolérance ou sur son maintien. En effet, l'injection à J0 n'empêche pas la tolérance de se mettre en place. L'injection à J100 n'a aucune conséquence sur les 5 rats traités, aucun effet sur la fonction cardiaque n'a été détecté à la palpation.

Ainsi nous observons qu'il existe différentes situations dans lesquelles la déplétion des cellules régulatrices LAG-3+ n'induit pas le même effet : rejet, effet partiel ou aucun effet. Cet outil qu'est l'anticorps cytotoxique anti-LAG-3 montre qu'il existe des formes de tolérance dans lesquelles les Treg LAG-3+ ne sont pas essentielles. Le traitement d'induction semble essentiel dans cette dépendance ou non aux cellules T régulatrices. Ainsi l'usage thérapeutique d'anticorps anti-LAG-3 semble être possible dans le traitement d'épisodes de rejet, dans les cas où les mécanismes de régulation ne sont pas dépendants des cellules Treg LAG-3+.

II. Action d'anticorps anti-LAG-3 sur l'hypersensibilité retardée dans un modèle pré-clinique sur primate: article 2 (article correspondant en préparation)

Introduction

LAG-3 est une molécule étroitement liée à CD4 et elle est exprimée sur les cellules lymphocytes activées, les cellules natural killer (NK) et pDC. LAG-3 se lie avec une haute affinité pour les molécules du CMH de classe II, il interfère en concurrençant la fixation du CD4 sur le CMH de classe II et bloque ainsi par cette interaction la transduction des signaux médiée par la stimulation [208; 209]. Dans les études expérimentales, le signal par lequel les cellules T activent les monocytes est supprimé par des anticorps spécifiques anti-LAG-3. En outre, au cours de l'inflammation les molécules de LAG-3 et du CMH de classe II sont fortement surrégulées [234], et leur interaction peut également jouer un rôle important dans l'activation des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène. Après les résultats encourageants obtenus chez le rongeur avec un anticorps anti-LAG-3 polyclonal, il est intéressant de tester la reproductibilité de l'effet chez le primate avec un anticorps monoclonal. Cependant, la greffe chez le primate étant plus difficile à mettre en place nous avons développé un modèle moins invasif nous permettant d'étudier l'effet de l'anticorps sur une réponse immunitaire.

Pour cela nous avons développé un modèle d'hypersensibilité de type retardé (DTH) chez le primate non humain. La DTH est une manifestation in vivo d'une réponse immune cellulaire (CMIR), qui offre une protection contre les agents pathogènes intracellulaires. La DTH au niveau de la peau est caractérisée par une infiltration leucocytaire qui est régulée par les macrophages et les lymphocytes T CD4 + et C8 + [258]. Il y a d'abord une phase d'induction ou de sensibilisation durant laquelle l'animal est exposé à un antigène ou un micro-organisme conduisant à une réponse immunitaire par activation des lymphocytes T et expansion clonale. Pendant la phase effectrice, à la suite d'une exposition ultérieure au même antigène, les cellules T sont activées et

recrutées sur le site de dépôt de l'antigène [258]. Ainsi, la réaction cutanée due à la DTH est utilisée pour mesurer la capacité des animaux à générer CMIR.

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

Matériels et méthodes

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

Les cellules mononucléées du sang périphérique des babouins (PBMC) sont isolées du sang total par gradient de densité sur du Ficoll-Paque (Eurobio, Les Ulis, France) et les globules rouges sont lysées. Les PBMC fraîchement isolés sont incubés pendant 48h à 37°C, 5% CO_2, avec 10µg/ml de ConA (Sigma, Saint-Louis, Minnesota) dans du milieu complet (RPMI 1640, 10% de sera allogéniques décomplementés, 2mM L-glutamine, 100 U/ml penicilline, 0.1 mg/ml streptomycine, 1% acides aminés non essentiel, 1mM sodium pyruvate et 5mM Hepes, de Sigma). Les PBMC sont ensuite lavées dans du tampon de FACS et marquées avec 10µg/ml d'anticorps anti-Lag3 (11E3; 30 min à 4°C) suivi par un goat anti-mouse IgG couplé FITC (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Les cellules sont lavées et analysées avec un cytomètre de flux : LSR II^{TM} Flow cytometer (BD Biosciences, San-Diego, CA) avec le logiciel DIVA.

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

Les PBMC fraîchement isolées sont incubées dans du milieu complet avec des PBMC allogéniques irradiées (10^5 cellules/puits de chaque type de cellules) pendant 5 jours à 37°C, 5% CO_2, dans une plaque 96 puits préalablement coatée ou non avec 10µg/ml of 11E3 (Immutep, France) et/ou un anticorps anti-CD3 (clone SP34-2; BD Bioscience). Les cellules sont pulsées avec 1µCi de ^{3}H-thymidine pendant les 8 dernières heures de culture et sont ensuite récupérées et comptées par un compteur à scintillation TopCount NXT (PerkinElmer).

Animaux.

Les études in vivo sont réalisées sur des babouins d'élevage (Papio anubis; du centre de primatologie CNRS, Rousset, France) négatifs pour tous les tests de quarantaine, incluant un test cutané pour la tuberculine. Les animaux sont hébergés dans notre laboratoire pour grands animaux (LGA, INSERM, Nantes) et toutes les expériences sont réalisées sous anesthésie générale réalisée avec du Zoletil (Virbac, Carron, France) et conformément aux recommandations éthiques de l'INSERM. Les études

pharmacocinétiques de 11E3 sont réalisées sur deux animaux naïfs recevant un bolus en intraveineux de 11E3 à 5mg/Kg. 11E3 est quantifié par un test ELISA spécifique.

Test ELISA spécifique anti-LAG-3

Pour doser les anticorps anti-LAG-3, nous avons mis au point un ELISA spécifique. Dans un premier temps LAG-3Ig (IMP321, Immutep, France) est dilué à 10µg/ml dans du tampon borate pH9, distribué dans les puits d'une plaque ELISA (50µL/puits) incubé une nuit à 4°C. Après avoir lavé les puits au PBS 1X-0.05% Tween20, ils sont saturés pendant 2h à 37°C avec de la gélatine 0.25%, diluée en PBS-0.1% Tween20. Avant de déposer les échantillons pour l'étape de capture, les puits sont lavés au PBS-0.05% Tween20. 50µL d'échantillons préparés en PBS-0.1% Tween20 ainsi qu'une la gamme de l'anticorps (en démarrant de 500ng/ml, puis en diluant de 3 en 3) sont déposés et incubé 4h à température ambiante. Après lavage, les anticorps de révélation sont préparés dans du PBS 1X-0.1% Tween20 et distribués à raison de 50µl de cette solution dans chaque puits. Après 1h d'incubation à 37°C, la révélation se fait à l'aide d'une solution de TMB pendant 30minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. La coloration est arrêtée par 100µl d' H_2SO_4 0.5N. On effectue la mesure de l'absorbance à 450nm (filtre test 450nm, filtre réf. 630nm) à l'aide d'un lecteur de plaque Dymatech Laboratories MRX et le logiciel Revelation

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

Six babouins sont injectés à deux reprises en intradermique (i.d.) avec un vaccin BCG (0.1ml; 2-8 x 10^5 UFS; Sanofi Pasteur MSD, Lyon, France) dans la zone supérieure de la jambe, 4 et 2 semaines avant le test cutané DTH. Pour vérifier la sensibilisation des animaux avant le test cutané DTH, un test elispot de sécrétion d'IFN-γ (non-human Primate IFN-γ Elispot kit; R&D Systems, Minneapolis, MN) a été réalisé à partir des PBMC, conformément aux instructions du fournisseur.

Au jour J0 du test DTH, les animaux reçoivent une injection intradermique de 0,1mL d'un dérivé purifié de la tuberculine (PPD; Symbiotics Corporation, San Diego, CA) dans la peau sur le côté droit du dos de l'animal. Une solution saline (0.1ml), injectée au même niveau dans le dos, est utilisée comme contrôle négatif (Sham). Les animaux

reçoivent 2 doses différentes de PPD (2000 UI or 40 UI), réalisées en duplicat. Chaque point d'injection est séparé de 5 cm au minimum du point adjacent. L'érythème au niveau des sites d'injection est mesuré en utilisant un pied à coulisse. Le diamètre de chaque érythème est mesuré par 2 observateurs du 3ème au 8ème jour. Une réaction est considérée comme positive quand le diamètre est > 4 mm. La moyenne des lectures est enregistrée. S'il y a une différence > 2 mm entre les lectures des deux observateurs, une troisième lecture indépendante est réalisée. Des biopsies de peau des sites de DTH et saline sont réalisées à J4 sur un des duplicats. La biospie, réalisée à l'aide d'un scalpel, a pour centre le site d'injection et fait 1cm de diamètre. Un fragment est congelé dans de l'azote liquide pour l'extraction d'ARNm et un second fragment est placé dans du Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) pour des marquages immunohistologiques. Un second test cutané DTH est réalisé plus tard, après une période de 3 semaines de repos. Les animaux ont reçu une injection en intraveineuse de 5mg/kg (n=3) de 11E3 (Immutep, France) ou 0.1 (n=1) et de 1(n=2) mg/kg d'IMP731 (Immutep, France) la veille de ce second challenge par le dérivé purifié de la tuberculine (PPD).

Marquage immunohistochimique.

Les sections congelées (10µm) sont préparées à partir des biopsies chirurgicales de peau. Les lames sont séchées à l'air libre à température ambiante pendant une heure avant une fixation à l'acétone pendant 10 minutes à température ambiante. Les sections sont bloquées avec de l'eau oxygénée (H_2O_2) et saturées avec du PBS contenant 10% de sérum de babouins, 2% normal goat serum et 4% BSA. Les sections sont incubées pendant la nuit avec un anticorps primaire à 4°C, suivi par 90 min d'incubation avec un anticorps secondaire. Les analyses d'infiltrat de cellules T sont réalisées avec un anticorps anti-humain CD3 de lapin (Dako, Glostrup, Denmark), suivi par un anticorps d'âne anti IgG de lapin couplé FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Certaines sections sont aussi marquées avec un anticorps anti-CD3 ainsi qu'avec un anticorps de souris anti CD4 humain (clone 13B8.2; Beckman Coulter) ou avec un anticorps de souris anti CD8 humain (clone B9.11; Beckman coulter). Ces marquages sont révélés par un anticorps de chèvre anti IgG de souris couplé Alexa 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les macrophages infiltrant sont visualisés en utilisant un anticorps de

souris anti CD68 humain (clone PGM1; Beckman Coulter), suivi par un affiniPure $F(ab')_2$ d'âne anti IgG de souris couplé avec peroxydase (Jackson ImmunoResearch) et le Peroxydase Substrate Kit Vector® VIP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Ces sections sont contremarquées avec l'hématoxyline et le carbonate de lithium. Toutes les lames sont analysées en utilisant des microscopes à fluorescence standard et le logiciel d'imagerie utilisé était l'AxioVision (Carl Zeiss, Le Pecq, France).

Analyses d'ARNm.

L'ARN total est extrait à partir des biopsies de peau congelées à l'aide des kits d'extraction TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La qualité et la quantité d'ARNm sont contrôlées par spectrométrie (NanoDrop; Thermo scientific, Wilmington, DE) et est ensuite réalisée une RT-PCR quantitative comme décrit précédemment [205], en utilisant le système Applied Biosystems-GenAmp 7700. Les amplifications ont été réalisées pour les transcrits suivants : hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT; sonde Hs99999909_m1; Applied Biosystems, Foster City, California), LAG-3 (sonde Hs00158563_m1, Applied), C-beta (F: 5'-TCC TGG GTC CAC TCG TCA TT-3'; R: 5'-GGT CGC TGT GTT TGA GCC A-3'), et IL-6 (sonde Hs00174131_m1, Applied). L'HPRT est utilisé comme contrôle de gène endogène pour normaliser les variations de quantité d'ARN de départ. Les données sont ainsi normalisées par rapport au contrôle et exprimées en unité arbitraire (AU).

Analyses statistiques.

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

Résultats

Caractérisation de l'anticorps 11E3

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

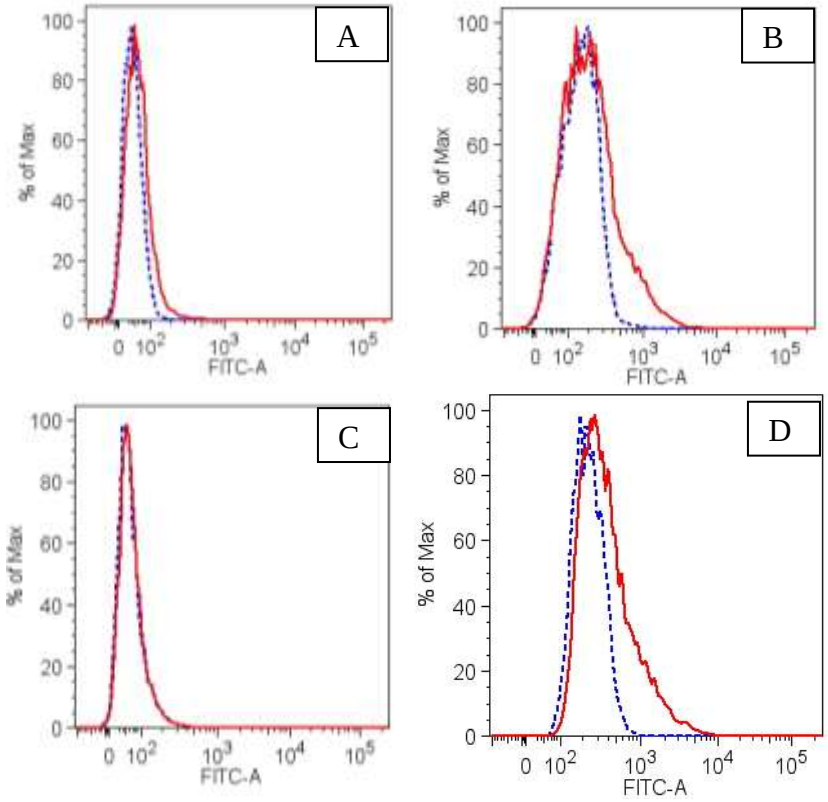


Figure 11 : cross réactivité de l'anticorps anti-LAG-3
Le marquage est effectué sur des PBMC de babouins au repos (A), activées à la ConA (B) ou sur des CHO wild type (C) ou transfectées lag 3(D). Seules les PMBC activées et les CHO transfectées sont marquées à la hauteur de 17,2% et 27,1%, respectivement.

