

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DE MEDECINE

Ecole Doctorale : BIOLOGIE SANTE

Année 2012

N°attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**ETUDE DES MECANISMES DU REJET VASCULAIRE AIGU
A MEDIATION HUMORALE ET
APPLICATION D'IMMUNOINTERVENTION INNOVANTE DANS
UN MODELE PRE CLINIQUE CHEZ LE BABOUIN ET
EN XENOTRANSPLANTATION**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Xavier Tillou

Le 18 Décembre 2012, devant le jury ci-dessous

Président du Jury : Georges Karam, Professeur / Praticien Hospitalier, Nantes

Rapporteurs : Brigitte le Mauff, Professeur/ Praticien Hospitalier, Caen
Bruno Hurault de Ligny, Professeur/Praticien Hospitalier, Caen

Examineur : Jacques Petit, Professeur, Amiens

Directeur de thèse :
Gilles BLANCHO, Directeur de Recherche, Nantes

Sommaire

Liste des abréviations	6
Liste des tableaux	7
Liste des figures	8
Avant propos	11
Introduction	11
1 LE REJET D'ALLOGREFFE	13
1.1. LE REJET HYPER AIGU:.....	13
1.2. LE REJET AIGU:	14
1.3. LE REJET CHRONIQUE :.....	15
1.4. LE REJET VASCULAIRE AIGU :.....	16
1.4.1. <i>Physiopathologie</i> :.....	16
1.4.2. <i>Diagnostic histologique</i> :.....	18
1.4.3. <i>Données cliniques</i> :.....	18
1.5. LA REPOSE HUMORALE :.....	19
1.6. L'ALLOIMMUNISATION :.....	22
1.6.1. <i>Définition</i> :	22
1.6.2. <i>Modes diagnostiques</i> :.....	22
1.6.3. <i>Conséquences cliniques</i> :.....	23
1.6.4. <i>Les anticorps non anti-HLA</i> :.....	24
2. LE REJET EN XENOTRANSPLANTATION	25
2.1. HISTOIRE DE LA XENOTRANSPLANTATION:.....	25
2.2. LE REJET HYPER AIGU:.....	29
2.3. LES XENOANTIGENES :.....	32
2.4. LE REJET VASCULAIRE AIGU :	33
3. COMPLEMENT ET TRANSPLANTATION	36
3.1. L'ACTIVATION DU COMPLEMENT:	36
3.1.1. <i>La voie classique</i> :.....	36
3.1.2. <i>La voie alterne</i> :.....	37
3.1.3. <i>La voie des lectines</i> :.....	37
3.2. LES REGULATEURS NATURELS:.....	39
3.2.1. <i>Le C1 inhibiteur</i> :.....	39
3.2.2. <i>Les autres régulateurs</i> :.....	41
3.3. REPOSE CELLULAIRE ET COMPLEMENT :.....	42
3.4. INHIBITION DU COMPLEMENT EN TRANSPLANTATION :.....	43
3.4.1. <i>Chez le donneur</i> :.....	44
3.4.2. <i>Chez le receveur</i> :.....	45
3.4.3. <i>Le C1 inhibiteur en pratique clinique</i> :.....	46
4. LES INHIBITEURS DU PROTEASOME	48
4.1. MODE D'ACTION:.....	48
4.2. UTILISATION EN TRANSPLANTATION:	49
4.4.1. <i>Les modèles animaux</i> :	49
4.4.2. <i>Utilisation en transplantation chez l'homme</i> :	50

Résultats	52
1 PROJET 1	52
1.1. OBJECTIFS:	52
1.2. ARTICLE 1:	53
1.3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES :	62
1.3.1. <i>Appariement des animaux</i> :	62
1.3.2. <i>Pharmacocinétique du rhC1 inhibiteur chez le babouin</i> :	63
1.4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES :	65
2. PROJET 2	69
2.1. OBJECTIFS:	69
2.2. ARTICLE 2:	69
2.3. ARTICLE 3:	75
2.4. DONNES COMPLEMENTAIRES: PHARMACOCINETIQUE DU BORTEZOMIB.....	99
2.5. DISCUSSION ET PERSPECTIVES:	102

Conclusion	108
-------------------------	------------

Références	110
-------------------------	------------

Annexes	121
----------------------	------------

Annexe 1 : « Editorial comment » de l'article 1 par Peter Heeger

Annexe 2 : Autre publication et communications orales

Liste des abréviations

- **AAMR** : Acute Antibody Mediated Rejection
- **ADCC** : Antigen Dependant Cellular Cytotoxicity
- **AMXR** : Antibody Mediated Xeno Rejection
- **Ag** : Antigène
- **ATG** : Anti Thymo Globuline
- **AZA** : Azathioprine
- **BCR** : B Cell Receptor
- **CIVD** : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée
- **CMH** : Complexe d’Histocompatibilité Humaine
- **CPA** : Cellule Présentatrice d’Antigène
- **CR1** : Complement Receptor 1
- **CS** : Cortico Steroide
- **CsA** : Cyclosporine A
- **CyP** : Cyclophosphamide
- **CVF** : Cobra Venom Factor
- **DAF** : Decay Accelerating Factor (CD55)
- **DPBA** : Dipeptide Boronic Acid
- **DSA** : Donor Specific Antigen
- **DSG** : Deoxyspergualin
- **GT** : Galactosyl Transferase
- **HD** : Hanganutziu Deicher
- **HLA** : Human Leucocyte Antigen
- **HT** : H-Transferase
- **ICAM** : InterCellular Adhesion Molecule
- **IFN** : Interferon
- **IA** : Immuno Absorption
- **Ig** : Immunoglobuline
- **IL** : Interleukine
- **IVIG** : IntraVenous ImmunoGlobulin
- **KO** : Knock Out
- **PP** : Plasmaphérèse
- **PERV** : Porcin Endogenous Retro Virus
- **MASP** : MBL Associated Serin Protein
- **MBL** : Mannan Binding Lectin
- **MCP** : Membrane Cofactor Protein (CD46)
- **MIRL** : Membrane Inhibitor of Reactive Lysis (CD59)
- **MLR** : Mixed Lymphocyte Reaction
- **MMF** : Mycophenolate Mofetil
- **MTx** : Methotrexate
- **NeuGc** : N-Glycolylneuraminique
- **NK** : Natural Killer
- **PI3K** : Phosphatidylinositol-3 Kinase
- **Rapa** : Rapamycine
- **Rdx** : Radiothérapie
- **rhAT** : recombinant human Anti Thrombin
- **rhC1inh** : recombinant human C1 inhibitor
- **RVA** : Rejet Vasculaire Aigu
- **sCR1i** : soluble Complement Receptor 1 inhibitor
- **St** : Splénectomie
- **Tacro** : Tacrolimus
- **TCR** : T Cell receptor
- **TNF** : Tumor Necrosis Factor
- **VCAM** : Vascular Cell Adhesion Protein

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Résultats des premières xénotransplantations chez l'homme avec des organes de primates non humains.

Tableau 2a : Résultats des premières xénotransplantations porcines cardiaques chez le primate non Humain

Tableau 2b : Résultats des premières xénotransplantations porcines pulmonaires chez le primate non Humain

Tableau 2c : Résultats des premières xénotransplantations porcines hépatiques chez le primate non Humain

Tableau 2d : Résultats des premières xénotransplantations porcines rénales chez le primate non Humain

Tableau 3a : Résultats des xénotransplantations cardiaques avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Tableau 3b : Résultats des xénotransplantations pulmonaires avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Tableau 3c : Résultats des xénotransplantations rénales avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Tableau 3d : Résultats des xénotransplantations hépatiques avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Tableau 4 : Distribution réciproque de l'épitope Gal et des anticorps naturels anti Gal chez les mammifères

Tableau 5 : Résultats des xénotransplantations avec organes porcins Gal-KO chez le primate non humain

Tableau 6 : Etudes cliniques du traitement de l'AAMR par le Bortezomib en transplantation rénale

Liste des figures

Figure 1 : Survie des patients transplantés rénaux en fonction du taux d'anticorps anti HLA.
(Agence de Biomédecine)

Figure 2 : Rejet aigu d'allogreffe : initiation, amplification et mécanismes effecteurs.

Figure 3 : Représentation schématique de la physiopathologie du rejet vasculaire aigu.
(N Poirier)

Figure 4 : A : Représentation schématique de la réponse humorale primaire et secondaire dans le temps. **B :** Caractéristiques principales des réponses primaire et secondaire
(Abbas, Bases de l'Immunologie Fondamentale, 2005).

Figure 6 : L'activation du complément par la voie classique, alterne ou des lectines.
(Figure issue de Walport 2001).

Figure 7 : Mécanisme d'action du C1 inhibiteur (Editorial comment ; P Heeger)

Figure 8 : Diagramme exposant le niveau d'action des thérapies du rejet aigu à médiation humorale.

Figure 9 : Résultats des cultures mixtes lymphocytaires pour chaque choix Donneur-
Receveur.

Figure 10: Effet du Bortézomib sur les taux plasmatiques des lymphocytes T, B, NK, des monocytes et des plaquettes.

Figure 11: Effet du Bortézomib sur le taux de plasmocytes dans la moelle osseuse.

Notes

Avant propos



La greffe est une notion très ancienne dans la culture humaine. Le premier témoignage crédible remonte au premier millénaire avant Jésus Christ, en Inde, et décrit des autogreffes de peau pour la chirurgie reconstructrice du nez (Maharishi Shushrut). Le mot greffe (*graphium* en grec) tire son origine du poinçon



ou stylet utilisé pour écrire sur les tablettes de cire

dans l'antiquité. Cet instrument a été ensuite utilisé pour réaliser les boutures et les greffes végétales dont on retrouve des traces dans des manuscrits du moyen âge. La première évocation d'une greffe vascularisée, autrement dit transplantation, est un



miracle chrétien du XVIème siècle décrivant la greffe de la jambe d'un Maure à Justinien, Doge vénitien, par Saint Côme et Saint Damien. Le préalable à la réalisation d'une transplantation était la possibilité technique de réaliser une suture vasculaire. Jaboulay, chirurgien français du début du XXème, inspiré

par sa voisine couturière, a décrit le principe du surjet vasculaire et révolutionné la chirurgie moderne. Dans les années qui suivirent, les premiers pas en transplantation rénale chez l'homme ont été des xénotransplantations utilisant des reins de chèvre ou de porc. Les résultats encourageants ont permis le début de la grande aventure de la transplantation d'organe. Aujourd'hui la communauté des médecins et chercheurs impliqués en transplantation, est confrontée à plusieurs écueils dont la pénurie d'organes et des patients transplantés qui relèvent de plus en plus d'une deuxième voire parfois d'une troisième transplantation avec les problèmes d'immunisation que cela supposent.



Cette thèse, basée sur des travaux de recherches précliniques en allotransplantation et plus expérimentaux en xénotransplantation, a eu pour but de créer un modèle de rejet à médiation humorale en allotransplantation chez le primate et d'étudier de nouvelles stratégies thérapeutiques en transplantation. Suite à un chapitre consacré aux différents types de rejet, notamment le rejet vasculaire aigu, je présenterai les différentes étapes de la xénotransplantation qui ont conduit à privilégier le modèle porc-primare.