11E3 est connu pour chez l'homme pour avoir un effet agoniste dans les MLR [230]. Dans les MLR effectuées à l'aide de PBMC de babouins (en situation d'incompatibilité du CMH de classe II), l'effet observé est identique chez le babouin. En effet, lors des MLR effectuées avec une sur-stimulation par un anticorps anti-CD3 immobilisé, une forte diminution de la prolifération de l'ordre de 80% est obtenue lorsque l'anticorps anti-LAG-3 est également immobilisé (Fig 12). Sans cette stimulation par l'anticorps anti-CD3, l'inhibition en présence de 11E3 est obtenue dans 50% des cas.

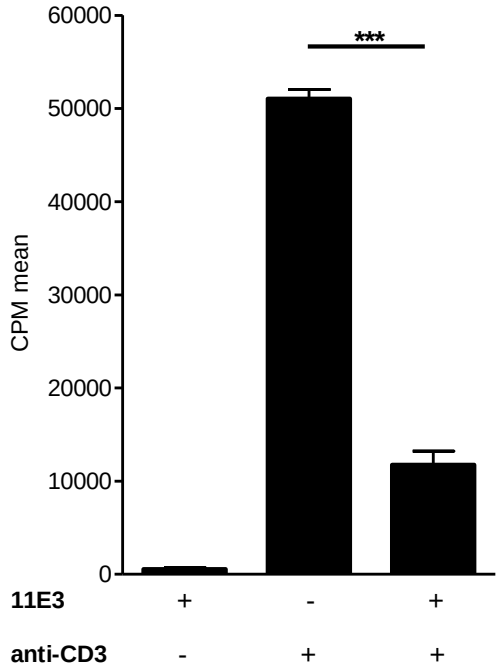


Figure 12 : effet de l'anticorps anti-LAG-3 en MLR

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

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

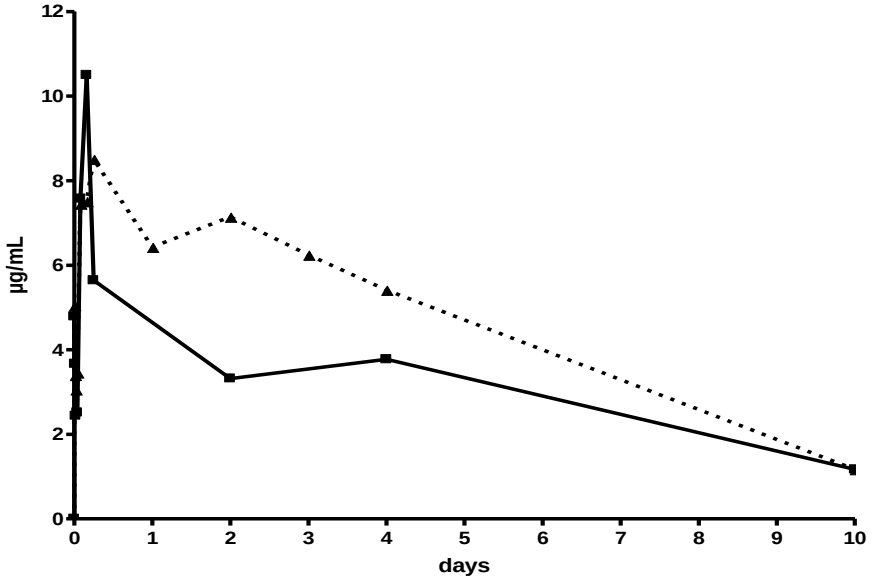


Figure 13: Courbe de pharmcocinétique de l'anticorps anti-LAG-3
Mesure par test ELISA de la quantité d'anticorps anti-LAG-3 présent dans le sérum du babouin. Les prélèvements sont effectués à T0, T5min, T15min, T30min, T1h, T2h, T4h, T10h, T24h puis tous les jours

Modèle d'hypersensibilité de type retardée

Une hypersensibilité de type retardée se caractérise par 2 phases. Une première phase dite de sensibilisation durant laquelle l'animal est exposé à un antigène ou un micro-organisme conduisant à une réponse immunitaire par activation des lymphocytes T et expansion clonale. Une deuxième dite phase effectrice, à la suite d'une exposition ultérieure au même antigène, les cellules T sont activées et recrutées sur le site de dépôt de l'antigène [258]. Dans notre modèle, la phase de sensibilisation se traduit par deux injections de tuberculine en IM espacées de 15 jours (D-30, D-15). L'immunisation du babouin à la tuberculine est évaluée par Elispot à l'IFNγ.

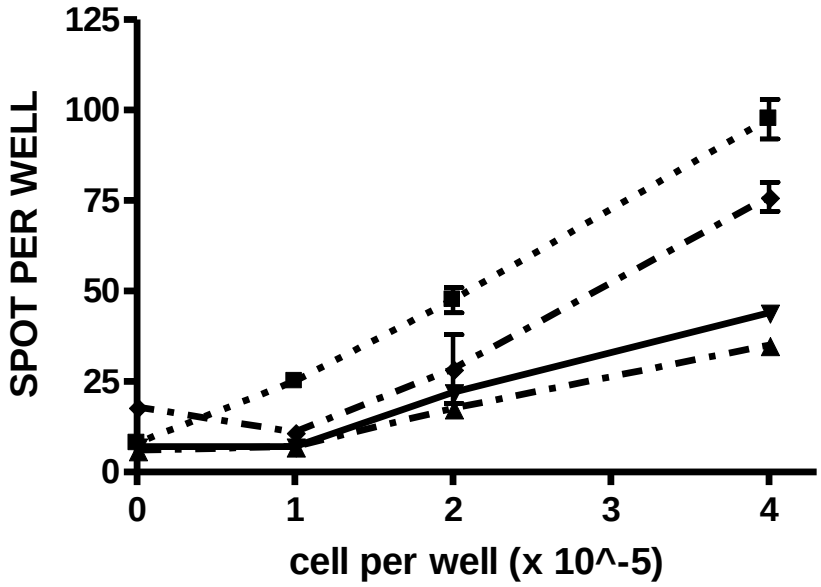
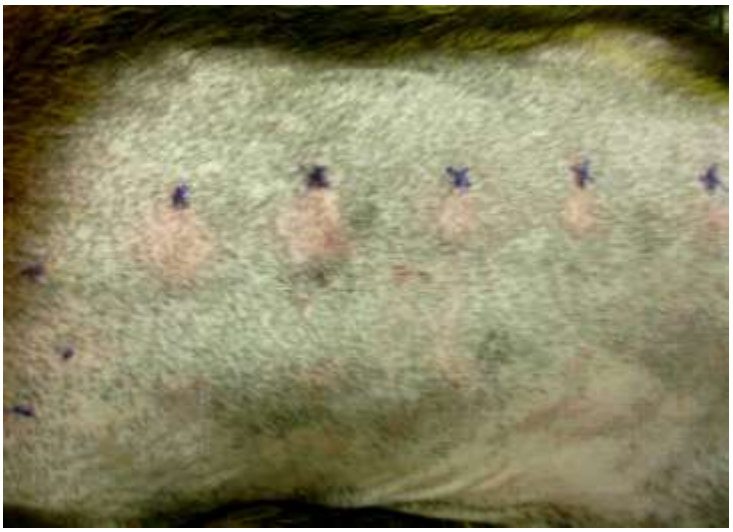


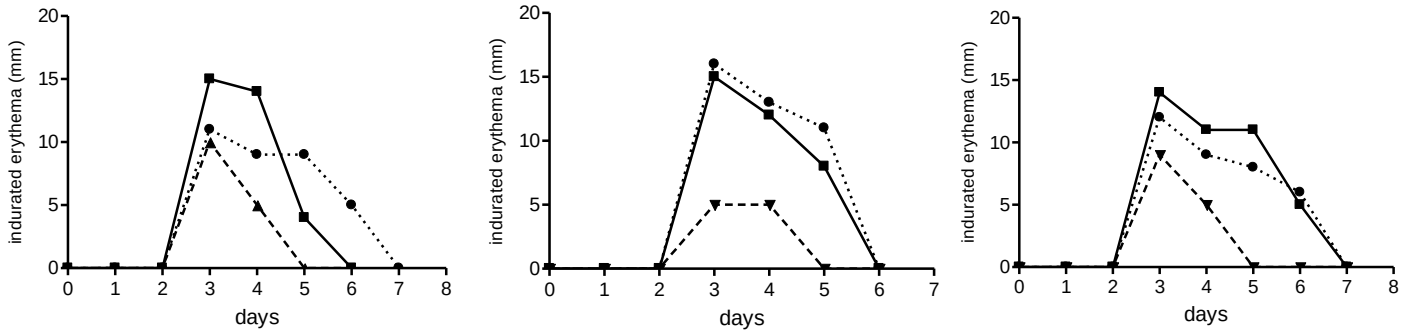
Figure 14 Elispot IFNγ de contrôle d'immunisation
Si le babouin est bien immunisé contre la tuberculine, on obtient une réponse quantifiable par le nombre de spots par puits. Cette réponse est proportionnelle à la fréquence de cellules répondeuses

Les anticorps anti-LAG-3 réduisent l'érythème

Lors de la phase effectrice, l'injection de tuberculine en intra dermique entraîne l'apparition d'un érythème au niveau du site d'injection. (Fig15A)



A



B

Figure 15: Mesure de l'érythème

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

La première intradermo-réaction (IDR) est effectuée afin de connaître la capacité de réponse de l'animal. A partir du 3ème jour l'érythème est mesuré jusqu'à disparition de

celui-ci. La deuxième IDR est effectuée le lendemain du traitement avec l'anticorps anti-LAG-3 (5mg/kg, IV). Une diminution de la réponse en durée, 5 jours contre 6/7, et en intensité, moins de 10mm contre 15 pour les contrôles, est observée. Une 3ème IDR est réalisée afin de s'assurer que la diminution de la réponse n'est pas due à une diminution de l'immunisation mais bien au traitement.

Les anticorps anti-LAG-3 réduisent l'infiltrat

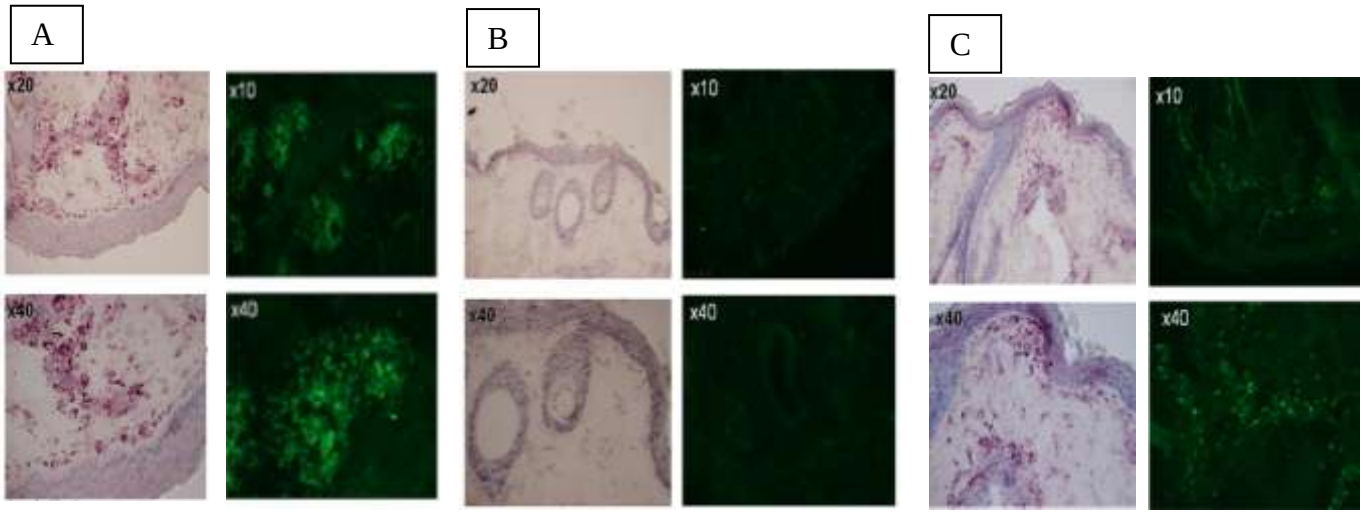


Figure 16 Immunohistochimie des biopsies des érythèmes à J4
Marquages des macrophages (CD69) sur la gauche et marquage CD3 sur la droite des planches. La planche A correspond à la biopsie de la première IDR (contrôle), B de la seconde (traité anti-LAG-3) et C de la troisième (contrôle).

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

Discussion et perspectives

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

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

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

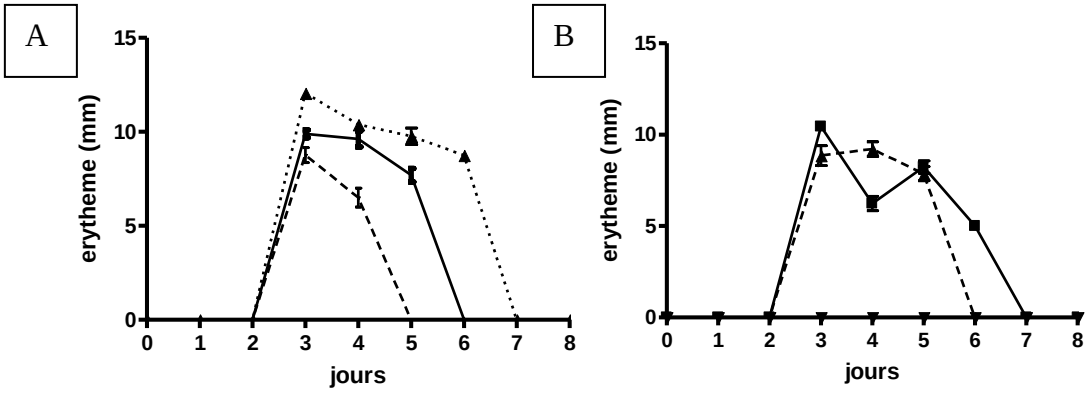


Figure 17: Mesure des érythèmes

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

Les résultats obtenus sont les mêmes avec les 2 doses d'anticorps. On observe sur la figure 16 pour la tuberculine, utilisée pure, une diminution de la réponse comme pour le 11E3. Lorsque la tuberculine avait été diluée au 1/50eme, l'IMP731 a eu un effet plus important que le 11E3 car aucun érythème n'est obtenu, la réponse est donc totalement inhibée avec cet anticorps.

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

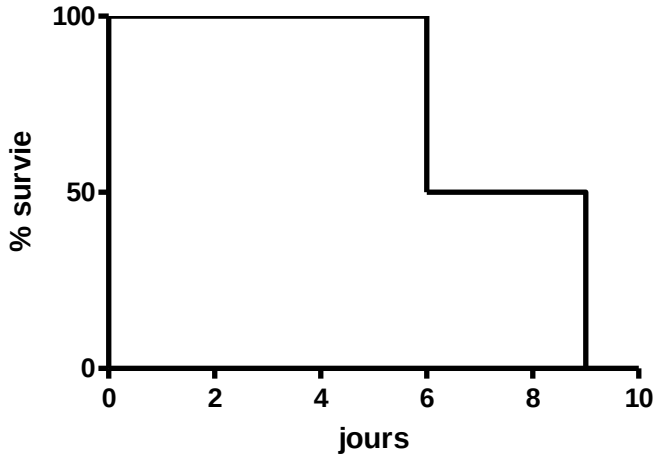


Figure 18: courbe de survie des animaux transplantés rénaux traités avec l'IMP731.

Le prolongement de survie du greffon espérée n'a pas été obtenu. Les 2 babouins ont rejetés à J6 et J9 contre J6 pour les contrôles (contrôles historiques non reproduits ici). L'anticorps cytotoxique n'a donc pas eu l'effet escompté, la raison de l'inefficacité reste inconnue. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. L'anticorps était-il injecté en quantité suffisante ? La concentration minimale détectée lors du traitement est supérieure à 1,5µg/ml, la dose circulante est donc acceptable (Fig19).

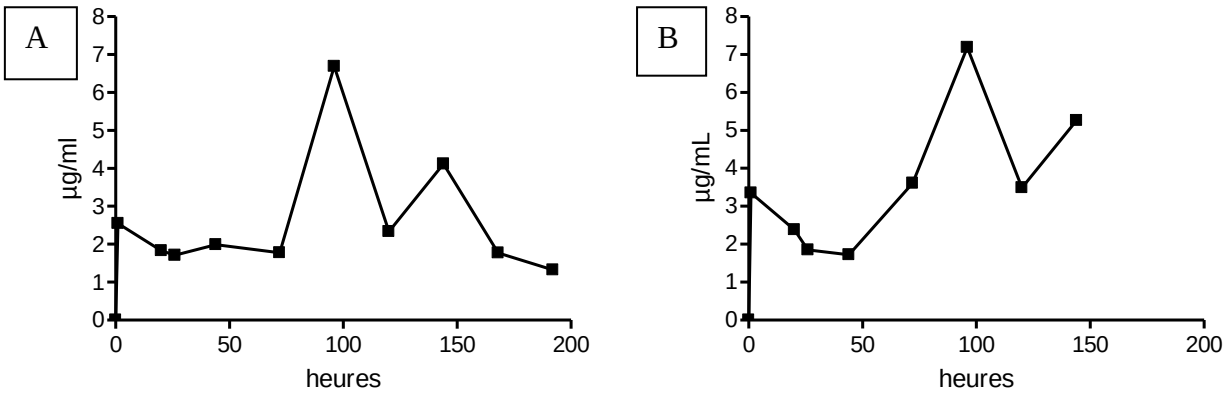


Figure 19: Concentration d'anticorps IMP731 dans les animaux greffés
Chaque jour le taux d'anticorps IMP731 présent dans le sérum de l'animal est dosé par ELISA. A : courbe de l'animal ayant survécu 9 jours (A) et7 jours (B)

L'anticorps pénètre-t-il dans le greffon ? La cible étant les cellules LAG-3 positives qui ne sont détectées que dans le greffon, l'anticorps doit pouvoir pénétrer dans le greffon. Les biopsies du greffon montrant un infiltrat élevé de cellules T LAG-3^{+}, il est possible que l'anticorps circule dans le sang mais ne pénètre pas le greffon ce qui expliquerait son inefficacité. Dans notre modèle de greffe de cœur chez le rat, cependant, les

anticorps injectés permettaient une efficacité intra-greffe. Il est possible que l'effet soit différent d'un organe à l'autre (rein pour le primate et cœur pour le rat), ou la provenance de l'anticorps a peut être une influence : anticorps polyclonal de lapin pour les expériences chez le rat et anticorps de souris humanisé pour celles primate. Pour répondre à toutes ses questions d'autres greffes sont programmées avec une dose plus forte, 5mg/kg. Une concentration plus importante d'anticorps circulant évitera peut être l'infiltrat ou permettra à l'anticorps de pénétrer dans le greffon.

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

Conclusion

Conclusion

La possibilité d'induire une régulation immunologique spécifique au greffon 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 nous sommes efforcé d'évaluer le potentiel de la cible LAG-3 dans un modèle rongeur, avant d'étudier son adaptabilité au modèle primate non humain en développant en parallèle un modèle d'étude non invasif de traitement immunosuppresseur de la réponse cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons validé la présence de la cible au moment du rejet. Dans le modèle d'allogreffe cardiaque utilisé au laboratoire, un taux élevé d'ARNm de LAG-3 a été observé au niveau du greffon par rapport à un animal tolérant. Nous avons dès lors testé l'hypothèse thérapeutique de l'élimination physique des cellules LAG-3-positives en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-LAG-3 de rat au moment de la greffe. Les résultats obtenus ne sont pas l'induction de tolérance mais une prolongation de survie après un traitement d'induction ou un arrêt du rejet en traitement tardif. Cet anticorps a donc un effet non négligeable sur les cellules T activées au moment du rejet. Cette observation offre des perspectives d'utilisation pour contrecarrer un épisode de rejet. Cependant, par le biais de l'administration d'un anticorps anti-LAG-3 dans un modèle de DBST (tolérance dépendante des Treg), nous avons observé que cet anticorps brise l'installation de la tolérance ou la tolérance induite. Ainsi son utilisation dans le cadre d'un traitement de rejet sera possible à condition que la tolérance ne depende pas de l'activité de Treg tel que dans les modèles anti-CD28 de greffes cardiaques ou rénales chez le rat. Chez l'homme, dans un contexte d'immunosuppression, le rôle joué par les Treg induites dans le maintien ou le rejet d'une allogreffe n'est pas clairement établi.

Dans un deuxième temps, nous avons testé dans un modèle pré-clinique, chez le primate, l'effet immunomodulateur d'anticorps anti-LAG-3. Nous avons tout d'abord testé un anticorps antagoniste (11E3) dans un modèle de DTH. Les résultats obtenus montrant une forte diminution de la réponse cellulaire, un deuxième anticorps humanisé, possédant quant à lui une activité cytotoxique, a été testé dans les mêmes conditions. Des résultats similaires ont été observés dans le modèle DTH. Cependant les premiers essais dans la greffe de rein chez le primate ont donné des résultats négatifs.

Conclusion

A travers les résultats obtenus chez le rongeur et le primate, LAG-3 ne semble être une cible optimale en transplantation. En effet, les réponses cellulaires peuvent être inhibées (avec des questions subsistant sur la dose chez le primate) mais l'effet déplétant pour les cellules régulatrices LAG-3+ empêche l'acquisition d'une tolérance au greffon (modèle rongeur).

Bibliographie

Bibliographie

1. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. Immunity 2001 Apr ; 14(4):387-97.

2. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. Crit Rev Oncol Hematol 2005 Oct ; 56(1):23-46.

3. Le Bas-Bernardet S, Anegon I, Blancho G. Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. Gene Ther 2008 Sep ; 15(18):1247-56.

4. Daniel C, Horvath S, Allen PM. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. Immunity 1998 May ; 8(5):543-52.

5. Lafferty KJ, Bootes A, Dart G, et al. Effect of organ culture on the survival of thyroid allografts in mice. Transplantation 1976 Aug ; 22(2):138-49.

6. Bowen KM, Andrus L, Lafferty KJ. Successful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients. Diabetes 1980 ; 29 Suppl 198-104.

7. Talmage DW, Dart G, Radovich J, et al. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. Science 1976 Jan ; 191(4225):385-8.

8. Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. J Exp Med 1982 Jan ; 155(1):31-41.

9. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, et al. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. J Exp Med 1990 Nov ; 172(5):1483-93.

10. Lakkis FG, Arakelov A, Konieczny BT, et al. Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. Nat Med 2000 Jun ; 6(6):686-8.

11. Janković V, Remus K, Molano A, et al. T cell recognition of an engineered MHC class I molecule: implications for peptide-independent alloreactivity. J Immunol 2002 Aug ; 169(4):1887-92.

12. Housset D, Malissen B. What do TCR-pMHC crystal structures teach us about MHC restriction and alloreactivity? Trends Immunol 2003 Aug ; 24(8):429-37.

13. Elliott TJ, Eisen HN. Cytotoxic T lymphocytes recognize a reconstituted class I histocompatibility antigen (HLA-A2) as an allogeneic target molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Jul ; 87(13):5213-7.

14. Matzinger P, Bevan MJ. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens? Cell Immunol 1977 Mar ; 29(1):1-5.

15. Kourilsky P, Chaouat G, Rabourdin-Combe C, et al. Working principles in the immune system implied by the "peptidic self" model. Proc Natl Acad Sci U S A 1987 May ; 84(10):3400-4.

16. Hornick PI, Mason PD, Yacoub MH, et al. Assessment of the contribution that direct allorecognition makes to the progression of chronic cardiac transplant rejection in humans. Circulation 1998 Apr ; 97(13):1257-63.

17. Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, et al. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. J Immunol 2001 Dec ; 167(12):7199-206.

18. Marelli-Berg FM, Weetman A, Frasca L, et al. Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO+ T cells and deletion of CD45RA+ T cells. J Immunol 1997 Dec ; 159(12):5853-61.

19. Inaba K, Turley S, Yamaide F, et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. J Exp Med 1998 Dec ; 188(11):2163-73.

20. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. J Immunol 1999 Jan ; 162(1):352-8.

21. Auchincloss H, Lee R, Shea S, et al. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Apr ; 90(8):3373-7.

22. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. J Exp Med 1992 Jun ; 175(6):1521-9.

23. Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, et al. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. J Clin Invest 1996 Sep ; 98(5):1150-7.

24. Josien R, Douillard P, Guillot C, et al. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. J Clin Invest 1998 Dec ; 102(11):1920-6.

25. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. J. Immunol 2004 Oct ; 173(8):4828-4837.

26. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, et al. Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance. Am. J. Transplant 2007 Jun ; 7(6):1442-1449.

27. Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, et al. Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. J. Immunol 2008 Mar ; 180(5):3081-3090.

28. Riond J, Elhmouzi J, Hudrisier D, et al. Capture of membrane components via trogocytosis occurs in vivo during both dendritic cells and target cells encounter by CD8(+) T cells. Scand. J. Immunol 2007 Oct ; 66(4):441-450.

29. Dolan BP, Gibbs KD, Ostrand-Rosenberg S. Tumor-specific CD4+ T cells are activated by "cross-dressed" dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. J. Immunol 2006 Feb ; 176(3):1447-1455.

30. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. Blood 2004 Nov ; 104(10):3257-3266.

31. Pêche H, Renaudin K, Beriou G, et al. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. Am. J. Transplant 2006 Jul ; 6(7):1541-1550.

32. Weiser MR, Williams JP, Moore FD, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. J Exp Med 1996 May ; 183(5):2343-8.

33. Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. J. Exp. Med 1996 Feb ; 183(2):699-703.

34. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. Am J Transplant 2003 Jun ; 3(6):708-14.

35. Lin Y, Soares MP, Sato K, et al. Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. J Immunol 1999 Sep ; 163(5):2850-7.

36. Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, et al. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. Am J Transplant 2001 Sep ; 1(3):260-9.

37. Park WD, Grande JP, Ninova D, et al. Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. Am J Transplant 2003 Aug ; 3(8):952-60.

38. Salama AD, Delikouras A, Pusey CD, et al. Transplant accommodation in highly sensitized patients: a potential role for Bcl-xL and alloantibody. Am J Transplant 2001 Sep ; 1(3):260-9.

39. Delikouras A, Hayes M, Malde P, et al. 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 Mar ; 71(5):599-605.

40. Auchincloss H, Lee R, Shea S, et al. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Apr ; 90(8):3373-7.

41. Pietra BA, Wiseman A, Bolwerk A, et al. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. J Clin Invest 2000 Oct ; 106(8):1003-10.

42. Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, et al. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. Nat Med 2002 Mar ; 8(3):233-9.