Introduction

La transplantation d'organes a connu un essor considérable à partir des années 80, avec la découverte de la Ciclosporine A (inhibiteur de la calcineurine), permettant ainsi l'amélioration et la prolongation de la vie des patients et des transplants (Rucker, Toledo-Pereyra et al. 1982). La greffe est avant tout un acte thérapeutique pour les patients atteints d'une défaillance irréversible au niveau d'un ou plusieurs organes. Les quelques 4945 greffes d'organes effectuées en 2011 en France (source : Agence de la Biomédecine), en sont la première traduction. Cependant, cet acte thérapeutique ne peut plus faire face aux réels besoins de la population; d'une part les prélèvements d'organes sont en nombre insuffisant, conduisant à un état permanent de pénurie d'organes, d'autre part la cohorte des patients transplantés est vieillissante, et de plus en plus de patients deviennent candidat à une seconde voire une troisième transplantation d'organe (Kawase, Tojimbara et al. 2008; Bohmig, Wahrmann et al. 2011). Ces patients immunisés par leur première greffe, sont beaucoup plus à risque de rejet aigu ou chronique et il a été montré que la survie des greffons est corrélée au taux d'anticorps anti donneur chez le receveur (figure 1). En effet les thérapeutiques actuelles des rejets aigus à médiation humorale, essentiellement les corticostéroïdes à haute dose associés ou non à des plasmaphérèses ou des immunoglobulines (Montgomery, Zachary et al. 2000; Shah, Nadasdy et al. 2004) et plus récemment les inhibiteurs du protéasome ou des anticorps monoclonaux (Fehr and Gaspert 2012; Waiser, Budde et al. 2012; Walsh, Alloway et al. 2012), ne préviennent pas efficacement la perte des transplants. Il incombe donc aux chercheurs et au corps médical d'améliorer les traitements immunosuppresseurs et d'innover vers de nouvelles stratégies plus spécifiques, ou encore idéalement d'évoluer vers un état de tolérance où le greffon ne serait pas rejeté malgré l'absence d'immunosuppression. En ce qui concerne la pénurie de greffons, la xénotransplantation a été perçue comme une source potentiellement inépuisable de greffons depuis les années 1990. Grâce aux recherches menées dans les domaines de l'immunologie, de la génétique et du clonage, les mécanismes de rejet en xénotransplantation ont été mieux compris comme le rappelle Ekser dans une récente revue (Ekser, Ezzelarab et al. 2012).

L'animal donneur choisi à l'issue d'une longue réflexion de la communauté scientifique est le porc. Les primates supérieurs (Chimpanzés, Gorille, Orang Outang, Babouin, Macaque) n'ont pas été retenus pour des raisons éthiques et de risque de transmission de rétrovirus vers l'homme (Mattiuzzo, Takeuchi et al. 2012). Toutefois la barrière d'espèce entre l'homme et le porc se traduit par des réponses immunitaires plus complexes et plus intenses conduisant à des

rejets rapides et violents, appelés rejets hyper aigus.

En effet les humains possèdent des Ac préformés dirigés contre les antigènes (Gal α (1,3) Gal par exemple) présentés par l'ensemble des mammifères non primates. L'importance de ce rejet est amplifiée par l'incapacité des molécules porcines, régulatrices du complément (CD55 et CD59) à bloquer l'activation du complément primate. L'obstacle du rejet hyperaigu fut surmonté dans les années 1995-2000 par diverses techniques de déplétion des anticorps préformés (plasmaphérèse, immunoadsorption), ou par transgénèse de porc exprimant des molécules humaines régulatrices du complément. La transplantation de ces organes transgéniques à des primates, associé à de lourds protocoles d'immunosuppression, a permis d'obtenir des survies jusqu'à 2 mois. Néanmoins, l'obstacle du rejet hyperaigu franchi, un autre écueil se présenta. En effet après quelques jours ou semaines, il se développait secondairement un autre type de rejet appelé rejet vasculaire aigu. La barrière d'espèce semblait alors difficile à surmonter. L'obtention dans les années 2000, de porc Gal Knock Out (KO) (n'exprimant pas l'antigène Gal), relança l'intérêt pour la xénotransplantation. Les survies obtenues furent globalement meilleures mais il persistait toujours une atteinte des greffons à type de microangiopathie thrombotique conduisant à l'échec de la greffe. Les causes précises de cette atteinte microvasculaire sont probablement multifactoriels, immunologiques (activation endothéliale générant un état procoagulant), et non immunologiques (incompatibilité moléculaire d'espèce pour les mécanismes de régulation de l'hémostase).

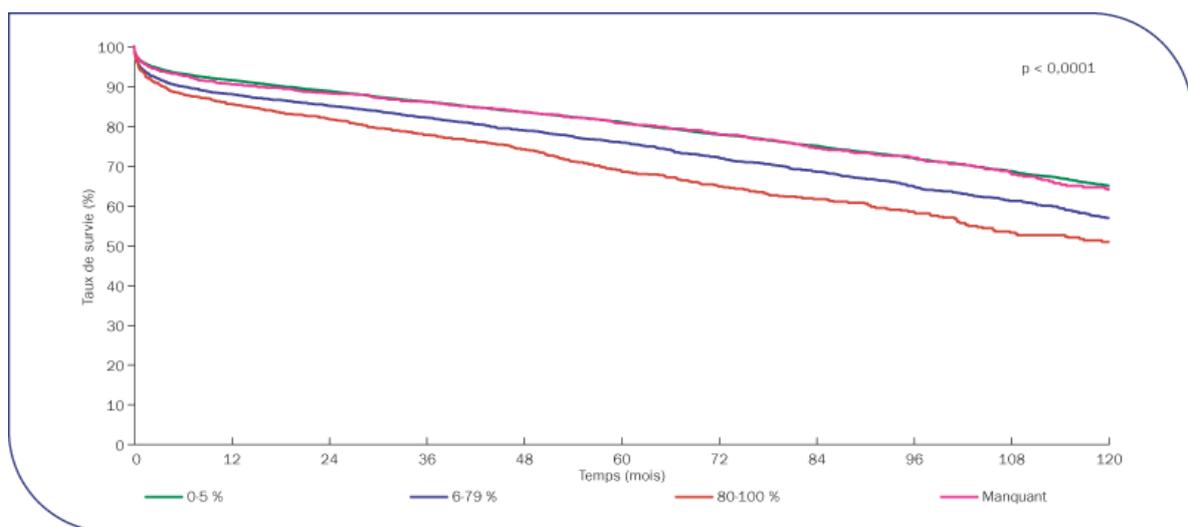


Figure 1 : Survie des patients transplantés rénaux en fonction du taux d'anticorps anti HLA.
(Agence de Biomédecine)

1 Le rejet d'allogreffe

La transplantation de cellules, de tissus ou d'organes entre individus de la même espèce mais génétiquement différents (allotransplantation), active le système immunitaire au point de rejeter le transplant. Le rejet de greffe est un processus complexe, incluant de nombreux facteurs, tels que la nature du tissu transplanté, le site de transplantation, l'état immunologique du patient ainsi que la disparité génétique entre le donneur et le receveur. Les termes de rejet hyper aigu, rejet aigu, et rejet chronique décrivent et identifient différents aspects de l'activation du système immunitaire aboutissant au rejet du transplant. Avant même l'intervention du système immunitaire reconnaissant la greffe comme ne faisant pas partie du « soi », le greffon peut montrer des signes de souffrance. Ainsi, la préparation du greffon, son transport, la préparation du receveur, l'ischémie/reperfusion sont autant d'agressions non immunologiques qui peuvent l'endommager. Malgré tous les soins apportés à la préparation du greffon et du receveur, ces actes chirurgicaux restent associés à des réponses inflammatoires précoces et non spécifiques.

1.1. Le rejet hyper aigu:

En allotransplantation, le terme d'hyperimmunisé se réfère à des individus ayant des niveaux détectables d'anticorps dirigés contre des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II (HLA chez l'homme) ou contre des antigènes (Ag) du système sanguin ABO. Ces anticorps ont généralement été induits par une précédente greffe, des transfusions sanguines, une ou des (Valero, Cabrer et al.) immunisation(s) foeto-maternelle(s) (Huber, Lachmann et al. 2012). Lors de la revascularisation du greffon, ces anticorps, s'ils reconnaissent leur cible sur l'endothélium induisent son activation. Celle-ci se traduit par l'acquisition rapide d'un phénotype pro-coagulant conduisant à une thrombose des vaisseaux. Par ailleurs, ces anticorps préformés activent également la voie classique du complément (Wahrman, Exner et al. 2006) qui va agresser l'endothélium par des phénomènes de cytotoxicité conduit par le complexe d'attaque membranaire (C5b-9) et de désorganisation du cytosquelette. Ces mécanismes aboutissent à la perte rapide de la greffe (quelques minutes à quelques heures après la revascularisation). En transplantation humaine, l'analyse systématique de la présence de ces anticorps avant la greffe (test de cross-match), et

la recherche de compatibilités HLA entre le donneur et le receveur, a permis de prévenir ce type de rejet qui est devenu extrêmement rare.

1.2. Le rejet aigu:

Hormis le rejet hyper aigu, devenu exceptionnel, le rejet aigu est, chronologiquement, le premier type de rejet auquel est soumise une allogreffe (Ponticelli 2012). En l'absence de traitement, il survient en moyenne dans la semaine qui suit la transplantation. Les lymphocytes alloréactifs sont activés dans les organes lymphoïdes secondaires drainant le site de la greffe, soit par une présentation dite « directe » via les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du donneur, soit par une voie dite « indirecte » de présentation. Les lymphocytes T CD4⁺ activés de type Th1 synthétisent des cytokines proinflammatoires (interféron- γ et TNF- α) attirant des macrophages dans le greffon. A leur tour, ces macrophages vont synthétiser du TNF- α , de l'IL-1 et diverses molécules du stress telles que le monoxyde d'azote (NO) ou des radicaux libres activant la cellule endothéliale. Ces facteurs altèrent directement le fonctionnement physiologique de la greffe, notamment le tonus et l'intégrité vasculaire. La barrière endothéliale devient perméable et laisse des lymphocytes T cytotoxiques infiltrer et agresser le greffon par un contact direct (Figure 2).

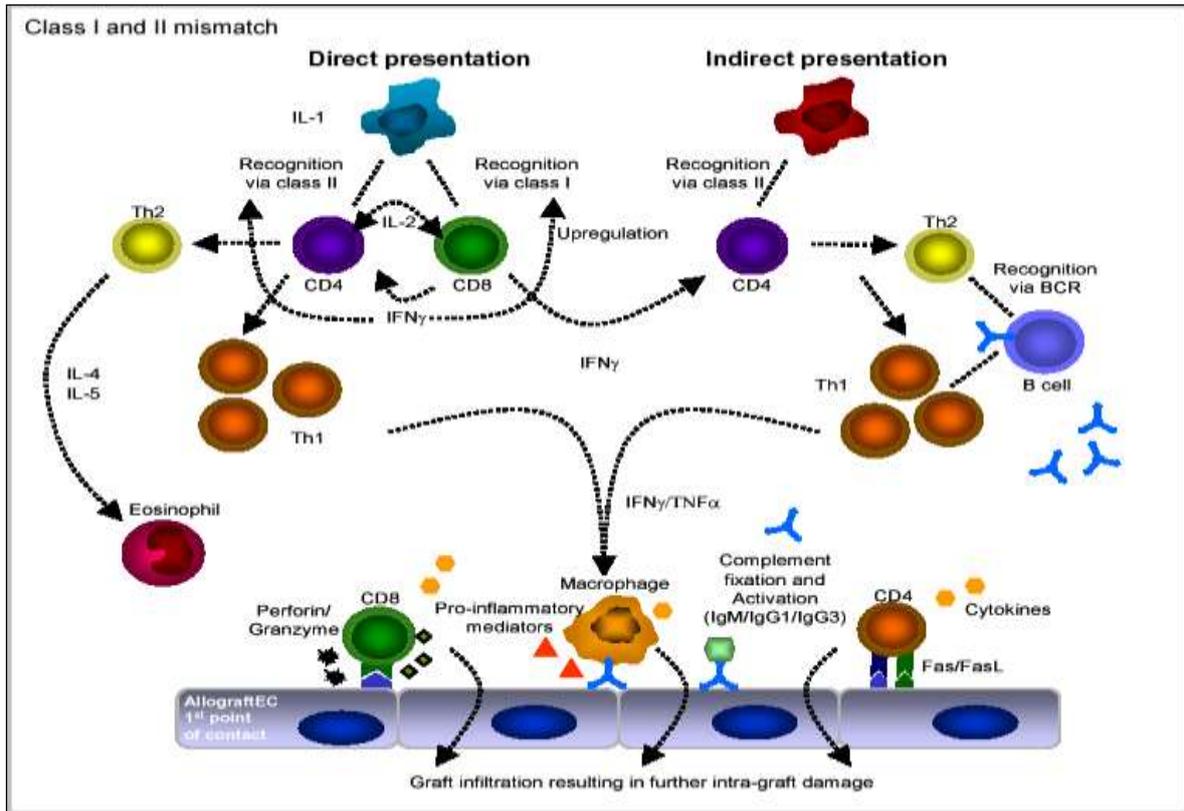


Figure 2 : Rejet aigu d'allogreffe : initiation, amplification et mécanismes effecteurs.

Le rejet aigu est le plus fréquemment un rejet cellulaire, contre lequel les traitements actuels ciblant les lymphocytes T sont très efficaces au point d'en avoir considérablement réduit l'incidence (Hall 1991).

1.3. Le rejet chronique :

Le rejet chronique survient plus tardivement après la transplantation. Ses causes sont multiples, notamment d'ordre immunologique par des phénomènes de présentations indirectes et des facteurs non immunologiques tels que l'ischémie, la toxicité médicamenteuse, l'hypertension artérielle ou les infections. Il est caractérisé par des atteintes vasculaires évolutives avec diminution progressive de la lumière des vaisseaux par un épaississement de leur paroi suite à une prolifération des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, le greffon est le siège de fibrose interstitielle. Aucune thérapie actuellement ne prévient parfaitement son développement. Lorsque ce rejet chronique se déclenche, il est irréversible et aboutit à la perte du greffon à moyen terme. Le rôle des anticorps est de plus en plus considéré. Des données cliniques et expérimentales ont montré une corrélation entre l'apparition d'alloanticorps et le

développement de rejet chronique. Cependant, d'autres études ont montré que le rejet chronique peut survenir aussi en l'absence d'alloanticorps (Nankivell, Borrows et al. 2003; Pascual, Perez-Saez et al. 2012).

1.4. Le Rejet Vasculaire Aigu :

1.4.1. Physiopathologie :

Le rejet vasculaire aigu (Mohiuddin, Corcoran et al.) est un rejet rapide du greffon, qui survient sans traitement 3 ou 4 jours après la revascularisation, et après quelques semaines à quelques mois en pratique clinique. Il associe dans la plupart des cas, la présence d'anticorps cytotoxiques (principalement des IgG) dirigés contre des Ag du donneur, et des lésions tissulaires particulières : atteintes de la microvascularisation avec les lésions de capillarite ou d'endothélite conduisant globalement à une souffrance des greffons évoluant vers des phénomènes de microthromboses et d'ischémie. Chez l'homme, ces alloanticorps sont très souvent des anticorps cytotoxiques dirigés contre des molécules du CMH de classe I ou moins fréquemment de classe II (30% des RVA). Enfin, des antigènes autres que le CMH (Ag ABO, Ag mineurs ou Ag spécifiques de tissus) ont également été mis en évidence, mais de façon plus anecdotique (Shimizu, Tanabe et al. 2012).

La fixation des anticorps sur les cellules endothéliales active la voie classique du complément (Figure 3), jusqu'à la formation du complexe d'attaque membranaire : le C5b-9 (Wahrmann, Exner et al. 2006; Murata and Baldwin 2009). Il s'agit probablement de la cause principale des RVA. Il a également été montré que ces alloanticorps facilitent l'opsonisation des cibles pour les macrophages et les cellules natural killer (NK), qui grâce à leurs récepteurs de fragments Fc d'immunoglobulines, peuvent fixer et lyser les cellules endothéliales. Ce phénomène est appelé cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

L'endothélium joue également un rôle important dans cette physiopathologie. Son activation notamment par des cytokines telles que IL-1 et IFN- γ , induit l'expression de molécules d'adhésion (E-sélectine, ICAM), du facteur tissulaire et de l'inhibiteur de l'activité du plasminogène, entraînant un état pro-coagulant et pro-inflammatoire de la cellule endothéliale. De plus, l'ischémie-reperfusion induit une stimulation des plaquettes, ainsi qu'une activation du complément (comme les anticorps) par la voie classique ou alterne (Figure 3) conduisant aussi à l'activation de ces cellules endothéliales. Les cellules NK

peuvent rompre l'intégrité de cet endothélium et aussi l'activer. Enfin, les alloanticorps seuls pourraient délivrer un signal activateur via les intégrines des cellules endothéliales.

D'autres mécanismes pathogéniques impliquent l'apoptose de la cellule endothéliale. Cette apoptose peut être induite par l'ischémie, des cytokines, ou des cellules inflammatoires et causer ainsi la libération de cellules endothéliales de leur matrice dans la circulation (éléments inflammatoires dans le sang). L'apoptose prive également l'endothélium de ses fonctions normales comme l'inhibition de la coagulation et de l'inflammation (Mannam, Lewis et al. 2012).

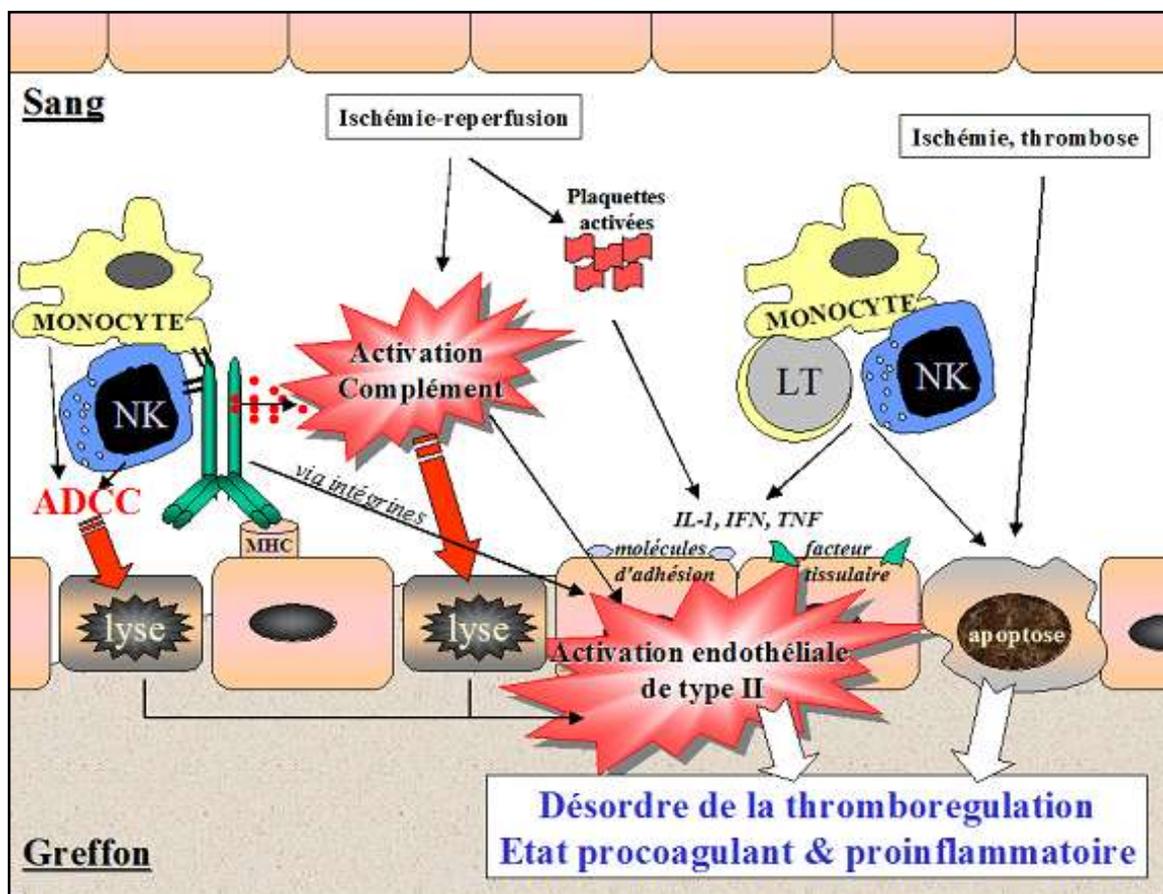


Figure 3 : Représentation schématique de la physiopathologie du rejet vasculaire aigu.

(N Poirier)

1.4.2. Diagnostic histologique :

On retrouve le plus souvent des lésions hémorragiques, des thromboses intravasculaires, des atteintes endothéliales à type d'endothélite avec une infiltration sous endothéliale d'éléments lymphocytaires activés, un infiltrat cellulaire constitué de macrophages activés et de polynucléaires neutrophiles, des lésions de nécrose avec œdème et lyse de la membrane cellulaire (von Willebrand, Salmela et al. 1992; Ntokou, Iniotaki et al. 2011). Contrairement au rejet aigu cellulaire où l'on retrouve un infiltrat cellulaire massif dans le parenchyme, dans le cas du RVA, l'infiltrat cellulaire se limite le plus souvent à la périphérie des vaisseaux (capillaires glomérulaires et péri-tubulaires). Au niveau immuno-histologique, la médiation humorale de ces rejets se révèle notamment par la présence d'immunoglobulines (IgG, IgM) mais aussi de facteurs de dégradation du complément, tels que C3c et le C4d, au sein des greffons. En clinique, le C5b-9 est peu recherché pour le moment car il est rarement positif du fait de sa rapide élimination au cours de la réaction d'activation du complément.

1.4.3. Données cliniques :

Actuellement, l'incidence du rejet aigu à médiation cellulaire T (rejet aigu cellulaire) se situe autour de 7 à 10%, et celui-ci est habituellement parfaitement réversible sous diverses interventions immunosuppressives (corticostéroïdes à fortes doses, sérum anti-lymphocytaire, anticorps anti-CD3). Il n'en est pas de même du rejet vasculaire aigu à médiation humorale, dont l'incidence demeure constante (20 à 30% des cas de rejets aigus) avec une réversibilité obtenue dans seulement 50% des cas dans la plupart des centres. Parmi toutes les stratégies, il est possible d'extraire les anticorps circulants par des plasmaphèreses ou immunoadsorptions avec un contrôle renforcé de leur production (Tacrolimus, Mycophenolate mofetil, et/ou IVIG) pour traiter les RVA sévères et « réfractaires » aux stéroïdes et thérapies anti-lymphocytaires (Fehr and Gaspert 2012). La déplétion des cellules B par l'anti-CD20 mAb (Becker, Becker et al. 2004) semble être également une option croissante puisqu'elle permet de « dépleter » les lymphocytes B mais aussi d'empêcher la présentation de l'antigène par les lymphocytes B aux lymphocytes T. La plasmaphérèse et/ou l'IVIG (pool d'anticorps permettant de bloquer le complément en le fixant, de moduler les alloanticorps et d'en faire chuter leur titre, d'induire l'apoptose des lymphocytes B) peuvent être également utilisés pour

« désensibiliser » un patient (Montgomery, Zachary et al. 2000). Certains auteurs ont également décrit la splénectomie en urgence comme thérapie de recours en cas de rejet réfractaire (Locke, Zachary et al. 2007). Malgré les thérapeutiques immunosuppressives conventionnelles en cas de rejet aigu humoral, le taux de survie des greffes à 1 an n'est que de 15 à 50% même en tenant compte des inobservances thérapeutiques (Sellares, de Freitas et al. 2012). Il est alors devenu crucial d'innover en terme de thérapie contre ce rejet médié par les anticorps; d'autant plus que ces alloanticorps semblent également être impliqués dans le rejet chronique et ne se limitent pas qu'aux patients pré-sensibilisés.