43. Desvaux D, Schwarzinger M, Pastural M, et al. Molecular diagnosis of renal-allograft rejection: correlation with histopathologic evaluation and antirejection-therapy resistance. Transplantation 2004 Sep ; 78(5):647-53.

44. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. Am. J. Transplant 2008 Apr ; 8(4):753-760.

45. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986 Apr ; 136(7):2348-57.

46. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. Immunity 2008 Apr ; 28(4):445-53.

47. Locksley RM. The Roaring Twenties. Immunity 2008 Apr ; 28(4):437-9.

48. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, et al. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol 2007 Apr ; 148(1):32-46.

49. Chatila TA, Li N, Garcia-Lloret M, et al. T-cell effector pathways in allergic diseases: transcriptional mechanisms and therapeutic targets. J Allergy Clin Immunol 2008 Apr ; 121(4):812-23; quiz 824-5.

50. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. Nat Rev Immunol 2002 Dec ; 2(12):933-44.

51. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell 2006 Sep ; 126(6):1121-33.

52. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature 2003 Oct ; 425(6958):577-84.

53. Chen Z, Laurence A, O'Shea JJ. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. Semin Immunol 2007 Dec ; 19(6):400-8.

54. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Curr Opin Immunol 2007 Dec ; 19(6):652-7.

55. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. Nat Immunol 2007 Sep ; 8(9):967-74.

56. Stockinger B, Veldhoen M, Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. Semin Immunol 2007 Dec ; 19(6):353-61.

57. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, et al. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol 2007 Dec ; 19(6):362-71.

58. Liao J, Huang M, Goetzl EJ. Cutting edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate. J Immunol 2007 May ; 178(9):5425-8.

59. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. Nat. Immunol 2007 Sep ; 8(9):942-949.

60. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. Nat. Immunol 2007 Sep ; 8(9):950-957.

61. Laurence A, O'Shea JJ. T(H)-17 differentiation: of mice and men. Nat. Immunol 2007 Sep ; 8(9):903-905.

62. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. Nat. Immunol 2008 Jun ; 9(6):641-649.

63. Volpe E, Servant N, Zollinger R, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. Nat. Immunol 2008 Jun ; 9(6):650-657.

64. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. Nature 2008 Jul ; 454(7202):350-352.

65. Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, et al. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. J. Exp. Med 2001 Aug ; 194(4):427-438.

66. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. Nat. Immunol 2001 Apr ; 2(4):301-306.

67. Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JPM. Molecular signature of recent thymic selection events on effector and regulatory CD4+ T lymphocytes. J. Immunol 2005 Nov ; 175(9):5751-5758.

68. van Santen H, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. J. Exp. Med 2004 Nov ; 200(10):1221-1230.

69. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J. Exp. Med 2000 Nov ; 192(9):1213-1222.

70. Wakkach A, Fournier N, Brun V, et al. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. Immunity 2003 May ; 18(5):605-617.

71. Lavelle EC, McNeela E, Armstrong ME, et al. Cholera toxin promotes the induction of regulatory T cells specific for bystander antigens by modulating dendritic cell activation. J. Immunol 2003 Sep ; 171(5):2384-2392.

72. Honey K, Cobbold SP, Waldmann H. CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. J. Immunol 1999 Nov ; 163(9):4805-4810.

73. Davies JD, Leong LY, Mellor A, et al. T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. J. Immunol 1996 May ; 156(10):3602-3607.

74. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. Transplantation 2002 May ; 73(9):1373-81.

75. Lechler RI, Garden OA, Turka LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. Nat Rev Immunol 2003 Feb ; 3(2):147-58.

76. Nickerson P, Steurer W, Steiger J, et al. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. Curr Opin Immunol 1994 Oct ; 6(5):757-64.

77. Goldman M, Le Moine A, Braun M, et al. A role for eosinophils in transplant rejection. Trends Immunol 2001 May ; 22(5):247-51.

78. Le Moine A, Goldman M. Non-classical pathways of cell-mediated allograft rejection: new challenges for tolerance induction? Am J Transplant 2003 Feb ; 3(2):101-6.

79. Chan SY, DeBruyne LA, Goodman RE, et al. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. Transplantation 1995 Apr ; 59(8):1155-61.

80. Surquin M, Le Moine A, Flamand V, et al. Skin graft rejection elicited by beta 2-microglobulin as a minor transplantation antigen involves multiple effector pathways: role of Fas-Fas ligand interactions and Th2-dependent graft eosinophil infiltrates. J Immunol 2002 Jul ; 169(1):500-6.

81. Surquin M, Le Moine A, Flamand V, et al. IL-4 deficiency prevents eosinophilic rejection and uncovers a role for neutrophils in the rejection of MHC class II disparate skin grafts. Transplantation 2005 Nov ; 80(10):1485-92.

82. Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. Nat Rev Immunol 2008 Jan ; 8(1):81-6.

83. Piccotti JR, Chan SY, Goodman RE, et al. IL-12 antagonism induces T helper 2 responses, yet exacerbates cardiac allograft rejection. Evidence against a dominant protective role for T helper 2 cytokines in alloimmunity. J Immunol 1996 Sep ; 157(5):1951-7.

84. Bäckdahl L, Bushell A, Beck S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. Int. J. Biochem. Cell Biol 2009 Jan ; 41(1):176-184.

85. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. J. Exp. Med 1996 Jun ; 183(6):2593-2603.

86. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. Immunity 1995 Dec ; 3(6):811-821.

87. Attur MG, Patel RN, Abramson SB, et al. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum 1997 Jun ; 40(6):1050-1053.

88. Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, et al. Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. J. Biol. Chem 2004 Jan ; 279(4):2559-2567.

89. Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. J. Immunol 1999 Jan ; 162(1):494-502.

90. Witowski J, Pawlaczyk K, Breborowicz A, et al. IL-17 stimulates intraperitoneal neutrophil infiltration through the release of GRO alpha chemokine from mesothelial cells. J. Immunol 2000 Nov ; 165(10):5814-5821.

91. Woltman AM, de Haij S, Boonstra JG, et al. Interleukin-17 and CD40-ligand synergistically enhance cytokine and chemokine production by renal epithelial cells. J. Am. Soc. Nephrol 2000 Nov ; 11(11):2044-2055.

92. Miyamoto M, Prause O, Sjöstrand M, et al. Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways. J. Immunol 2003 May ; 170(9):4665-4672.

93. Ye P, Garvey PB, Zhang P, et al. Interleukin-17 and lung host defense against Klebsiella pneumoniae infection. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 2001 Sep ; 25(3):335-340.

94. Laan M, Lötvall J, Chung KF, et al. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. Br. J. Pharmacol 2001 May ; 133(1):200-206.

95. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, et al. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. J. Immunol 2002 Jul ; 169(2):642-646.

96. Jones CE, Chan K. Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 2002 Jun ; 26(6):748-753.

97. Loong C, Hsieh H, Lui W, et al. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. J. Pathol 2002 Jul ; 197(3):322-332.

98. Benghiat FS, Charbonnier LM, Vokaer B, et al. Interleukin 17-producing T helper cells in alloimmunity. Transplant Rev (Orlando) 2009 Jan ; 23(1):11-18.

99. Li J, Simeoni E, Fleury S, et al. Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model. Eur J Cardiothorac Surg 2006 May ; 29(5):779-783.

100. Tang JL, Subbotin VM, Antonysamy MA, et al. Interleukin-17 antagonism inhibits acute but not chronic vascular rejection. Transplantation 2001 Jul ; 72(2):348-350.

101. Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, et al. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. J. Immunol 1999 Jan ; 162(1):577-584.

102. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J. Exp. Med 1998 Jul ; 188(2):287-296.

103. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. Int Immunol 1998 Dec ; 10(12):1969-80.

104. Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J. Exp. Med 2000 Jul ; 192(2):295-302.

105. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. Nature 2007 Nov ; 450(7169):566-569.

106. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nat. Immunol 2007 Dec ; 8(12):1353-1362.

107. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. Nature 2007 Jul ; 448(7152):484-487.

108. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity 2008 Apr ; 28(4):454-467.

109. Bouguermouh S, Fortin G, Baba N, et al. CD28 co-stimulation down regulates Th17 development. PLoS ONE 2009 ; 4(3):e5087.

110. Countouriotis A, Moore TB, Sakamoto KM. Cell surface antigen and molecular targeting in the treatment of hematologic malignancies. Stem Cells 2002 ; 20(3):215-29.

111. Jurianz K, Ziegler S, Garcia-Schüler H, et al. Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. Mol. Immunol 36(13-14):929-39.

112. Villamor N, Montserrat E, Colomer D. Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. Semin. Oncol 2003 Aug ; 30(4):424-33.

113. Olszewski AJ, Grossbard ML. Empowering targeted therapy: lessons from rituximab. Sci. STKE 2004 Jul ; 2004(241):pe30.

114. Lowenstein H, Shah A, Chant A, et al. Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. Transpl. Int 2006 Nov ; 19(11):927-36.

115. Hickman SP, Turka LA. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci 2005 Sep ; 360(1461):1713-21.

116. Williams KM, Hakim FT, Gress RE. T cell immune reconstitution following lymphodepletion. Semin. Immunol 2007 Oct ; 19(5):318-30.

117. He G, Kim OS, Thistlethwaite JR, et al. Differential effect of an anti-CD8 monoclonal antibody on rejection of murine intestine and cardiac allografts. Transplant. Proc 31(1-2):1239-41.

118. Louis S, Audrain M, Cantarovich D, et al. Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids. Transplantation 2007 Mar ; 83(6):712-21.

119. Hubbard WJ, Moore JK, Contreras JL, et al. Phenotypic and functional analysis of T-cell recovery after anti-CD3 immunotoxin treatment for tolerance induction in rhesus macaques. Hum. Immunol 2001 May ; 62(5):479-87.

120. Pearl JP, Parris J, Hale DA, et al. Immunocompetent T-cells with a memory-like phenotype are the dominant cell type following antibody-mediated T-cell depletion. Am. J. Transplant 2005 Mar ; 5(3):465-74.

121. Bonnefoy-Berard N, Revillard JP. Mechanisms of immunosuppression induced by antithymocyte globulins and OKT3. J. Heart Lung Transplant 1996 May ; 15(5):435-42.

122. Chung DT, Korn T, Richard J, et al. Anti-thymocyte globulin (ATG) prevents autoimmune encephalomyelitis by expanding myelin antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells. Int. Immunol 2007 Aug ; 19(8):1003-10.

123. Lopez M, Clarkson MR, Albin M, et al. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. J. Am. Soc. Nephrol 2006 Oct ; 17(10):2844-53.

124. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells in vitro. Blood 2008 Apr ; 111(7):3675-83.

125. Fehr T, Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. Transpl. Immunol 13(2):117-30.

126. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, et al. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. N. Engl. J. Med 2006 Nov ; 355(19):1967-77.

127. Boyd K, Dearden CE. Alemtuzumab in the treatment of chronic lymphocytic lymphoma. Expert Rev Anticancer Ther 2008 Apr ; 8(4):525-33.

128. Reiff A. A review of Campath in autoimmune disease: biologic therapy in the gray zone between immunosuppression and immunoablation. Hematology 2005 Apr ; 10(2):79-93.

129. Calne R. "Prope" tolerance: induction, lymphocyte depletion with minimal maintenance. Transplantation 2005 Jul ; 80(1):6-7.

130. Birhiray RE, Shaw G, Guldan S, et al. Phenotypic transformation of CD52(pos) to CD52(neg) leukemic T cells as a mechanism for resistance to CAMPATH-1H. Leukemia 2002 May ; 16(5):861-4.

131. Rowan WC, Hale G, Tite JP, et al. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes. Int. Immunol 1995 Jan ; 7(1):69-77.

132. Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. Clin. Immunol 2006 Sep ; 120(3):247-59.

133. Trzonkowski P, Zilvetti M, Chapman S, et al. Homeostatic repopulation by CD28-CD8+ T cells in alemtuzumab-depleted kidney transplant recipients treated with reduced immunosuppression. Am. J. Transplant 2008 Feb ; 8(2):338-47.

134. Kirsch BM, Haidinger M, Zeyda M, et al. Alemtuzumab (Campath-1H) induction therapy and dendritic cells: Impact on peripheral dendritic cell repertoire in renal allograft recipients. Transpl. Immunol 2006 Nov ; 16(3-4):254-7.

135. Kirsch BM, Haidinger M, Zeyda M, et al. Alemtuzumab (Campath-1H) induction therapy and dendritic cells: Impact on peripheral dendritic cell repertoire in renal allograft recipients. Transpl. Immunol 2006 Nov ; 16(3-4):254-7.

136. Carpenter PA, Pavlovic S, Tso JY, et al. Non-Fc receptor-binding humanized anti-CD3 antibodies induce apoptosis of activated human T cells. J. Immunol 2000 Dec ; 165(11):6205-13.

137. Janssen O, Wesselborg S, Kabelitz D. Immunosuppression by OKT3--induction of programmed cell death (apoptosis) as a possible mechanism of action. Transplantation 1992 Jan ; 53(1):233-4.

138. Hirsch R, Gress RE, Pluznik DH, et al. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. J. Immunol 1989 Feb ; 142(3):737-43.

139. Nicolls MR, Aversa GG, Pearce NW, et al. Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody. Transplantation 1993 Mar ; 55(3):459-68.

140. Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. Nat. Rev. Immunol 2003 Feb ; 3(2):123-32.

141. Smith JA, Tso JY, Clark MR, et al. Nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibodies deliver a partial T cell receptor signal and induce clonal anergy. J. Exp. Med 1997 Apr ; 185(8):1413-22.

142. Armstrong N, Buckley P, Oberley T, et al. Analysis of primate renal allografts after T-cell depletion with anti-CD3-CRM9. Transplantation 1998 Jul ; 66(1):5-13.