1.5. La réponse humorale :

Le lymphocyte B est la cellule pivot de l'immunité humorale spécifique. Elle accomplit cette fonction par l'intermédiaire du récepteur spécifique pour l'antigène qu'elle exprime à sa membrane, l'immunoglobuline de surface (Mohacsi, Rieben et al.). Un lymphocyte B n'exprime qu'une seule spécificité antigénique (un site anticorps unique) qui reste la même sur des isotypes différents. Le stade ultime de l'activation du lymphocyte B par son antigène spécifique le fait différencier en plasmocyte dont la seule fonction est de sécréter un anticorps porteur du même paratope que l'sIg (Ig de surface) du lymphocyte B primordial. La lymphopoïèse B se déroule chez l'homme dans la moelle osseuse. La cellule souche du lymphocyte B, qui n'exprime aucun marqueur membranaire B et a les gènes des immunoglobulines en configuration germinale, va subir au contact des cellules stromales, plusieurs étapes de différenciation régulées par des contacts cellulaires et des cytokines. Chacune de ces étapes est marquée par un réarrangement des gènes des immunoglobulines qui se fait avec un certain hasard, en absence de tout contact avec l'antigène. Le produit de chaque réarrangement est exprimé à la surface de la cellule et, quand il est fonctionnel, permet de passer à l'étape suivante. La chronologie rigoureuse des réarrangements explique aussi l'exclusion allélique. On distingue ainsi quatre stades : lymphocyte proB précoce, proB tardif, préB et B immature. Cette différenciation peut également être suivie par la disparition et/ou l'apparition de marqueurs membranaires dont certains (CD19, CD20) sont spécifiques de la lignée B. L'acquisition d'une sIg fonctionnelle par cette mécanique recombinatoire se fait au prix d'une énorme délétion de précurseurs B par apoptose. Elle permet l'acquisition du répertoire B et la tolérance centrale du soi.

Après avoir lié son antigène spécifique et pour remplir ses deux fonctions de transduction et d'internalisation du signal, la sIg doit être associée à la membrane du lymphocyte à d'autres molécules et former le BCR (B cell receptor). Ce sont les molécules CD79 α (Ig α) et β (Ig β). Les molécules CD22 et CD32 régulent négativement le signal alors que le complexe CD19/CD21/TAPA-1 le régule positivement. Les voies de signalisation intracellulaire font intervenir différentes protéine-kinases qui se lient sur des motifs spécifiques des récepteurs.

En périphérie le lymphocyte B mature, naïf, va rencontrer son antigène spécifique dans le ganglion lymphatique au sein du follicule lymphoïde. Sa maturation finale nécessite la présence de cellules folliculaires dendritiques qui lui présentent l'antigène. Pour la majorité des antigènes, il nécessite aussi la collaboration d'une sous population particulière de lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ dits Th2. Ces derniers interagissent avec les lymphocytes B qui leur présentent l'Ag par leurs molécules de CMH de classe II. Cette différenciation a lieu dans le centre clair germinatif du follicule secondaire : par un mécanisme d'hypermutation somatique, les centroblastes de la zone sombre augmentent la diversité et l'affinité de leurs sIg que leurs descendants (centrocytes) sélectionnent au contact de l'antigène dans la zone claire du centre germinatif, avant de donner naissance soit à des plasmocytes sécréteurs d'anticorps, soit à des lymphocytes B de type mémoire.

Lors d'une première rencontre avec un antigène donné (réponse primaire), ou lors de la réintroduction du même antigène (réponse secondaire) la réponse diffère par son délai d'apparition, sa rapidité et son intensité, l'affinité et la classe des anticorps. La réponse anticorps secondaire apparaît après une phase de latence plus courte, atteint un plateau de niveau plus élevé avec des anticorps d'affinité plus forte et de nature IgG principalement, alors qu'ils sont de classe IgM pour la réponse primaire (Figure 4). Ainsi, les anticorps qui sont les médiateurs de l'immunité humorale, remplissent leur rôle de défense grâce à trois modes d'actions : la neutralisation des micro-organismes et de leurs toxines, l'opsonisation facilitant l'ingestion par les cellules phagocytaires, et l'activation du complément (pour les IgM et IgG) conduisant à l'opsonisation et parfois la lyse des cellules ciblées.

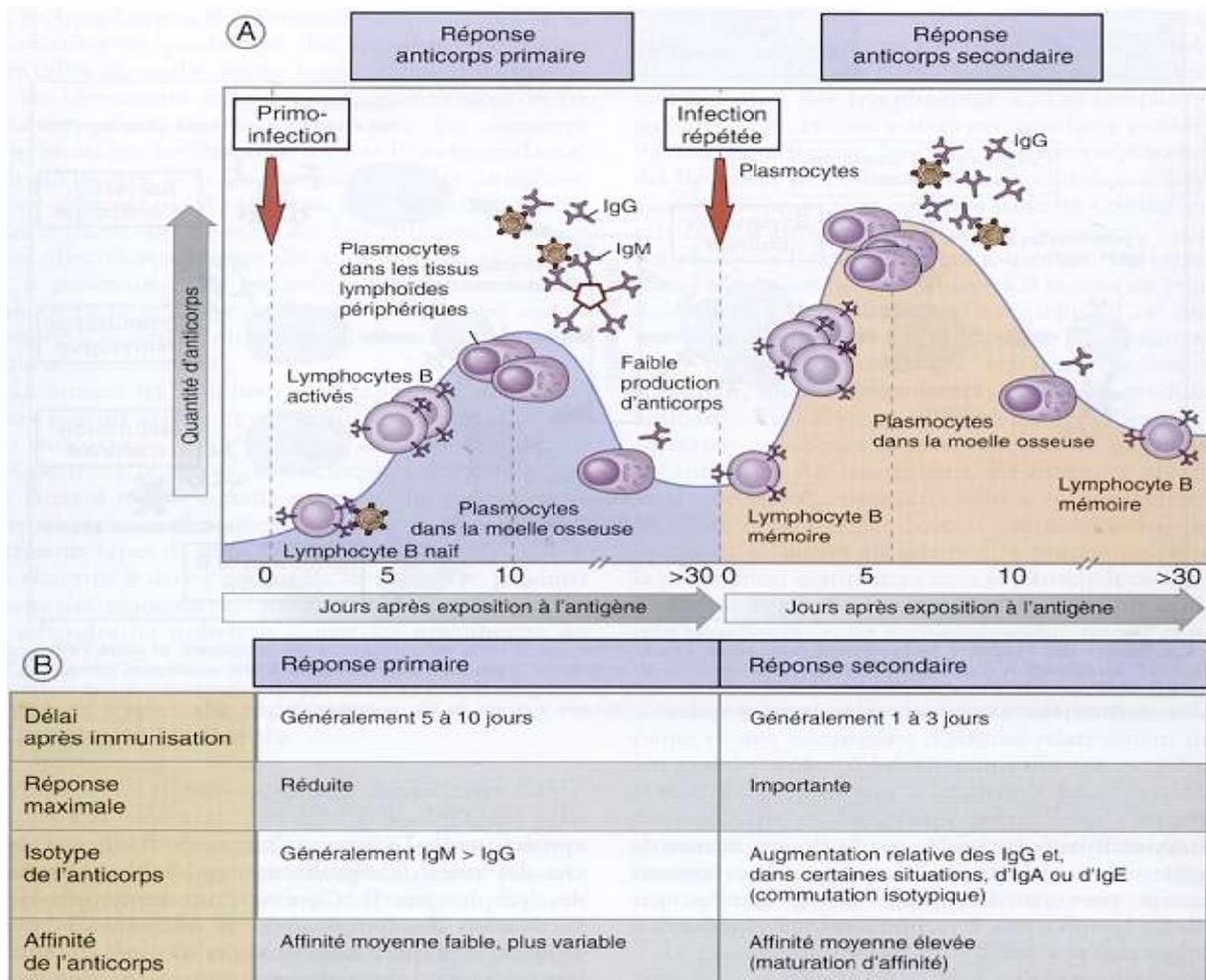


Figure 4 : **A :** Représentation schématique de la réponse humorale primaire et secondaire dans le temps. **B :** Caractéristiques principales des réponses primaire et secondaire (Abbas, Bases de l'Immunologie Fondamentale, 2005).

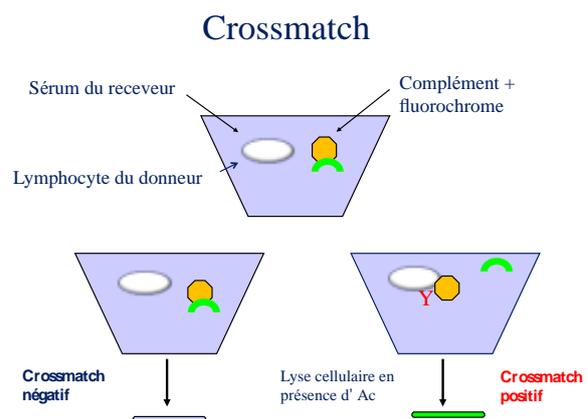
1.6. L'alloimmunisation :

1.6.1 Définition

L'alloimmunisation est définie par la présence chez le receveur d'anticorps dirigés contre des antigènes du donneur. Les événements immunisants peuvent être une grossesse, une transfusion sanguine ou une transplantation d'organe ou de tissus. Contrairement à l'immunisation ABO, l'immunisation naturelle contre les Ag HLA est très rare et touche moins de 1% de la population. Après trois grossesses environ 50% des femmes développent des Ac anti-HLA. Cette immunisation n'est pas stable dans le temps, elle peut devenir indétectable et être stimulée avec une nouvelle exposition antigénique (Rebibou, Chabod et al. 2002). En transplantation rénale, l'alloimmunisation est principalement dirigée contre les antigènes HLA et demeure un problème essentiel. La cohorte des patients transplantés vieillit et certains receveurs relèvent ou vont relever d'une deuxième voir d'une troisième transplantation. L'histoire de la transplantation rénale ne peut être contée sans parler de l'introduction dans les années 60 des techniques de cross match par Terasaki (Terasaki and McClelland 1964) et de ses évolutions scientifiques et techniques.

1.6.2 Modes diagnostiques

La technique initialement décrite est une lymphocytotoxicité (LCT) dépendante du complément. Elle consiste à incuber les lymphocytes du donneur avec le sérum du receveur. L'analyse de la mortalité cellulaire après ajout de complément, est faite grâce à un colorant. Cette technique est appelée cross-match. Dans chaque plaque d'analyse, sont inclus un contrôle négatif ne contenant pas d'Ac anti HLA et un contrôle positif constitué d'un mélange de sérums provenant de patients très immunisés. Un sérum est considéré comme positif lorsque la mortalité cellulaire est supérieure à 20% comparée à celle du témoin négatif. Cette technique ne détecte que les anticorps cytotoxiques fixant le complément. Le traitement du sérum par un agent réducteur, le dithiothreitol, qui provoque la rupture des ponts disulfures des IgM, permet de déterminer



l'isotype IgG ou IgM des anticorps. Ce test peut être réalisé sur les lymphocytes T et B, les lymphocytes T étant porteur uniquement d'Ag HLA de classe I, alors que les lymphocytes B portent les deux types d'antigènes HLA I et II. Il faut différencier cross match et recherche d'anticorps anti-HLA. Lors d'un cross match, un seul sérum est testé avec un seul type cellulaire, celui du donneur potentiel. Pour la recherche d'anticorps anti-HLA, le sérum du receveur est testé contre les lymphocytes d'un panel pouvant atteindre 60 types cellulaires différents, choisis pour représenter le maximum d'Ag HLA présents dans la population. Les anticorps ne fixant pas le complément peuvent être détectés en ajoutant une immunoglobuline de chèvre dirigée contre le Fc des Ig humaines qui crée des interactions entre les anticorps de faible titre. Des techniques plus sensibles permettent désormais d'étudier plus finement l'alloimmunisation d'un receveur.

La technique de cytométrie de flux est plus sensible que le crossmatch. (Talbot, Givan et al. 1988) et permet des détections à des dilutions plus faibles (environ 3 fois). Les Ac fixés à la surface des lymphocytes sont révélés par un Ac couplé à un cytochrome. Grâce à un double marquage CD3 et CD19 il est possible de déterminer à quelle population lymphocytaire (T ou B) appartient l'Ag détecté. La dernière génération de cytométrie de flux n'utilise plus la technique du crossmatch mais utilise des plaques contenant des microbilles liées à des Ag HLA spécifiques (Dosage en phase solide). Le taux d'anticorps dirigés contre un type HLA est donc exprimé en Intensité Moyenne de Fluorescence ou IMF). La détection des Ac anti HLA appelés DSA (Donor Specific Antibody), est donc de plus en plus précise.

Cette technique rentre en compétition avec une technique d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) utilisant des puits où sont fixés des Ag HLA purifiés. Son utilisation est simple et peu coûteuse, mais n'est pas utilisable pour les crossmatch prétransplantations (Caro-Oleas, Gonzalez-Escribano et al. 2012).

1.6.3 Conséquences cliniques

L'alloimmunisation n'est pas stable dans le temps et les anticorps anti-HLA peuvent devenir indétectables. S'y rajoute des méthodes de détection qui deviennent de plus en plus précises. La recherche de DSA en cytométrie de flux peut être positive chez un receveur alors que le crossmatch prétransplantation était négatif (Lefaucheur, Suberbielle-Boissel et al. 2009). Les données qui résultent de tests ayant des sensibilités différentes deviennent très difficiles à interpréter. Toutefois il est universellement admis qu'un crossmatch positif en lymphocytotoxicité dirigée contre les lymphocytes T avec le sérum du jour du receveur

contre-indique formellement la transplantation. Un crossmatch historique positif avec un crossmatch du jour négatif ne contre-indique pas la transplantation. Concernant les crossmatch positifs en lymphocyte B, la question reste débattue. Toutefois Le Bas-Bernardet a montré que les anticorps impliqués ne sont pas des anticorps anti-HLA et que la survie des greffons n'est pas altérée à long terme (Le Bas-Bernardet, Hourmant et al. 2003).

La réalisation de crossmatch en cytométrie de flux en pratique courante soulève également d'important problème d'interprétation et de décision. Les études de la discordance entre crossmatch en LCT négatif et positif en cytométrie n'ont pas les mêmes résultats. Certains démontrent une augmentation du nombre de rejet aigu (Karpinski, Rush et al. 2001) et d'autres l'absence d'impact (Christiaans, Overhof et al. 1996). Le PRA exprimé en pourcentage est basé sur le nombre de cellules donnant des réactions positives (indépendamment de la spécificité).

La solution semble d'interdire les Ag HLA contre lesquels des Ac ont été détectés par des méthodes sensibilisées avant d'envisager l'attribution d'un greffon à un receveur.

Utilisées lors de la surveillance régulière de l'alloimmunisation d'un receveur, les techniques d'ELISA ou Luminex ne sont pas utilisables dans le contexte de « l'urgence » d'une transplantation. La technique de LCT complément dépendant reste donc la technique de référence pour le cross match le jour de la transplantation.

1.6.4 Les anticorps non anti-HLA

La présence, dans les sérums de prétransplantation, d'anticorps ne réagissant pas avec les lymphocytes a été rapportée en transplantation rénale (Cerilli, Brasile et al. 1981). Ces antigènes semblent liés à l'endothélium vasculaire. Ces anticorps ont été suspectés d'être responsable de certains rejets aigus. Toutefois les études restent très contradictoires (Evans, Trickett et al. 1988; Sumitran-Karuppan, Tyden et al. 1997). Dans une revue, Tait rappelle que les premiers anticorps non anti-HLA devant être recherché, sont les anticorps anti cellules endothéliales qui ont montré la capacité d'activer l'endothélium, d'induire l'apoptose ou de léser les cellules endothéliales. Toutefois l'obstacle semble être le manque de méthode standardisée pour la recherche de ces anticorps (Tait, Susal et al. 2012).

2. Le rejet en xénotransplantation

2.1 Histoire de la xénotransplantation

La xénotransplantation est une idée ancienne. Les premières publications médicales remontent à 1906, par Jaboulay (Jaboulay 1906) qui décrit deux tentatives de greffe de rein, de porc puis de chèvre, chez deux jeunes femmes atteintes d'insuffisance rénale terminale. Un peu avant, Alexis Carel rapporta ses travaux de greffes vascularisées de reins humains au cou de chiens avec obtention d'une diurèse pendant une brève période post opératoire (Carrel and Guthrie 1905). L'aventure de l'allotransplantation rénale débuta en 1952 avec l'histoire de Marius Renard (jeune ouvrier picard), qui reçut un rein de sa mère. Parallèlement les premières xénotransplantation chez l'homme débutèrent en 1964, par l'équipe de Reemtsma (Reemtsma, McCracken et al. 1964) qui tenta la transplantation de rein de chimpanzé avec une survie extraordinaire de 9 mois pour un des patients qui décéda des complications de l'immunosuppression. Les premières expériences de xénotransplantation furent essentiellement centrées sur le primate du fait de sa proximité avec l'homme (Hardy 1964; Hitchcock, Kiser et al. 1964; Starzl, Marchioro et al. 1964; Barnard, Wolpowitz et al. 1977; Bailey, Nehlsen-Cannarella et al. 1985; Starzl, Fung et al. 1993). Toutefois, l'amélioration des techniques réanimatoires et anesthésiques, permettant d'accroître le nombre de patients en mort encéphalique, mit fin à cette première épopée de la xénotransplantation en mettant à disposition un nombre suffisant d'organes allogéniques.

Année	Auteurs	Animal donneur	Organe greffé	Survie obtenue
1964	Reemtsma	Chimpanzé	Rein	9 mois
1964	Hitchcock	Babouin	Rein	4 jours
1964	Starzl	Babouin	Rein	2 mois
1964	Hardy	Chimpanzé	Cœur	
1969	Starzl	Chimpanzé	Foie	14 jours
1977	Barnard	Babouin	Cœur	
1977	Barnard	Chimpanzé	Cœur	4 jours
1985	Bailey	Babouin	Cœur	4 semaines
1992	Starzl	Babouin	Foie	14 jours

Tableau 1 : Résultats des premières xénotransplantations chez l'homme avec des organes de primates non humains.

A partir de 1984, la réalisation de nouvelles xéno greffes primates-humains, permit de finaliser le débat éthique concernant l'utilisation des primates à des fins exclusivement médicales humaines, avec en outre la prise de conscience des risques de transmissions virales notamment de rétrovirus. Le Biological Response Modifiers Advisory Committee de la Food and Drug Administration Américaine a recommandé dans un rapport de 2000 (2000), l'exclusion des primates comme donneurs potentiels d'organes, soulevant la possible transmission de rétrovirus simiens pouvant s'intégrer au génome humain et se transmettre au travers des générations. Le porc fut alors considéré comme la meilleure source d'organes, et devant l'apparition d'une pénurie de greffons rénaux secondaire à la généralisation de la dialyse et à l'amélioration des résultats de la greffe rénale, l'intérêt pour la xénotransplantation resurgit à l'avènement des techniques de génie génétique. Le porc présente en effet l'avantage d'avoir des caractéristiques morphologiques, anatomiques et physiologiques se rapprochant de l'humain. De plus la perspective d'élevage à grande échelle des porcs pour un usage médical est moins sujette à controverses. Le recours aux primates a été conservé comme modèle pré clinique de la xénotransplantation, les singes servant de receveurs aux transplants porcins (Tableau 2a, 2b, 2c, 2d).

(Lexer, Cooper et al. 1986; Cooper, Human et al. 1988; Fischel, Bolman et al. 1990; Johnson, Fischel et al. 1992; Roslin, Zisbrod et al. 1992; Leventhal, Dalmasso et al. 1993; Brewer, Del Rio et al. 1994; Kawauchi, Takeda et al. 1994; Pruitt, Kirk et al. 1994; Ye, Neethling et al. 1994; Kaplon, Michler et al. 1995; Magee, Collins et al. 1995; Davis, Pruitt et al. 1996; Fukushima, Gundry et al. 1996; Kobayashi, Taniguchi et al. 1996; Michler, Xu et al. 1996; Pruitt, Bollinger et al. 1996; Davis, Jakobs et al. 1997; Minanov, Itescu et al. 1997; Pruitt, Bollinger et al. 1997; Waterworth, Cozzi et al. 1997; Itescu, Kwiatkowski et al. 1998; Zaidi, Schmoeckel et al. 1998; Salerno, Kulick et al. 2002) (Kaplon, Platt et al. 1995; Blum, Collins et al. 1998; Daggett, Yeatman et al. 1998; Yeatman, Daggett et al. 1999). (Calne, White et al. 1968; Calne, Davis et al. 1970; Luo, Kosanke et al. 1998). (Besse, Duck et al. 1994; Leventhal, John et al. 1995; Sablinski, Gianello et al. 1997; Loss, Kunz et al. 2000; Hecker, Lorenz et al. 2002).

Noms de code des molécules utilisées dans les traitements expérimentaux ci dessous :

- *FUT175 : 6-amidino 2-naphtyl p-guanidinobenzoate : protéase inhibiteur du complément*
- *K76COOH : monocarboxylic acid: inhibiteur de l'activation de C5*
- *CAB-2 : Complement Activation Blocker (dérivé de DAF)*
- *GAS 914 : Analogue de alpha Gal*
- *LF15-0195 : Analogue de la deoxyspergualine*

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie
1986	Lexer	Babouin	Aucun	30 à 190 min
1988	Cooper	Babouin	Aucun St IA+CsA+CS	<8h <8h 2h à 5 jours
1992	Fishel/ Johnson	Macaque	Aucun PP IA IA+IG+CsA+AZA+CS PP+IG+CsA+AZA+CS PP+St+IG+CsA+AZA+CS	2h <12h <80h 120h 190h 1 à 8 jours
1992	Roslin	Babouin	IA+Rdx+CsA+CS	6 à 15 jours
1993	Leventhal	Babouin	Aucun PP+St+DSG CVF	2h <50h 3-4 jours
1994	Pruitt	Macaque	sCR1i	48-90h
1994	Kawauchi	Macaque	Aucun PP Tacrolimus+St PP+St+Tacro+FUT175	<10 min <10 min 30 min 80-270min
1994	Ye	Babouin	CsA+CyP+MTx+CS CsA+CyP+MTx+CS+Melibiose	15 min 12-18h
1994	Brewer	Babouin	IA+Rdx PP+Rdx	6-15 jours 1-8 jours
1994	Fukushima	Babouin	CsA+DSG+FUT175+St PP+CsA+DSG+FUT175+St	10h <16 jours
1995	Kaplon	Babouin	Aucun	<82h
1995	Magee	Macaque	Ig+St+CsA+AZA+CS	2h à 7 jours
1995	Magee	Babouin	IA+Ig+St+CsA+AZA+CS	7 à 10 jours
1996	Pruitt	Macaque	sCR1i continu sCR1i continu+ CsA+CyP+CS	11 jours 21-31 jours
1996	Kobayashi	Babouin	CsA+CyP+CS+MTx FUT175+K76COOH	15 à 40 min 4-10h
1996	Michler	Babouin	Aucun	15 à 96h
1996	Davies	Macaque	Aucun CsA+CyP+CS sCR1i continu+ CsA+CyP+CS	1h 1h 21-32 jours
1996	Waterworth	Macaque	CsA+CyP+CS	45 min
1997	Kobayashi	Babouin	CVF+St+CsA+CyP+CS+MTX	6-25 jours
1997	Zaidi	Macaque	CsA+CyP+CS	<30 jours
1997	Itescu	Babouin	CsA+CyP+CS	6 jours
1997/1998	Minanov	Babouin	Aucun CsA+MMF+CS	<4 jours <6 jours
1997	Pruitt	Macaque	sCR1i intermittent+CsA+CyP+CS	6 semaines
2002	Salerno	Macaque	Aucun CAB-2	<2h 108h

Tableau 2a : Résultats des premières xénotransplantations porcines cardiaques chez le primate non Humain

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie
1995	Kaplon	Macaque	Aucun	7 à 9h
1997	Blum	Macaque	FUT175+K76-COOH	2-15 min
1998	Yeatman	Babouin	Aucun	<30 min
1998	Daggett	Babouin	Aucun	<30 min

Tableau 2b : Résultats des premières xénotransplantations porcines pulmonaires chez le primate non Humain

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie
1968	Calne	Babouin	CS+AZA	6h à 3 jours
1970	Calne	Macaque	IG	<12h
1996	Luo	Babouin	CsA+CyP+CS	2h

Tableau 2c : Résultats des premières xénotransplantations porcines hépatiques chez le primate non Humain

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie
1993	Leventhal	Babouin	IA+St+CyP+DSG+ATG+CS	13 jours
1994	Besse	Babouin	Aucun	<2h
			PP+IG+CsA+CS	23 jours
1995	Sablinski	Macaque	PP+ATG+CsA+CS	1-23 jours
2000	Loss	Macaque	CsA+CyP+CS	<24h
2001	Hecker	Macaque	C1inh+CyP+CsA+MMF+CS	5-15 jours

Tableau 2d : Résultats des premières xénotransplantations porcines rénales chez le primate non Humain

2.2 Rejet Hyper aigu

La grande majorité des premiers travaux ont concerné des xéno greffes de cœur et les résultats ont montré des rejets très rapides et puissants avec des survies ne dépassant pas quelques jours. Macroscopiquement un organe ayant subi un rejet hyper aigu est nécrosé, hémorragique, siège de ruptures capsulaires (Figure 5 ci dessous). Histologiquement ce rejet présente des thromboses intravasculaires extensives associées à des hémorragies et œdème extravasculaire.