143. Asiedu CK, Goodwin KJ, Balgansuren G, et al. Elevated T regulatory cells in long-term stable transplant tolerance in rhesus macaques induced by anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin. J. Immunol 2005 Dec ; 175(12):8060-8.

144. Asiedu CK, Goodwin KJ, Balgansuren G, et al. Letter of retraction. J. Immunol 2006 Aug ; 177(3):2023.

145. Sido B, Otto G, Zimmermann R, et al. Prolonged allograft survival by the inhibition of costimulatory CD2 signals but not by modulation of CD48 (CD2 ligand) in the rat. Transpl. Int 1996 ; 9 Suppl 1S323-7.

146. Dehoux JP, Talpe S, Dewolf N, et al. Effects on human and nonhuman primate immune response of a new rat anti-CD2 monoclonal antibody. Transplantation 2000 Jun ; 69(12):2622-33.

147. Shaffer J, Villard J, Means TK, et al. Regulatory T-cell recovery in recipients of haploidentical nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation with a humanized anti-CD2 mAb, MEDI-507, with or without fludarabine. Exp. Hematol 2007 Jul ; 35(7):1140-52.

148. Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. N. Engl. J. Med 2008 Jan ; 358(4):353-61.

149. Dufter C, Terness P, Post S, et al. Prolonged rat allograft survival induced by temporary elimination of alpha/beta T cells with monoclonal antibody. Transpl. Int 1994 ; 7 Suppl 1S580-3.

150. Pearson TC, Bushell AR, Darby CR, et al. Lymphocyte changes associated with prolongation of cardiac allograft survival in adult mice using anti-CD4 monoclonal antibody. Clin. Exp. Immunol 1993 May ; 92(2):211-7.

151. Qin SX, Cobbold S, Benjamin R, et al. Induction of classical transplantation tolerance in the adult. J. Exp. Med 1989 Mar ; 169(3):779-94.

152. Flavin T, Shizuru J, Seydel K, et al. Selective T-cell depletion with Ox-38 anti-CD4 monoclonal antibody prevents cardiac allograft rejection in rats. The Journal of Heart Transplantation 9(5):482-8.

153. Bushell A, Morris PJ, Wood KJ. Transplantation tolerance induced by antigen pretreatment and depleting anti-CD4 antibody depends on CD4+ T cell regulation during the induction phase of the response. Eur. J. Immunol 1995 Sep ; 25(9):2643-9.

154. Arima T, Lehmann M, Flye MW. Induction of donor specific transplantation tolerance to cardiac allografts following treatment with nondepleting (RIB 5/2) or

depleting (OX-38) anti-CD4 mAb plus intrathymic or intravenous donor alloantigen. Transplantation 1997 Jan ; 63(2):284-92.

155. Motoyama K, Kamei T, Arima T, et al. Pretransplant intrathymic inoculation of donor antigen combined with FK506 treatment: prolongation of survival of cardiac, but not renal, allografts in rats. World Journal of Surgery 19(2):299-302.

156. Watson CJ, Cobbold SP, Davies HS, et al. Immunosuppression of canine renal allograft recipients by CD4 and CD8 monoclonal antibodies. Tissue Antigens 1994 Mar ; 43(3):155-62.

157. Mourad GJ, Preffer FI, Wee SL, et al. Humanized IgG1 and IgG4 anti-CD4 monoclonal antibodies: effects on lymphocytes in the blood, lymph nodes, and renal allografts in cynomolgus monkeys. Transplantation 1998 Mar ; 65(5):632-41.

158. Ninova DI, Ferguson DM, Wettstein PJ, et al. Liver allograft rejection in rats depleted of CD8+ cells. Transpl. Int 1996 ; 9(5):499-505.

159. Seydel K, Shizuru J, Grossman D, et al. Anti-CD8 abrogates effect of anti-CD4-mediated islet allograft survival in rat model. Diabetes 1991 Nov ; 40(11):1430-4.

160. Lu X, Borel JF. Requirement of CD4 cells for induction and maintenance of unresponsiveness in islet xenografted mice. Xenotransplantation 1998 Aug ; 5(3):207-14.

161. Mottram PL, Murray-Segal LJ, Han W, et al. Transgenic anti-CD4 monoclonal antibody secretion by mouse segmental pancreas allografts promotes long term survival. Transpl. Immunol 2000 Nov ; 8(3):203-9.

162. Mandel TE, Dillon H, Koulmanda M. The effect of a depleting anti-CD4 monoclonal antibody on T cells and fetal pig islet xenograft survival in various strains of mice. Transpl. Immunol 1995 Sep ; 3(3):265-72.

163. Makhlouf L, Grey ST, Dong V, et al. Depleting anti-CD4 monoclonal antibody cures new-onset diabetes, prevents recurrent autoimmune diabetes, and delays allograft rejection in nonobese diabetic mice. Transplantation 2004 Apr ; 77(7):990-7.

164. Bishop DK, Li W, Chan SY, et al. Helper T lymphocyte unresponsiveness to cardiac allografts following transient depletion of CD4-positive cells. Implications for cellular and humoral responses. Transplantation 1994 Sep ; 58(5):576-84.

165. Uehara S, Chase CM, Colvin RB, et al. T-cell depletion eliminates the development of cardiac allograft vasculopathy in mice rendered tolerant by the induction of mixed chimerism. Transplant. Proc 2006 Dec ; 38(10):3169-71.

166. Yi H, Zhen Y, Zeng C, et al. Depleting anti-CD4 monoclonal antibody (GK1.5) treatment: influence on regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells in mice. Transplantation 2008 Apr ; 85(8):1167-74.

167. Schenk AD, Nozaki T, Rabant M, et al. Donor-Reactive CD8 Memory T Cells Infiltrate Cardiac Allografts Within 24-h Posttransplant in Naive Recipients. Am. J. Transplant 2008 Jun ;

168. Koyama I, Nadazdin O, Boskovic S, et al. Depletion of CD8 memory T cells for induction of tolerance of a previously transplanted kidney allograft. Am. J. Transplant 2007 May ; 7(5):1055-61.

169. Allan JS, Choo JK, Vesga L, et al. Cardiac allograft vasculopathy is abrogated by anti-CD8 monoclonal antibody therapy. Ann. Thorac. Surg 1997 Oct ; 64(4):1019-25.

170. Chan SY, DeBruyne LA, Goodman RE, et al. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. Transplantation 1995 Apr ; 59(8):1155-61.

171. Forbes RD, Zheng SX, Gomersall M, et al. Evidence that recipient CD8+ T cell depletion does not alter development of chronic vascular rejection in a rat heart allograft model. Transplantation 1994 Apr ; 57(8):1238-46.

172. Wee SL, Colvin RB, Phelan JM, et al. Fc-receptor for mouse IgG1 (Fc gamma RII) and antibody-mediated cell clearance in patients treated with Leu2a antibody. Transplantation 1989 Dec ; 48(6):1012-7.

173. Lin C, Hünig T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. Eur. J. Immunol 2003 Mar ; 33(3):626-38.

174. Haspot F, Villemain F, Laflamme G, et al. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. Blood 2002 Mar ; 99(6):2228-34.

175. Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, et al. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. J. Immunol 2001 Sep ; 167(6):3231-8.

176. Yu X, Albert MH, Martin PJ, et al. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. J. Clin. Invest 2004 Jun ; 113(11):1624-30.

177. Golovina TN, Mikheeva T, Suhoski MM, et al. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. J. Immunol 2008 Aug ; 181(4):2855-68.

178. Ito T, Hanabuchi S, Wang Y, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. Immunity 2008 Jun ; 28(6):870-80.

179. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, et al. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. Int. Immunol 1998 Jun ; 10(6):775-83.

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

181. Thomas-Vaslin V, Bellier B, Cohen JL, et al. Prolonged allograft survival through conditional and specific ablation of alloreactive T cells expressing a suicide gene. Transplantation 2000 May ; 69(10):2154-61.

182. Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. Nat. Med 1999 Jun ; 5(6):686-93.

183. Monk NJ, Hargreaves REG, Marsh JE, et al. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. Nat. Med 2003 Oct ; 9(10):1275-80.

184. Cho CS, Burkly LC, Fechner JH, et al. Successful conversion from conventional immunosuppression to anti-CD154 monoclonal antibody costimulatory molecule blockade in rhesus renal allograft recipients. Transplantation 2001 Aug ; 72(4):587-97.

185. Waldmann TA. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. Science 1986 May ; 232(4751):727-32.

186. Kuttler B, Kauert C, Wanka H, et al. Temporary anti-CD25/CsA therapy induces a CD4+ T-cell-mediated tolerance in BB/OK rats. J. Autoimmun 1996 Jun ; 9(3):321-9.

187. Strom TB, Kelley VR, Woodworth TG, et al. Interleukin-2 receptor-directed immunosuppressive therapies: antibody- or cytokine-based targeting molecules. Immunol. Rev 1992 Oct ; 129131-63.

188. Li W, Carper K, Liang Y, et al. Anti-CD25 mAb administration prevents spontaneous liver transplant tolerance. Transplant. Proc 2006 Dec ; 38(10):3207-8.

189. Benghiat FS, Graca L, Braun MY, et al. Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. Transplantation 2005 Mar ; 79(6):648-54.

190. Kreijveld E, Koenen HJPM, Klasen IS, et al. Following anti-CD25 treatment, a functional CD4+CD25+ regulatory T-cell pool is present in renal transplant recipients. Am. J. Transplant 2007 Jan ; 7(1):249-55.

191. Vlad G, Ho EK, Vasilescu ER, et al. Anti-CD25 treatment and FOXP3-positive regulatory T cells in heart transplantation. Transpl. Immunol 2007 Jul ; 18(1):13-21.

192. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2006 Apr ; 103(15):5941-6.

193. Rothstein DM, Yamada A, Schlossman SF, et al. Cyclic regulation of CD45 isoform expression in a long term human CD4+CD45RA+ T cell line. J. Immunol 1991 Feb ; 146(4):1175-83.

194. Davies JD, O'Connor E, Hall D, et al. CD4+ CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection. J. Immunol 1999 Nov ; 163(10):5353-7.

195. Luke PPW, Deng JP, Lian D, et al. Prolongation of allograft survival by administration of anti-CD45RB monoclonal antibody is due to alteration of CD45RBhi: CD45RBlo T-cell proportions. Am. J. Transplant 2006 Sep ; 6(9):2023-34.

196. Leach MW, Bean AG, Mauze S, et al. Inflammatory bowel disease in C.B-17 scid mice reconstituted with the CD45RBhigh subset of CD4+ T cells. Am. J. Pathol 1996 May ; 148(5):1503-15.

197. Lazarovits AI, Poppema S, Zhang Z, et al. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. Nature 1996 Apr ; 380(6576):717-20.

198. Gajewski TF, Qian D, Fields P, et al. Anergic T-lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1994 Jan ; 91(1):38-42.

199. Basadonna GP, Auersvald L, Khuong CQ, et al. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1998 Mar ; 95(7):3821-6.

200. Tchilian EZ, Beverley PCL. CD45 in memory and disease. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 2002 ; 50(2):85-93.

201. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. Annu. Rev. Immunol 1998 ; 16201-23.

202. Chen G, Luke PPW, Yang H, et al. Anti-CD45RB monoclonal antibody prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys. Am. J. Transplant 2007 Jan ; 7(1):27-37.

203. Bloom DD, Chang Z, Fechner JH, et al. CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells increase de novo in kidney transplant patients after immunodepletion with Campath-1H. Am. J. Transplant 2008 Apr ; 8(4):793-802.

204. Monk NJ, Hargreaves REG, Marsh JE, et al. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. Nat. Med 2003 Oct ; 9(10):1275-80.

205. Haudebourg T, Dugast A, Coulon F, et al. Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance. Transplantation 2007 Dec ; 84(11):1500-6.

206. Bruniquel D, Borie N, Triebel F. Genomic organization of the human LAG-3/CD4 locus. Immunogenetics 1997 ; 47(1):96-8.

207. Huard B, Gaulard P, Faure F, et al. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. Immunogenetics 1994 ; 39(3):213-7.

208. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J Exp Med 1990 May ; 171(5):1393-405.

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

210. Chun T, Cho H, Chung Y. Cloning of rat lymphocyte activation gene-3 (Lag3; CD223) cDNA and its mRNA expression in rat tissues. Eur J Immunogenet 2004 Feb ; 31(1):5-9.

211. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, et al. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). Eur J Immunol 2002 Aug ; 32(8):2255-63.

212. Kisielow M, Kisielow J, Capoferri-Sollami G, et al. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. Eur J Immunol 2005 Jul ; 35(7):2081-8.

213. Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, et al. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. J. Immunol 2009 Feb ; 182(4):1885-1891.

214. Baixeras E, Huard B, Miossec C, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. J Exp Med 1992 Aug ; 176(2):327-37.

215. Annunziato F, Manetti R, Tomasévic I, et al. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production . FASEB J 1996 May ; 10(7):769-76.

216. Demeure CE, Wolfers J, Martin-Garcia N, et al. T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts. Eur J Cancer 2001 Sep ; 37(13):1709-18.

217. Huard B, Gaulard P, Faure F, et al. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand. Immunogenetics 1994 ; 39(3):213-7.

218. Avice MN, Sarfati M, Triebel F, et al. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. J Immunol 1999 Mar ; 162(5):2748-53.

219. Avice MN, Sarfati M, Triebel F, et al. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. J Immunol 1999 Mar ; 162(5):2748-53.

220. Li N, Wang Y, Forbes K, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. EMBO J 2007 Jan ; 26(2):494-504.

221. Li N, Workman CJ, Martin SM, et al. Biochemical analysis of the regulatory T cell protein lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223). J Immunol 2004 Dec ; 173(11):6806-12.

222. Hannier S, Triebel F. The MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 is co-distributed with CD8 and CD3-TCR molecules after their engagement by mAb or peptide-MHC class I complexes. Int Immunol 1999 Nov ; 11(11):1745-52.