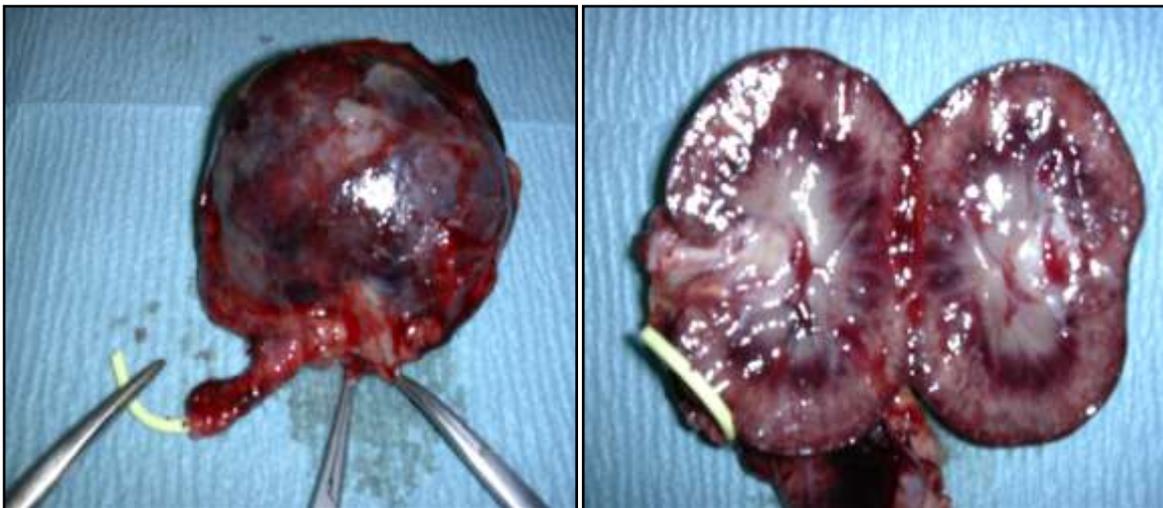


Figure 5 : Aspect macroscopique d'un rejet hyper aigu (photos personnelles)

Ces rejets appelés rejets hyper aigus ont pu être en partie atténués par l'utilisation de porc transgéniques pour des molécules de régulation de la coagulation humaine telle que CD55 (DAF : Decay Accelerating Factor ou) et/ou CD59 (MIRL : Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) inhibiteur du complexe d'attaque membranaire ou transgéniques pour un inhibiteur du récepteur du complément CD46 (MCP : Membrane Cofactor Protein). Les survies s'améliorèrent mais aux prix de lourds protocoles d'immunosuppression parfois précédée d'une splénectomie ou de plasmaphérèse (Tableau 3a, 3b, 3c et 3d).

(McCurry, Parker et al. 1997; Lin, Weidner et al. 1998; Schmoeckel, Bhatti et al. 1998; Waterworth, Dunning et al. 1998; Zaidi, Schmoeckel et al. 1998; Bhatti, Schmoeckel et al. 1999; Vial, Ostlie et al. 2000; Lam, Hausen et al. 2002; Houser, Kuwaki et al. 2004; Brandl, Michel et al. 2005; McGregor, Davies et al. 2005; Wu, Pfeiffer et al. 2007; Byrne, Stalboerger et al. 2008). (Norin, Brewer et al. 1996; Daggett, Yeatman et al. 1997; Yeatman, Daggett et al. 1999). (Cozzi, Bhatti et al. 2000; Ghanekar, Lajoie et al. 2001; Holmes, Richards et al. 2001; Vangerow, Hecker et al. 2001; Barth, Yamamoto et al. 2003; Cozzi, Vial et al. 2003; Garcia, Sun et al. 2004; Lam, Hausen et al. 2004; Shimizu, Yamada et al. 2005; Chen, Sun et al. 2006). (Ramirez, Chavez et al. 2000; Ramirez, Montoya et al. 2005).

Malgré ces traitements lourds, les organes subissent un rejet vasculaire aigu, caractérisé par une activation endothéliale et une forte augmentation des anticorps xénoréactifs.

Année	Auteur	Animal Receveur	Immunosuppression	Survie (jours)
1995	Mc Curry	Babouin	hCD55+hCD59+St +CyP+AZA+CS+IA	<1 (30h)
1997	Lin	Babouin	hCD55+hCD59+IA +CsA+CyP+CS	<1
1998	Waterworth	Babouin	hCD55	21
1998	Schmoeckel	Babouin	hCD55	9
1999	Bhatti	Babouin	hCD55+CsA+CyP+CS+St	99
2000	Vial	Babouin	hCD55+CsA+CyP+CS	39
2002	Lam	Macaque	hCD55+GAS914+CyP+CsA +MMF+St	27
2004	Houser	Babouin	hCD55+GAS914+ATG+LoCD2b +Thymic irradiation+MMF +CVF+antiCD154+St	139
2005	Brandl	Babouin	hCD55+GAS914+CyP+ATG +Tacro+Rapa+St	25
2005	McGregor	Babouin	hCD46+Rituximab+ATG+TPC +Tacro+Rapa+St	137
2007	Wu	Babouin	hCD55+CsA+CyP	36
2008	Byrne	Babouin	hCD46+ α Gal polymer +ATG+Tacrolimus+Rapa	40

Tableau 3a : Résultats des xénotransplantations cardiaques avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Année	Auteurs	Animal Receveur	Immunosuppression	Survie (jours)
1996	Norin	Babouin	hCD59	<1 (12h)
1998	Daggett	Babouin	hCD55+hCD59 hCD55+hCD59+IA	<1
1998	Yeatman	Babouin	hCD55+hCD59	<1 (3h)

Tableau 3b : Résultats des xénotransplantations pulmonaires avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie (jours)
1999	Schmoeckel	Macaque	hCD55+CsA+MMF+CyP +CS+St	60
2000	Cowan	Babouin	hCD55+hCD59+HT	5

2000	Cozzi	Macaque	hCD55+CsA+CyP+CS	39
2000	Ghanekar	Babouin	hCD55+ATG+CsA+Rapamycine +St+GAS914	78
2001	Lorenz	Macaque	hCD55+CsA+CyP+CS	23
2002	Garcia	Babouin	hCD55+Ig+CsA/Tacrolimus +MMF/Rapamycine+CS+TPC	75
2001	Vangerow	Macaque	hCD55+CyP+C1inh+St	68
2002	Lam	Macaque	hCD55+CyP+CsA+MMF St+GAS194	27
2002	Holmes	Macaque	hCD55+CyP+CsA+Evero+MMF TPC+St	60
2003	Barth	Babouin	hCD55+Thymus+GAS914 +antiCD3+CVF CyP+CsA+MMF+St	229
2004	Cozzi	Macaque	hCD55+GAS914+CyP +CsA+MMF+St	37
2005	Shimizu	Babouin	hCD55+Thymus+GAS914 +ATG+antiCD3+CyP+CVF+MMF+anti-CD40	30
2006	Chen	Babouin	hCD55+ATG+GAS914+Tacro +MMF+LF15-0195 hCD55+Rituxan+CVF+St	75 14

Tableau 3c : Résultats des xénotransplantations rénales avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

Année	Auteurs	Receveur	Immunosuppression	Survie (jours)
2000	Ramirez	Babouin	hCD55+CyP+CsA+St	6
2005	Ramirez	Babouin	hCD55+hCD59+CyP+CsA +MMF+CS+Rituximab +Daclizumab	<1

Tableau 3d : Résultats des xénotransplantations hépatiques avec organes porcins transgéniques pour CD55 et/ou CD59 chez le primate non humain

2.3 Les xénoantigènes

La plupart des mammifères possède une enzyme de glycosylation, l'alpha 1,3 galactosyltransférase ($\alpha 1,3$ GT), responsable de la synthèse d'un épitope Gal $\alpha 1-3-\beta$ Gal exprimé à la surface des cellules endothéliales. Chez les grands primates dont l'homme, cette enzyme n'existe plus, et ne possédant plus l'épitope Gal $\alpha 1-3-\beta$ Gal, ils développent alors des

anticorps naturels anti Gal dirigés contre cette épitope (Tableau 4). (Galili, Shohet et al. 1988).

Espèces	Expression de l'épitope Gal	Anticorps anti Gal naturels
Mammifères non primates	+	-
Singes du nouveau monde (Continent américain : marmouset, capucin, tamarin)	+	-
Singes de l'ancien monde (Continent Africain et Asie : Babouins, Macaques, Macaque)	-	+
Grands singes (Hommes, Gorille, Bonobo, Chimpanzé, Orang Outang, Gibbon)	-	+

Tableau 4 : Distribution réciproque de l'épitope Gal et des anticorps naturels anti Gal chez les mammifères

L'idée fut donc de supprimer l'expression du motif Gal α 1-3- β Gal pour prévenir les xénorejets (Cooper, Koren et al. 1993). La technique de transfert de noyau apparue en 1996, a permis de produire en 2002 les premiers porcs homozygotes pour une forme inactive de l' α 1,3 GT (porc Gal-KO) (Phelps, Koike et al. 2003) . (Chen, Qian et al. 2005; Kuwaki, Tseng et al. 2005; Tseng, Kuwaki et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Griesemer, Hirakata et al. 2009; Bauer, Postrach et al. 2010; Lin, Ezzelarab et al. 2010; Kim, Schuetz et al. 2012).

Année	Auteurs	Animal receveur	Organe porcin Gal KO	Immunosuppression	Survie maximale (jours)
2005	Chen	Babouin	Rein	ATG+CVF+Tacrolimus +MMF+CS	16
2005	Kuwaki	Babouin	Coeur	ATG+RdX+CVF+Ac antiCD154+St	90
2005	Yamada	Babouin	Rein	Thymus+St+ATG+LoCD2+RdX+MMF+Ac anti-CD 154+CS	90
2005	Tseng	Babouin	Coeur	Aucun	<1

				ATG+LoCD2+Thy RdX+CVF+Ac antiCD154+MMF+CS+rhAT	180
2009	Griesemer	Babouin	Rein	Thymus+ATG+LoCD2+Rituximab +Ac antiCD 154+MMF+Tacro	90
2010	Ekser	Babouin	Foie	hCD46+ATG+Tacro +MMF	7
2010	Lin	Babouin	Rein	hCD46+ATG+Ac anti CD54+MMF+CS+CVF	4-16
2010	Bauer	Babouin	Cœur	hCD46+IA+antiCD20 +tacrolimus+Rapa+ MMF+CS	50
2012	Kim	Babouin	Foie	ATG+RdX+CVF+Ac antiCD154+St	9

Tableau 5 : Résultats des xénotransplantations avec organes porcins Gal-KO chez le primate non humain

2.4 Rejet vasculaire aigu

Lorsque le rejet suraigu peut être maîtrisé, un autre mécanisme de rejet peut survenir en dépit d'une immunosuppression importante. Il s'agit du rejet vasculaire aigu (Mohiuddin, Corcoran et al.) dont la physiopathologie est distincte du rejet suraigu. L'élément central du RVA est l'activation endothéliale de type II en contraste avec l'activation endothéliale de type I observée dans le rejet hyperaigu. Les lésions histologiques de ce type de rejet sont :

- Des lésions hémorragiques moins importantes que dans le rejet suraigu
- Des thromboses intravasculaires
- Un infiltrat intracellulaire peu abondant

L'activation endothéliale correspond à l'acquisition par les cellules endothéliales d'un phénotype pro inflammatoire en réponse à une agression externe.