223. Huard B, Prigent P, Pagès F, et al. T cell major histocompatibility complex class II molecules down-regulate CD4+ T cell clone responses following LAG-3 binding. Eur J Immunol 1996 May ; 26(5):1180-6.

224. Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 May ; 94(11):5744-9.

225. Huard B, Prigent P, Tournier M, et al. CD4/major histocompatibility complex class II interaction analyzed with CD4- and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3)-Ig fusion proteins. Eur J Immunol 1995 Sep ; 25(9):2718-21.

226. Miyazaki T, Dierich A, Benoist C, et al. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. Science 1996 Apr ; 272(5260):405-8.

227. Huard B, Tournier M, Triebel F. LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. Immunol Lett 1998 Apr ; 61(2-3):109-12.

228. Byun H, Jung W, Lee D, et al. Proliferation of activated CD1d-restricted NKT cells is down-modulated by lymphocyte activation gene-3 signaling via cell cycle arrest in S phase. Cell Biol Int 2007 Mar ; 31(3):257-62.

229. Huard B, Tournier M, Hercend T, et al. Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. Eur J Immunol 1994 Dec ; 24(12):3216-21.

230. Hannier S, Tournier M, Bismuth G, et al. CD3/TCR complex-associated lymphocyte activation gene-3 molecules inhibit CD3/TCR signaling. J Immunol 1998 Oct ; 161(8):4058-65.

231. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DAA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. J Immunol 2002 Nov ; 169(10):5392-5.

232. Workman CJ, Vignali DAA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. Eur J Immunol 2003 Apr ; 33(4):970-9.

233. Miyazaki T, Dierich A, Benoist C, et al. LAG-3 is not responsible for selecting T helper cells in CD4-deficient mice. Int Immunol 1996 May ; 8(5):725-9.

234. Workman CJ, Cauley LS, Kim I, et al. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. J Immunol 2004 May ; 172(9):5450-5.

235. Workman CJ, Cauley LS, Kim I, et al. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. J Immunol 2004 May ; 172(9):5450-5.

236. Maçon-Lemaître L, Triebel F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 co-receptor (CD223) on human T cells. Immunology 2005 Jun ; 115(2):170-8.

237. Huang C, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. Immunity 2004 Oct ; 21(4):503-13.

238. Workman CJ, Vignali DAA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). J Immunol 2005 Jan ; 174(2):688-95.

239. Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, et al. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol 2007 Apr ; 178(7):4184-93.

240. Zhu X, Yang P, Zhou H, et al. CD4+CD25+Tregs express an increased LAG-3 and CTLA-4 in anterior chamber-associated immune deviation. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2007 Oct ; 245(10):1549-57.

241. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J Immunol 2008 May ; 180(9):5916-26.

242. Grosso JF, Kelleher CC, Harris TJ, et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. J Clin Invest 2007 Nov ; 117(11):3383-92.

243. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. Nat Immunol 2009 Jan ; 10(1):29-37.

244. Triebel F, Hacene K, Pichon M. A soluble lymphocyte activation gene-3 (sLAG-3) protein as a prognostic factor in human breast cancer expressing estrogen or progesterone receptors. Cancer Lett 2006 Apr ; 235(1):147-53.

245. Smith-Norowitz TA, Shani J, Weiser W, et al. Lymphocyte activation in angina pectoris. Clin Immunol 1999 Nov ; 93(2):168-75.

246. Buisson S, Triebel F. LAG-3 (CD223) reduces macrophage and dendritic cell differentiation from monocyte precursors. Immunology 2005 Mar ; 114(3):369-74.

247. Casati C, Camisaschi C, Novellino L, et al. Human lymphocyte activation gene-3 molecules expressed by activated T cells deliver costimulation signal for dendritic cell activation. J Immunol 2008 Mar ; 180(6):3782-8.

248. El Mir S, Triebel F. A soluble lymphocyte activation gene-3 molecule used as a vaccine adjuvant elicits greater humoral and cellular immune responses to both particulate and soluble antigens. J Immunol 2000 Jun ; 164(11):5583-9.

249. Brignone C, Grygar C, Marcu M, et al. IMP321 (sLAG-3), an immunopotentiator for T cell responses against a HBsAg antigen in healthy adults: a single blind randomised controlled phase I study. J Immune Based Ther Vaccines 2007 ; 55.

250. Li B, VanRoey M, Triebel F, et al. Lymphocyte activation gene-3 fusion protein increases the potency of a granulocyte macrophage colony-stimulating factor-secreting tumor cell immunotherapy. Clin Cancer Res 2008 Jun ; 14(11):3545-54.

251. André P, Prasad KSS, Denis CV, et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. Nat. Med 2002 Mar ; 8(3):247-52.

252. Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. Trends Immunol 2003 Dec ; 24(12):619-22.

253. Jarvinen LZ, Blazar BR, Adeyi OA, et al. CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. Transplantation 2003 Nov ; 76(9):1375-1379.

254. Sebille F, Brouard S, Petzold T, et al. Tolerance induction in rats, using a combination of anti-CD154 and donor splenocytes, given once on the day of transplantation. Transplantation 2003 Jan ; 75(2):169-172.

255. Fougeray S, Brignone C, Triebel F. A soluble LAG-3 protein as an immunopotentiator for therapeutic vaccines: Preclinical evaluation of IMP321. Vaccine 2006 Jun ; 24(26):5426-33.

256. Dugast A, Haudebourg T, Coulon F, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. J. Immunol 2008 Jun ; 180(12):7898-906.

257. Haspot F, Séveno C, Dugast A, et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. Am. J. Transplant 2005 Oct ; 5(10):2339-2348.

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

Annexes

Annexe I : Brevet EPO N° 07290545.8-2406

Cytotoxic anti-LAG-3 monoclonal antibody and its use in the treatment or prevention of organ transplant rejection and autoimmune disease

(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) EP 1 987 839 A1

(12) EUROPEAN PATENT APPLICATION

(43) Date of publication:
05.11.2008 Bulletin 2008/45

(51) Int Cl.:
A61K 39/00 *(2006.01)* ***C07K 16/28*** *(2006.01)*

(21) Application number: **07290545.8**

(22) Date of filing: **30.04.2007**

(84) Designated Contracting States:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR
Designated Extension States:
AL BA HR MK RS

(71) Applicants:
- **I.N.S.E.R.M. Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale**
  75654 Paris Cedex 13 (FR)
- **Immutep**
  91893 Orsay Cedex (FR)

(72) Inventors:
- **Triebel, Frédéric**
  78000 Versailles (FR)
- **Vanhove, Bernard**
  44400 Rezé (FR)
- **Haudebourg, Thomas**
  44000 Nantes (FR)

(74) Representative: **Bredema**
38, avenue de l'Opéra
75002 Paris (FR)

Remarks:
The sequence listing, which is published as annex to the application documents, was filed after the date of filing. The applicant has declared that it does not include matter which goes beyond the content of the application as filed.

(54) **Cytotoxic anti-LAG-3 monoclonal antibody and its use in the treatment or prevention of organ transplant rejection and autoimmune disease**

(57) The present invention concerns a molecule binding to LAG-3 protein and causing depletion of LAG-3+ activated T cells particularly said molecule is a cytotoxic anti-LAG-3 monoclonal antibody or fragment thereof. It also concerns a method of treating or preventing organ transplant rejection or autoimmune diseases in a mammal comprising administering to said mammal a therapeutically effective amount of said antibody.

EP 1 987 839 A1

Printed by Jouve, 75001 PARIS (FR)

Annexe II: collaboration Dugast AS

Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion.

The Journal of Immunology

Myeloid-Derived Suppressor Cells Accumulate in Kidney Allograft Tolerance and Specifically Suppress Effector T Cell Expansion[1]

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

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

Although transplant tolerance in rats has frequently been associated with the action of regulatory T cells (Tregs)[3] (1–3), in some cases Tregs are not instrumental. For example, administration of anti-CD28 Abs (4) or anti-donor class II Abs (5) results in tolerance to kidney allografts across a full MHC barrier with an immune suppression that is at least partially dependent on non-T cells. In most cases, non-T cell populations with potential regulatory activity in the transplant setting have been identified as regulatory dendritic cells producing IDO (6) and heme oxygenase-1 (HO-1) (7), alternatively activated macrophages creating a Th2 environment (8), or NKT cells (9). Another type of non-T regulatory cell, so-called myeloid suppressor cells, have been associated with impaired immune reactivity to Ag challenge (mainly tumors but also infections), chronic inflammation, or superantigen-induced tolerance of $CD4^+$ T lymphocytes (reviewed by Sefarini et al. (10)). Myeloid suppressor cells have also been found to contribute to the immunosuppression accompanying the lethal systemic graft-vs-host reaction in irradiated mice (11). These cells are a heterogeneous mixture of myeloid cells at different stages of differentiation, including precursors of granulocytes, macrophages, dendritic cells, or early myeloid progenitors. To avoid confusion between mesenchymal stem cells and the commonly used term "myeloid suppressor cells", Gabrilovich et al. proposed the term "myeloid-derived suppressor cells" (MDSC) (12). In mice, these cells share the common functional characteristics of being able to inhibit T cell responses by inducing the apoptosis of activated T cells via up-regulation of NO production (13). NO regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak/STAT5 signaling pathway (14). Additionally, arginase 1 can be induced in MDSC under the action of Th2-type cytokines, which synergize with NO to give rise to peroxynitrites that drive the apoptosis of Ag-primed T lymphocytes by inhibiting protein tyrosine phosphorylation via nitration of tyrosine residues (15). It has also been suggested that MDSC suppressive activity is mediated by $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells and requires an interaction between CD152 on Tregs with CD80 that is up-regulated on MDSC upon contact with activated T lymphocytes (16). Mouse MDSC are defined phenotypically by their expression of CD11b and Gr1 (Ly-6G). The human equivalents are less well defined; they have been described as granulocyte-macrophage-progenitor cells expressing the CD34 marker (17). The rat counterparts express the CD11b/c and HIS48 myeloid markers (18).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Animals and transplantations

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

Tolerance induction

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

Abs and reagents

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

Cells and cell sorting

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

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system using SYBR Green PCR core reagents. The following oligonucleotides were used: rat iNOS: upper primer 5′-GACCAAACTGTGTGCCTGGA-3′ and lower primer 5′-TACTCTGAGGGCTGACACAAGG-3′; and rat hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): upper primer 5′-CCTTGGTCAAGCAGTA CAGCC-3′ and lower primer 5′-TTCGCTGATGACACAAACATGA-3′. HPRT was used as an endogenous control gene to normalize varying starting amounts of RNA. Relative expression between a given sample and a control sample, used for all experiments, was calculated with the $2(-\Delta\Delta C_t)$ method. All samples were analyzed in duplicate. Expression of genes of interest was compared between tolerant animals and syngeneic controls.

Adoptive cell transfer

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

Cell culture and proliferation assays

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

Mixed leukocyte reactions

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

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed in a ^{51}Cr-release assay. Target cells (YAC-1 cells, European Cell Culture Collection) were labeled with ^{51}Cr for 60 min at 37°C in complete medium. Serial dilutions of effector cells in complete medium were mixed with 3000 ^{51}Cr-labeled target cells in triplicate in V-bottom 96-well plates and centrifuged for 1 min at $1500 \times g$. Plates were then incubated for 4 h at 37°C, 5% CO_2. The supernatants were harvested and ^{51}Cr release was determined using a scintillation counter (PerkinElmer). Specific cytotoxicity was calculated according to the following formula: (experimental release − spontaneous release) × 100/ (maximum release − spontaneous release).

Cytokine assays

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

Immunostaining

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

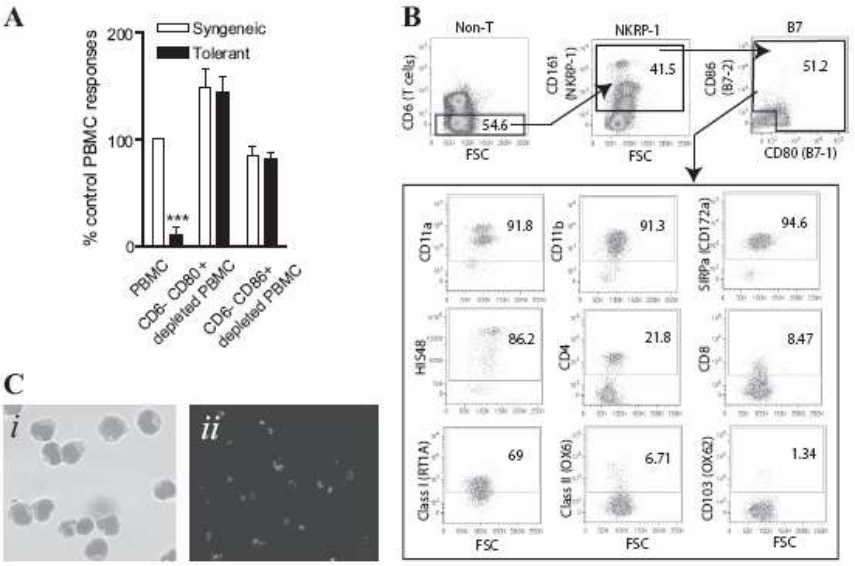


FIGURE 1. Characterization of non-T regulatory cells present in peripheral blood. *A*, Expression of CD80 and CD86. PBMC of the LEW.1A haplotype from syngeneic kidney graft recipients (open bars) or from tolerant kidney allograft recipients (3 mo posttransplantation; filled bars) were depleted of CD6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

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

Western blot analysis

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

FACS analyses

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

Statistical analyses

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

Results

Regulatory cell phenotype

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

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

Suppression assays

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

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

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

To challenge the role of MDSC in vivo, we first tried to transfer tolerance with MDSC. However, the transfer of 2×10^6 MDSC isolated from the blood or the bone marrow did not significantly prolong kidney allograft survival (after the transfer of 2×10^6 MDSC in three recipients, kidney grafts survived 12, 14, and 16 days vs 11 days in untreated recipients). Transfers repeated on days 0, 3, and 6 were not more efficient. Additionally, the transfer of unsorted blood cells (25×10^6 cells) or spleen cells (200×10^6 cells) had no effect on allograft survival. However, using a previously described graft-vs-host disease-like system where CFSE-labeled T cells are infused into irradiated allogeneic recipients (21), we observed that coinjection of MDSC prevented the proliferation of allogeneic T cells in vivo (Fig. 2*F*).

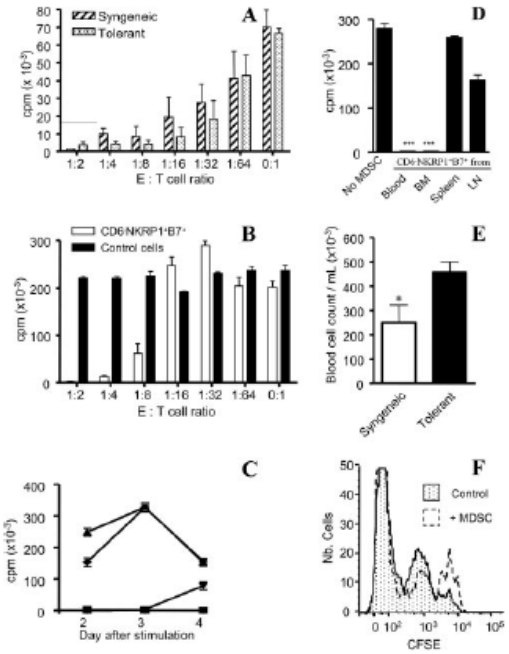


FIGURE 2. Suppressive activity of $CD6^-NKRP\text{-}1^+CD80/86^+$ MDSC. *A*, Suppression of mixed lymphocyte reactions. Purified LEW.1A T cells were stimulated with allogeneic LEW.1W APCs in the presence of the indicated ratios of effector ("E") $CD6^-NKRP\text{-}1^+CD80/86^+$ cells from the blood of tolerant allograft recipients or of recipients of syngeneic grafts. Shown are means ± SD of triplicate wells from one representative experiment out of six. *B*, Suppression of polyclonal stimulation. Purified LEW.1A T cells (10^5 cells/well) were stimulated with anti-CD3/CD28 in the presence of the indicated ratios of blood $CD6^-NKRP\text{-}1^+CD80/86^+$ cells or in the presence of control blood $CD6^-NKRP\text{-}1^+CD80/86^-$ cells from tolerant allograft recipients. [^{3}H]thymidine incorporation was measured after 3 days. Shown are means ± SD of triplicate wells from 1 representative experiment out of 10. *C*, Time-course of suppression. Same experiment as in *B*, performed at an E:T ratio of 1:4, where [^{3}H]thymidine incorporation was measured after 2, 3, and 4 days. *D*, Immune compartments containing suppressive cells. Purified T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 mAbs in the presence of $CD6^-NKRP\text{-}1^+CD80/86^+$ cells (2.10^4) sorted from blood, bone marrow, spleen, and lymph nodes. [^{3}H]thymidine incorporation was measured after 3 days. *E*, Accumulation of MDSC in the blood of tolerant recipients. Blood samples collected on heparin were cleared of erythrocytes by hypotonic lysis and stained with CD6-FITC, NKR-P1 Alexa Fluor 647, CD80-PE, and CD86-PECy7. Total numbers of $CD6^-NKRP1^+CD80/86^+$ MDSC were evaluated in tolerant kidney allograft recipients (filled bar, $n = 5$) and in age-matched syngeneic kidney graft recipients (open bar, $n = 5$), 100 days posttransplantation. Results are expressed as mean cell number/ml blood ± SD. *, $p < 0.05$. Similar results were found in two other evaluations performed up to day 250 posttransplantation. *F*, In vivo inhibition of alloreactive T cell proliferation. CFSE-labeled spleen cells (150×10^6) were injected i.v. into irradiated allogeneic rat recipients. Half of the recipients additionally received 8×10^6 MDSC purified from blood. After 2.5 days, the relative abundance of $CFSE^{high}$ and $CFSE^{low}$ T cells was measured in the spleen by flow cytometry. Dotted histogram, controls; open histogram, coinjection of MDSC (one figure representative of two independent experiments).

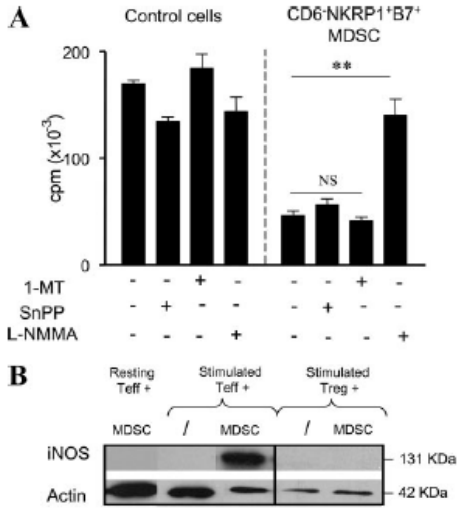


FIGURE 3. Mechanisms of action of CD6$^-$NKRP-1$^+$CD80/86$^+$ MDSC. *A*, Role of iNOS in the suppression. T cells from naive animals were stimulated with anti-CD3/CD28 Abs in the presence of a 1:3 E:T ratio of control CD6$^-$NKRP-1$^+$CD80/86$^-$ cells or CD6$^-$ NKRP-1$^+$CD80/86$^+$ MDSC extracted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

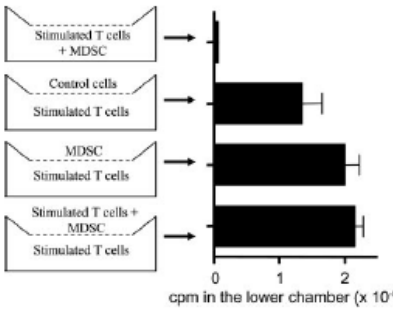


FIGURE 4. MDSC act in a contact-dependent manner. Transwell chambers were used to prevent direct cell contact between anti-CD3/CD28-stimulated T cells (6×10^5 cells from naive animals) and MDSC or control CD6$^-$CD80/86$^-$ cells (1.5×10^5 cells from the blood of tolerant kidney graft recipients). Proliferation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

Mechanisms of action

In the rat, high levels of NKRP-1 expression are characteristic of NK cells. Because NKRP-1 was expressed on non-T CD80/86$^+$ cells, we tested whether direct cytotoxicity could be responsible for their suppressive action. Using target YAC-1 cells, we observed an absence of cytotoxic activity, whereas control cells with the non-T CD80/86-negative NKRP-1$^+$ phenotype induced up to 60% cytotoxicity (data not shown), presumably because this cell population contained NKRP-1^{high} NK cells. Therefore, direct NK-like cytotoxicity is not involved in the suppressive mechanism of the non-T CD80/86$^+$NKRP-1$^+$ cells. Because NO is known to be involved in several mechanisms of immunosuppression and because we detected iNOS expression by immunohistology (Fig. 1*Cii*), we next asked whether this enzyme also plays a role here. In suppression assays, a selective inhibitor of iNOS, L-NMMA (used at 5 mM), was able to reverse the suppression mediated by non-T CD80/86$^+$NKRP-1$^+$ cells (Fig. 3*A*). The finding that CD11b/c$^+$ cells suppress T cells via NO revealed that these cells had a phenotype and mechanism of action compatible with the definition of MDSC, as defined by Gabrilovitch et al. (12). Therefore, from this point on, the non-T CD80/86$^+$NKRP-1$^+$ cells are referred to as MDSC. We also noted that 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT, used at 200 μM), an inhibitor of IDO, as well as tin protoporphyrin (SnPP, used at 50 μM), an inhibitor of HO-1, were both unable to block the suppressive activity of MDSC against stimulated T lymphocytes (Fig. 3*A*). Because iNOS was implicated in the suppression by MDSC, we further tested the level of iNOS expression by Western blot. iNOS was not expressed by freshly isolated blood MDSC, and resting and activated T cells expressed no or very little iNOS. Moreover, iNOS was not expressed when MDSC were mixed with resting T cells. In contrast, after contact between activated T cells and MDSC, iNOS was strongly up-regulated (Fig. 3*B*, *left section*). Similar experiments were performed using MDSC from the spleen and lymph nodes (cells that share a comparable phenotype were isolated from these compartments). In this case, however, no iNOS up-regulation was observed in any of the conditions tested (data not shown).

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

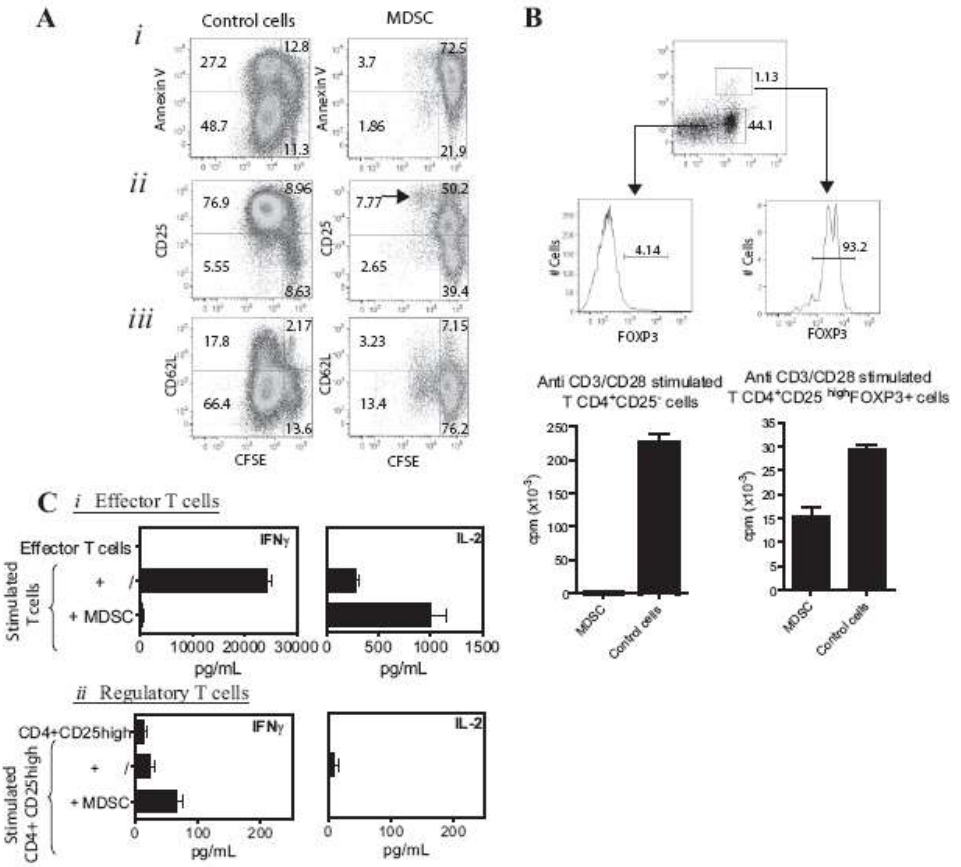


FIGURE 5. Effector function of MDSC. *A*, MDSC block proliferation but only moderately block activation of T lymphocytes. After coculture of anti-CD3/CD28-stimulated CFSE-labeled T cells with blood MDSC or control cells ($CD6^-CD80/86^-$) for 2 days, DAPI-negative cells were stained with annexin V (*i*),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

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

Differential effect on effector T cells and Tregs

According to the CFSE dilution assays after polyclonal activation, although MDSC blocked the proliferation of most $CD25^+$ T cells, a subpopulation of $CD25^{high}$ T cells escaped suppression (Fig. 5*Aii*, arrow), suggesting that $CD25^+$ Tregs might not be sensitive to MDSC. To directly measure this effect, we sorted $CD4^+CD25^-$ effector and $CD4^+CD25^{high}$ regulatory cells (93% of the $CD4^+CD25^{high}$ cells expressed FoxP3 in this assay) and tested the action of MDSC on the proliferation of these cell subpopulations. Effector T cells proliferated strongly after 3 days, and their proliferation could be fully inhibited by MDSC. In contrast, MDSC inhibited the proliferation of $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Tregs by 50% only (Fig. 5*B*). The cytokines secreted by these two T cell populations were also differentially affected by MDSC: stimulated $CD4^+CD25^-$ effector T cells produced less IFN-γ in the presence of MDSC, an observation compatible with the inhibition of their proliferation. In contrast, IL-2 production by stimulated effector T cells was not abolished by MDSC but rather was enhanced (Fig. 5*Ci*). Again, this is compatible with the idea that T cell proliferation, but not activation, is blocked by MDSC (IL-2 would therefore be released and, since not consumed by T cells, accumulate in the medium). As previously described (24), stimulated $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ Tregs produced very low quantities of IL-2 and produced some IFN-γ that was enhanced by the addition of MDSC (Fig. 5*Cii*).