Deux types d'activation des cellules endothéliales existent:

- L'activation endothéliale type I, ne requiert pas de synthèse protéique de novo ou la régulation positive des gènes et se produit rapidement (quelques minutes). Elle est déclenchée par l'adhésion de ligands tels que l'histamine ou la thrombine. Les effets comprennent la rétraction des cellules endothéliales, l'expression de la sélectine P, la libération de facteur de von Willebrand, de monoxyde d'azote et de prostaglandines. Ces différentes protéines sont pour la plupart stockées dans les organelles de Weibel-

Palade. Cette activation de type I, appelée aussi stimulation endothéliale conduit et prépare l'activation de type II.

- L'activation endothéliale type II, est une activation plus longue (quelques heures) induite par des cytokines, le TNF ou l'interleukine 1. Elle nécessite la transcription des gènes codant pour les molécules d'adhésion, des cytokines, et le facteur tissulaire. Les cellules endothéliales partagent un mécanisme commun de contrôle intracellulaire via l'activation des facteurs de transcription, y compris le facteur nucléaire κ B. Un agent stimulant agissant à la surface des cellules endothéliales provoque l'activation du facteur cytoplasmique κ B nucléaire. Une fois activé, le facteur nucléaire κ B est transporté dans le noyau et se lie aux régions promotrices de gènes qui sont régulés positivement dans l'activation des cellules endothéliales.

Ces deux réponses favorise l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et conduisent à un état d'hyperperméabilité vasculaire permettant la transmigration.

Le rejet vasculaire aigu est caractérisé par un infiltrat cellulaire composé en majorité de monocytes (70-80 %) et de cellules *Natural Killer* (NK) (10-20 %). Il est associé à l'activation des cellules endothéliales du greffon, qui est de type II, c'est-à-dire accompagnée d'une stimulation de la transcription. Les stimuli activateurs sont multiples et interviennent probablement de façon séquentielle. Les cellules endothéliales sont activées par les facteurs humoraux présents dans le sérum du receveur que sont les xénoanticorps, le complément, les cytokines produites par les monocytes activés (IL1alpha, TNFalpha), et également par le contact direct avec les monocytes et les cellules NK humaines. L'importance du rôle des macrophages et cellules NK dans le rejet est modulée par l'inefficacité des expériences de déplétion par anticorps monoclonaux, suggérant donc que l'infiltrat cellulaire participe mais n'initie pas le rejet vasculaire. En réalité, la pathogénie du rejet retardé, comme du rejet suraigu, est largement liée aux Ac xénogéniques anti-Gal. Mais, dans le cas du rejet retardé, il est associé à leur retour, d'où à nouveau l'activation des cellules endothéliales du greffon vers un phénotype procoagulant, et ce malgré l'absence de complément actif (Itescu, Kwiatkowski et al. 1998; Akiyoshi, Hirohashi et al. 2012). Cette activation de la coagulation est responsable d'un phénomène de coagulation intravasculaire disséminée associée au rejet vasculaire aigu observé avec les greffons transgéniques.

Il semble que l'isotype, immunoglobulines de type M (IgM) ou G (Wieselthaler, Schima et al.), mais également la spécificité des xénoAc auraient un rôle déterminant dans leur caractère

pathogène : les Ac qui sont délétères sont clairement des IgM. Quant au rôle des IgG, il représente une voie de recherche en voie d'exploration.

3. Complément et transplantation

3.1 L'activation du complément

Le complément représente un des éléments essentiels, avec les anticorps, du système humoral de défense contre les agents infectieux ou dans d'autres réponses immunes humorales comme l'alloimmunité. Il se compose d'une vingtaine de protéines circulantes capables d'interagir avec certaines membranes biologiques. Il n'est pas spécifique d'un antigène et est activé immédiatement par la présence d'un pathogène, il est donc considéré comme une partie de l'immunité innée. D'un autre côté, les anticorps activent certaines protéines du complément, ainsi l'activité du complément fait aussi partie de l'immunité acquise. Le complément stimule l'inflammation et l'opsonisation, facilite la phagocytose des antigènes, et lyse directement certaines cellules. Comme il est un puissant agent inflammatoire, son activité est étroitement régulée. Il y a trois voies biochimiques qui activent le système du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines liant les mannoses (Figure 6).

3.1.1 La voie classique

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

des composants tardifs du complément. Dès lors, la perméabilité de la cellule est altérée, les petites molécules pénètrent et sortent de la cellule, l'eau entre par osmose faisant augmenter son volume jusqu'à la lyse (Figure 6).

3.1.2 La voie alterne

La voie alterne est la première défense apparue au cours de l'évolution et est la première en jeu lors d'une infection par un germe inconnu de l'organisme infecté, avant une réponse immune spécifique. En effet, son activation n'est pas dépendante de la fixation des anticorps sur l'antigène. Elle est activée par les surfaces cellulaires des bactéries, des cellules infectées par un virus, de certaines levures et de parasites. La voie alterne d'activation résulte de la fixation du C3b sur un site accepteur. Le C3b fixé à une surface peut alors lier le facteur B qui est clivé par le facteur D en Bb et Ba, formant la C3-convertase alterne, ou C3bBb. Cette C3-convertase clive des molécules de C3 pour former un complexe C3bBbC3b, ou C5-convertase alterne. Cette dernière va à son tour cliver le C5 rejoignant ainsi la voie classique (Figure 6).

3.1.3 La voie des lectines

Une protéine globulaire, la Mannose Binding Protein (MBP) de la famille des collectines, peut interagir avec les résidus mannose ou N-acétylglucosamine (GlcNac) des microorganismes. Sa structure est homologue au C1q. Sa fixation sur des mannoses de bactéries active deux sérine-protéases MASP1 et MASP2 ou MASP3 qui clivent et activent C4 et C2, rejoignant ainsi la voie classique (Figure 6).

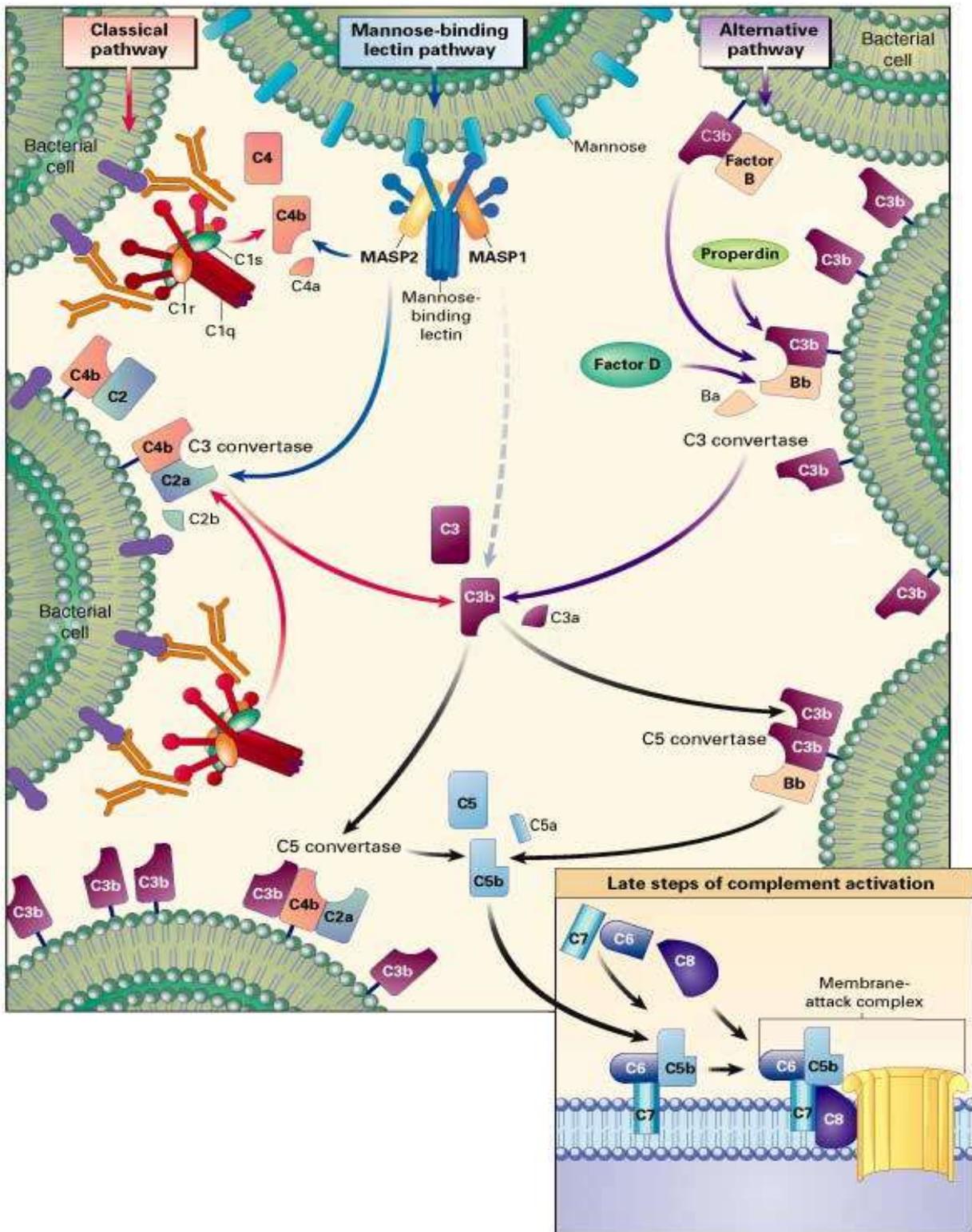


Figure 6 : L'activation du complément par la voie classique, alterne ou des lectines. (Figure issue de Walport 2001).