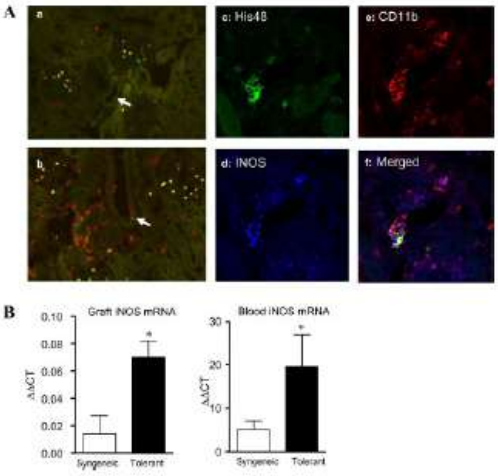


FIGURE 6. Graft infiltration and expression of iNOS. *A*, Immunohistological analysis of kidney grafts. Syngeneic grafts (*a*) and tolerated allografts (*b*) stained with CD11b (red fluorescence) and HIS48 (green fluorescence) Abs. Magnification ×10. The arrows indicate blood vessel sections. *c–f*,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

Graft infiltration and expression of iNOS

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

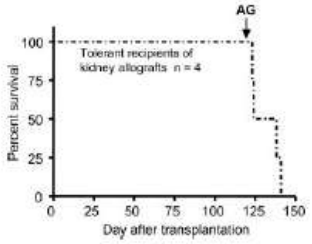


FIGURE 7. iNOS inhibition in vivo brakes tolerance. Four tolerant kidney allograft recipients (>120 days posttransplantation) received i.p. injections of 30 mg/kg of the iNOS inhibitor aminoguanidine (AG) every 12 h. Recipient survival is represented. Control rats also received aminoguanidine, and kidney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

Role of MDSC in transplant tolerance

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

Discussion

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

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

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

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

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

An important issue was the location in vivo where a contact could occur between effector T cells and blood MDSC. We detected MDSC in the blood of tolerant recipients of kidney allografts. In the spleen and lymph nodes, cells were identified that had a comparable phenotype but were devoid of ex vivo suppressive activity. By immunohistology, infiltrating cells expressing CD11b, HIS48, and iNOS markers could be detected in tolerated allografts, in the parenchyma, as well as being associated with blood vessel walls (CD80 and CD86 could not be detected by immunohistology in the rat species because the Abs do not bind to fixed tissues). Although we were unable to prove that these cells have a suppressive activity in situ, this phenotype is compatible with the presence of MDSC within the graft. Additionally, messenger RNA for iNOS was found to be accumulated 4-fold in tolerated kidneys. It is therefore possible that blood MDSC suppress T cells inside the graft. This mechanism of action would then be similar to tumor-infiltrating MDSC. In this kidney transplant model, however, tolerance is clearly associated with the control, and not the elimination, of alloreactive T cells, because they can be detected in the periphery several months after transplantation. Indeed, the simple removal of MDSC in vitro from blood cells collected on day 100 was sufficient to lift the suppression of lymphocyte alloreactivity, indicating that the Ag-specific lymphocytes had not been deleted in tolerant recipients. We have previously reported that donor-specific alloreactive T lymphocytes in the blood of tolerant recipients of kidney allografts expressed high rates of activation and apoptotic markers (4). This suggested that alloreactive T cells were continuously produced, presumably as a result of a thymic output, and kept under control by contact with MDSC, which as a result induced apoptosis not only in the graft but also in the blood. Herein, we confirmed in vitro that reactive T cells express activation markers (express CD25 and lose CD62L) and undergo apoptosis at a high rate in the presence of MDSC.

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

1. Pirenne, J., H. Kitade, M. Kawai, T. Koshiba, B. Van Damme, C. Mathieu, and M. Waer. 2005. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and Ab-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 79: S25–S27.
2. Chiffoleau, E., G. Beriou, P. Dutartre, C. Usal, J. P. Soulillou, and M. C. Cuturi. 2002. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation: evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am. J. Transplant.* 2: 745–757.
3. Guillonneau, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffoleau, C. Herve, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Menoret, et al. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by $CD8^+CD45RC^{low}$ T cells, IFN-γ, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 1096–1106.
4. Haspot, F., C. Seveno, A. S. Dugast, F. Coulon, K. Renaudin, C. Usal, M. Hill, I. Anegon, M. Heslan, R. Josien, et al. 2005. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am. J. Transplant.* 5: 2339–2348.
5. Degauque, N., D. Lair, A. Dupont, A. Moreau, G. Roussey, F. Moizant, F. X. Hubert, C. Louvet, M. Hill, F. Haspot, et al. 2006. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T $CD103^+$ cells. *J. Immunol.* 176: 3915–3922.
6. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.
7. Chauveau, C., S. Remy, P. J. Royer, M. Hill, S. Tanguy-Royer, F. X. Hubert, L. Tesson, R. Brion, G. Beriou, M. Gregoire, et al. 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 106: 1694–1702.
8. Tzachanis, D., A. Berezovskaya, L. M. Nadler, and V. A. Boussiotis. 2002. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 99: 1465–1473.
9. Seino, K. I., K. Fukao, K. Muramoto, K. Yanagisawa, Y. Takada, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, K. Takeda, T. Nakayama, et al. 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2577–2581.
10. Serafini, P., C. De Santo, I. Marigo, S. Cingarlini, L. Dolcetti, G. Gallina, P. Zanovello, and V. Bronte. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 53: 64–72.
11. Bobe, P., K. Benihoud, D. Grandjon, P. Opolon, L. L. Pritchard, and R. Huchet. 1999. Nitric oxide mediation of active immunosuppression associated with graft-versus-host reaction. *Blood* 94: 1028–1037.
12. Gabrilovich, D. I., V. Bronte, S. H. Chen, M. P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber. 2007. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67: 425–426.
13. Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello, and D. M. Segal. 2002. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J. Immunol.* 168: 689–695.
14. Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, P. G. Holt, and U. R. Kees. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J. Immunol.* 160: 5729–5734.
15. Brito, C., M. Naviliat, A. C. Tiscornia, F. Vuillier, G. Gualco, G. Dighiero, R. Radi, and A. M. Cayota. 1999. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* 162: 3356–3366.
16. Yang, R., Z. Cai, Y. Zhang, W. H. Yutzy, IV, K. F. Roby, and R. B. Roden. 2006. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated $Gr\text{-}1^+CD11b^+$ myeloid cells. *Cancer Res.* 66: 6807–6815.
17. Garrity, T., R. Pandit, M. A. Wright, J. Benefield, S. Keni, and M. R. Young. 1997. Increased presence of $CD34^+$ cells in the peripheral blood of head and neck cancer patients and their differentiation into dendritic cells. *Int. J. Cancer* 73: 663–669.
18. Prins, R. M., G. P. Scott, R. E. Merchant, and M. R. Graf. 2002. Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma: II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother.* 51: 190–199.
19. Soulillou, J. P., C. B. Carpenter, A. J. d'Apice, and T. B. Strom. 1976. The role of nonclassical Fc receptor-associated, Ag-B antigens (Ia) in rat allograft enhancement. *J. Exp. Med.* 143: 405–421.
20. Dengler, T. J., G. Szabo, B. Sido, W. Nottmeyer, R. Zimmerman, C. F. Vahl, T. Hunig, and S. C. Meuer. 1999. Prolonged allograft survival but no tolerance induction by modulating CD28 antibody JJ319 after high-responder rat heart transplantation. *Transplantation* 67: 392–398.
21. Haspot, F., F. Villemain, G. Laflamme, F. Coulon, D. Olive, J. Tiollier, J. P. Soulillou, and B. Vanhove. 2002. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 99: 2228–2234.
22. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol.* 169: 2284–2291.
23. Stent, G., L. Irving, S. Lewin, and S. M. Crowe. 1995. The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 100: 366–376.
24. Thornton, A. M., E. E. Donovan, C. A. Piccirillo, and E. M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of $CD4^+CD25^+$ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172: 6519–6523.
25. Tsai, M. K., H. N. Ho, H. F. Chien, P. Ou-Yang, C. J. Lee, and P. H. Lee. 2004. The role of B7 ligands (CD80 and CD86) in CD152-mediated allograft tolerance: a crosscheck hypothesis. *Transplantation* 77: 48–54.
26. Munn, D. H., and A. L. Mellor. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117: 1147–1154.
27. Bronte, V., P. Serafini, C. De Santo, I. Marigo, V. Tosello, A. Mazzoni, D. M. Segal, C. Staib, M. Lowel, G. Sutter, et al. 2003. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 170: 270–278.
28. Guillot, C., S. Menoret, C. Guillonneau, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Anegon. 2003. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4Ig. *Blood* 101: 3325–3333.
29. Kusmartsev, S. A., Y. Li, and S. H. Chen. 2000. $Gr\text{-}1^+$ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J. Immunol.* 165: 779–785.
30. Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E. J. Brown, C. Maliszewski, F. P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, et al. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-α: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J. Immunol.* 167: 2547–2554.
31. Ehirchiou, D., Y. Xiong, G. Xu, W. Chen, Y. Shi, and L. Zhang. 2007. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J. Exp. Med.* 204: 1519–1524.
32. Taylor, S. R., D. R. Alexander, J. C. Cooper, C. F. Higgins, and J. I. Elliott. 2007. Regulatory T cells are resistant to apoptosis via TCR but not P2X7. *J. Immunol.* 178: 3474–3482.

Annexe III: Communications

Oral:

- Depletion of LAG-3 positive cells in cardiac allograft reveals their role in rejection and tolerance . Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Coulon F., Triebel F Vanhove B.ESOT (European Society for Organ Transplant), Prague 2007.

- L'élimination des cellules LAG-3+ dans l'allogreffe cardiaque révèle leur rôle dans le rejet et la tolérance Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Coulon F., Triebel F Vanhove B, Forum doctorant de ED Chimie Biologie, Nantes 2008

- Différentes formes de tolérance dépendant ou non des Treg LAG-3+ chez le rat. Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Seveno C, Coulon F., Triebel F, Vanhove B. SFT (société francophone de transplantation), Québec 2008.

Poster :

- Déplétion des cellules T activées LAG-3+ dans le rejet d'allogreffe**.** Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Coulon F., Triebel F, Vanhove B. Université d'été Astellas, Avignon 2007

- Déplétion des cellules T activées LAG-3+ dans le rejet d'allogreffe**.** Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Coulon F., Triebel F, Vanhove B Forum doctorant de ED Chimie Biologie, Nantes 2007

- Immune regulation with or without Treg. Haudebourg T, Dugast AS, Martinet B, Coulon F., Triebel F, Vanhove B NAT (Nantes Actualité Transplantation), Nantes 2008
- Anti-LAG-3 antibodies control delayed type hypersensitivity to tuberculin intradermo reaction in primates Haudebourg T, Poirier N., Hervouet J., Martinet M;, Tirebel F., Blancho G., Vanhove B. ESOT Basic Science Symposium, Bruxelles 2009.

ROLE DES LYMPHOCYTES LAG-3 POSITIFS EN TRANSPLANTATION

Les traitements immunosuppresseurs ont des effets secondaires important et n'inhibent que partiellement le rejet chronique en transplantation. Il est donc important de continuer à chercher de nouvelles voies thérapeutiques pouvant améliorer l'immunosuppression et induire la tolérance immunitaire. L'utilisation d'un anticorps déplétant sélectivement les lymphocytes T lors de leur activation pourrait constituer un réactif capable d'induire la survie à long terme de greffons allogéniques et le développement de mécanismes régulateurs. LAG-3 est une protéine exprimée spécifiquement sur les lymphocytes T et NK activés. Son rôle physiologique est complexe car elle intervient dans la maturation des cellules dendritiques et à la fois transmet un signal inhibiteur au lymphocyte T. Lors de ce travail de thèse, nous avons voulu explorer les effets immunomodulateurs d'anticorps anti-LAG-3. Dans une première étude nous avons établi la présence de cette molécule au niveau du greffon au moment du rejet dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat. L'administration d'un anticorps cytotoxique anti LAG-3 en traitement d'induction a engendré une déplétion des cellules T activés et une prolongation significative de survie du greffon (J32 contre J5 sans traitement). L'utilisation de cet anticorps a aussi permis de retarder le rejet avec une administration tardive (J4 post greffe). Cependant, nous avons aussi constaté que cet anticorps bloquait l'induction et le maintien d'un état de tolérance immunologique dépendant des Treg, confirmant ainsi le rôle immunorégulateur essentiel des Treg LAG-3 positifs. En parallèle à cette étude, nous avons développé un modèle pré clinique d'hypersensibilité cutanée retardée chez le primate et avons étudié l'effet d'anticorps anti LAG-3. Le traitement a fortement diminué la réponse érythémateuse et a bloqué l'infiltration par des cellules T au niveau de la zone d'injection. En conclusion, ces données indiquent le potentiel mais aussi les limitations de l'utilisation thérapeutique d'anticorps anti-LAG-3.

Mots clés : LAG-3 (CD233), transplantation, hypersensibilité retardée, déplétion.

LAG-3 POSITIVE LYMPHOCYTE IMPLICATION IN TRANSPLANTATION

Immunosuppressive treatments have significant secondary effects and only partially inhibit chronic rejection. Looking for new therapeutic approaches, including the induction of immune tolerance is therefore a research objective. The use of an antibody which selectively depletes T lymphocytes upon activation may be a reagent to induce long-term survival of allogenic grafts and to induce the development of regulatory mechanisms. LAG-3 protein is expressed on activated T lymphocytes and NK cells. Its physiological role is complex; it modifies the maturation of dendritic cells and simultaneously transmits an inhibitory signal to T cells. In this thesis, we wanted to explore the immunomodulatory effects of anti-LAG-3 antibodies. In a first study we established the presence of this molecule in the rejecting graft in a cardiac allograft model in rats. The administration of a cytotoxic anti LAG-3 antibody in induction treatment led activated T cells depletion and to a significant prolongation of graft survival (J32 vs. J5 without treatment). Anti-LAG-3 antibodies could also delay an active rejection process. However, we also found that this antibody blocked induction and maintenance of immunological tolerance dependent on Treg, confirming the essential immunoregulatory role of LAG-3 positive Tregs. In parallel to this study, we developed a delayed time hypersensitivity pre clinical model in primates where we studied the effect of antibodies against LAG-3. The treatment significantly decreased the erythematous response and blocked the infiltration by T cells in the challenged skin. In conclusion, these data indicate the potential but also the limitations of the therapeutic use of anti-LAG-3 antibodies.
.

Thomas Haudebourg
INSERM U643
30 Bvd Jean Monnet
44093 Nantes Cedex O1