3.2 Les régulateurs naturels

3.2.1 Le C1-inhibiteur

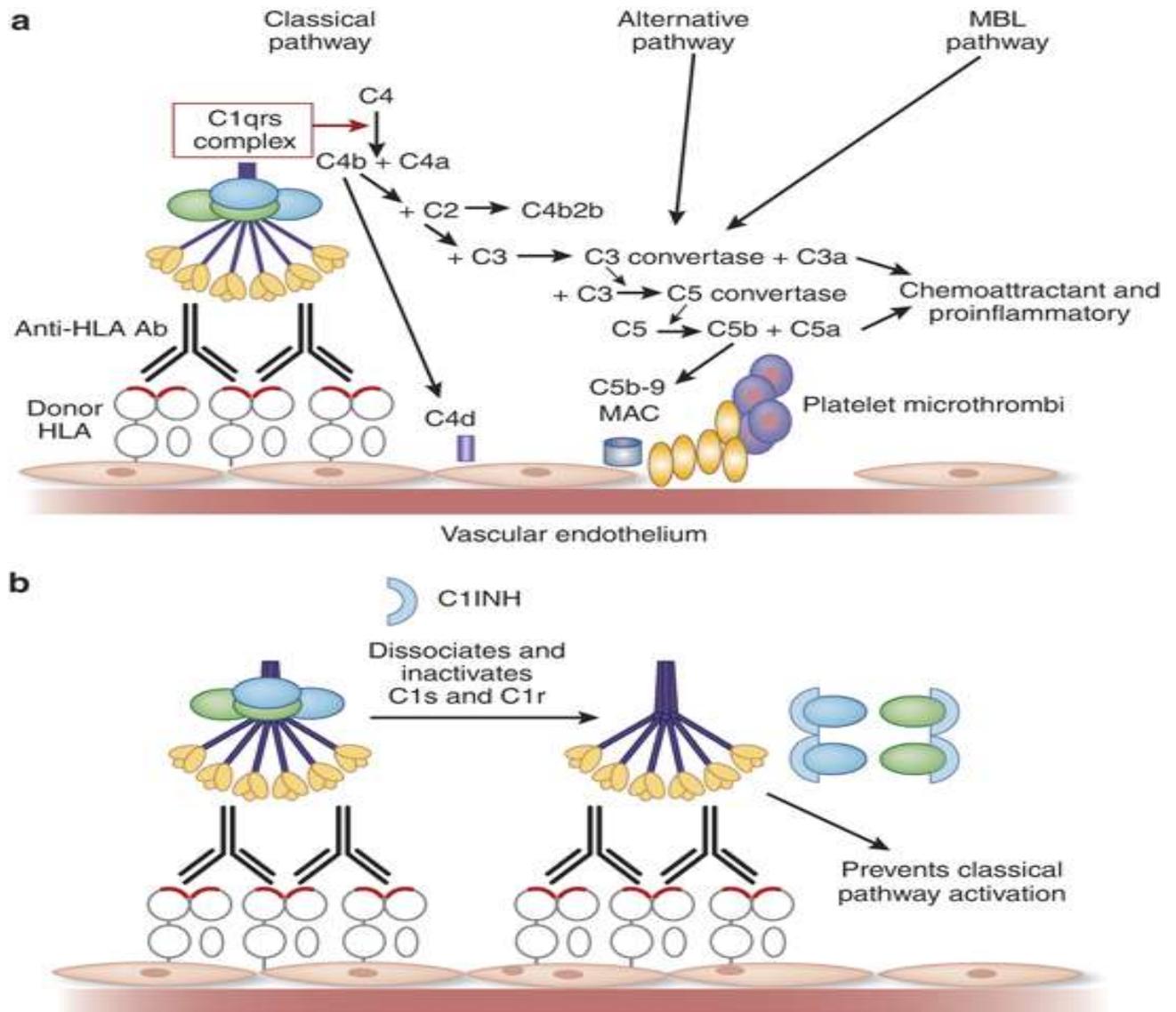
Le C1-inhibiteur (C1-INH), ou inhibiteur de la C1 estérase, est un inhibiteur de protéases à sérine (serpin) et est le premier inhibiteur dans les cascades d'activation du complément. Il inhibe surtout la voie classique du complément en prévenant l'activation du C1r et en inactivant le C1 activé (dès la première étape de l'activation). Cependant de récentes études ont également montré qu'il peut inhiber, *in vitro* principalement, la voie des lectines par l'inhibition des MASP et la voie alterne par liaison avec le C3b (Jiang, Wagner et al. 2001; Bos, Hack et al. 2002; Nielsen, Waage et al. 2007). Ce puissant inhibiteur naturel est utilisé en thérapeutique pour compenser sa déficience congénitale responsable des crises d'œdème angioneurotique (Cugno, Zanichelli et al. 2009). Il n'a que très peu intéressé la communauté de la transplantation jusqu'à présent, avec seulement des travaux en xénotransplantation à partir de C1-INH plasmatique issu de sérum humain (Vangerow, Hecker et al. 2001; Hecker, Lorenz et al. 2002; Poling, Oezkur et al. 2006). Outre son activité d'inhibition de la C1 estérase et donc son efficacité pour bloquer de manière très précoce l'activation du complément, la molécule de C1-INH présente de nombreuses propriétés intéressantes en vue d'une utilisation dans le contexte de la transplantation. En effet, plusieurs études montrent que cette molécule inhibe également l'activation des lymphocytes T (CD4+ et CD8+) en MLR et la génération de lymphocytes cytotoxiques. Il semblerait qu'il soit capable pour cela de cliver le CMH de classe I par une activité protéolytique (Eriksson and Sjogren 1995; Nissen, Bregenholt et al. 1998).

L'action du C1-INH sur la lignée B n'a pas été clairement démontré. Les patients souffrant d'un déficit congénital en C1-INH présente dans presque 50% des cas des auto-anticorps et dans 12% des maladies autoimmunes (Farkas, Gyenyey et al. 1999). Ces patients semblent avoir des lymphocytes B activés circulants (Brickman, Tsokos et al. 1986). Kessel et al l'ont parfaitement montré chez un groupe de patients atteint de ce déficit (Kessel, Peri et al. 2012). En comparant le phénotype des lymphocytes B à un groupe de témoin, ils ont démontré que les lymphocytes B circulants chez ces patients étaient activés, exprimant CD69, CD5 et le TLR9 (Toll like receptor, activateur de l'immunité innée). Ils ont également démontré une activité phosphotyrosine augmentée, qui joue un rôle central dans les voies de communication intercellulaire, de régulation de la prolifération, de différenciation et d'adhésion.

En transplantation, il a été montré que le complément est un régulateur de l'activation B et de la production d'anticorps. Les produits de la cascade du complément sont biologiquement actifs et leurs liaisons à la surface des cellules B est corrélés à une production accrue d'anticorps. Fearon et al ont démontré que les antigènes portant deux ou trois molécules C3d sont 1.000 à 10.000 fois plus immunogène que l'antigène seul. Les effets de C3d dépendent donc de plusieurs variables dont le nombre ou la densité de C3d lié à l'antigène (Wasowska, Lee et al. 2007).

Toutefois, bien que le déficit en C1 INH ou l'activation du complément aient une influence sur l'activation B et la production d'anticorps, la littérature n'a pas décrit les effets des traitements par C1 INH (recombinant ou non) sur la ligné B en transplantation.

Le C1-INH est également capable d'inhiber l'activation endothéliale, l'apoptose des cellules endothéliales et diminue l'expression de VCAM-1 inhibant l'adhésion lymphocytaire endothéliale (Zhang, Qin et al. 2007). Le C1-INH, mais également un dérivé inactif du C1-INH sans site actif protéase (iC1-INH), peut se fixer aux E et P-sélectines des cellules endothéliales et inhibe ainsi l'adhésion leucocytaire *in vitro* et la transmigration *in vivo* (Davis, Cai et al. 2004; Cai, Dole et al. 2005). Le C1-INH montre également des effets protecteurs sur les organes contre les lésions d'ischémie-reperfusion (Storini, Rossi et al. 2005; Arumugam, Magnus et al. 2006) avec notamment plusieurs études cliniques dans l'infarctus du myocarde (Schreiber, Heimisch et al. 2006; Thielmann, Marggraf et al. 2006; Fattouch, Bianco et al. 2007). Enfin, diverses études montrent également un rôle du C1-INH dans la protection contre le choc septique et endotoxinique (Jansen, Eisele et al. 1998; Wouters, Wagenaar-Bos et al. 2008). Cette action semble logiquement dépendre de l'inhibition de l'activation du complément et de l'inflammation liée aux nombreuses anaphylatoxines libérées, néanmoins une étude a mis en évidence que le C1-INH, mais également le dérivé inactif, prolongent la survie de souris dans un modèle de choc septique (Liu, Lu et al. 2007). Ils observent notamment une augmentation importante du nombre de bactéries tuées par les neutrophiles et macrophages *in vivo*. Ils observent également que le C1-INH, et le iC1-INH, se fixent *in vitro* à la paroi des bactéries, que cette fixation ne modifie pas la prolifération bactérienne, mais augmente l'activité bactéricide des neutrophiles sanguins et des leucocytes du péritoine.



3.2.2 Autres régulateurs

Le complément est un puissant agent inflammatoire de l'immunité innée. Il est par conséquent étroitement régulé par d'autres inhibiteurs que le C1-INH. Un deuxième point de contrôle de l'activité du complément, en amont dans la cascade d'activation, est la C3-convertase, de la voie classique (C4b2a) ou de la voie alterne (C3bBb). Les complexes enzymatiques de ces C3-convertases sont très instables à 37°C conduisant à une dissociation spontanée et une perte d'activité enzymatique irréversible. Cette dissociation spontanée est accélérée par le C4-bp qui par ailleurs sert de cofacteur au facteur I. Ce dernier est un enzyme capable de cliver le C3b et le C4b qui ne peuvent plus participer à la formation de la C3-

convertase classique. Le facteur H, cofacteur également de I, se lie spécifiquement au C3b en chassant le Bb de la C3- convertase alterne et en empêchant toute réassociation. De même, le CR1 et le CD46 (MCP), qui servent aussi de cofacteurs à I, et le CD55 (DAF : Decay Accelerating Factor), distribués à la surface de nombreuses cellules comme CD46 (leucocytes, cellules épithéliales et endothéliales) accélèrent la dissociation spontanée des deux C3-convertases. Le troisième et dernier point de contrôle de l'activation du complément se situe au niveau de la formation et du dépôt du C5b-9 (le complexe d'attaque membranaire) à la surface des cellules. La vitronectine (ou protéine S) s'incorpore dans le C5b-7, le rend hydrophile, et lui confère ainsi une incapacité à s'enchâsser dans la membrane plasmique. La clusterine est capable d'interagir avec les parties hydrophobes du C7, C8 et C9. Elle entre ainsi en compétition avec les composants de la bicouche lipidique des membranes. Ces deux régulateurs inhibent la déposition du complément terminale à la surface des cellules. Enfin, le CD59 est un inhibiteur tardif. Après liaison au C8 α , il se lie à la première molécule de C9 se fixant sur le complexe C5b-8 empêchant son déploiement correct indispensable à son insertion dans la membrane plasmique et ainsi à la polymérisation du C9.

3.3 Réponse cellulaire et complément

Le complément est un système biologique complexe aux effets divers précédemment cités. Outre son activation qui conduit à la lyse directe du pathogène ou son opsonisation et à la production d'anaphylatoxines pro-inflammatoires et chimiotactiques, de nombreux travaux ont mis en évidence que ce système biologique est également impliqué directement dans la réponse cellulaire, notamment les lymphocytes T et les CPA comme le rappelle Kemper dans sa revue (Kemper and Atkinson 2007). Certes, d'après certains travaux cités précédemment, le C1-INH par exemple peut inhiber la prolifération et la génération de lymphocytes cytotoxiques *in vitro*, les mécanismes impliqués demeurent cependant inconnus. Les lymphocytes T expriment quelques récepteurs pour le complément (faible répertoire), mais ces récepteurs sont fortement surexprimés après activation. En revanche, les CPA expriment un large répertoire de récepteurs pour le complément à leur surface, et leur engagement modifie la maturation et l'expression de cytokines par ces CPA. Il a été montré dès 1991 qu'un anticorps anti-CD59 augmente l'activation T (Korty, Brando et al. 1991). Un modèle murin a montré que CD59 est surexprimé sur les lymphocytes T CD4+ après activation et que le blocage de CD59 *in vitro* augmente significativement les réponses polyclonales ou

spécifique d'un antigène des lymphocytes T, confirmant ainsi que CD59 régule la réponse cellulaire (Sivasankar, Donev et al. 2007). Les travaux de Peter Heeger sur CD55 (DAF) ont montré un rôle similaire de cet autre régulateur du complément (Heeger, Lalli et al. 2005). Ainsi, l'absence de DAF sur les CPA et les lymphocytes T conduit à une augmentation de la prolifération de ces lymphocytes et de la fréquence en lymphocytes T effecteurs induits. Ils mettent notamment en évidence que l'activation locale de la voie alterne est responsable de cette activité, puisqu'elle est dépendante du facteur D et, en partie, du C5. D'ailleurs, cette étude montre également que les facteurs de la voie alterne sont rapidement produits après contact des lymphocytes T avec les CPA et que DAF est sous-exprimé après ce contact. Un peu plus tard, l'équipe de Heeger a démontré que la production locale de complément augmente l'expansion des lymphocytes T en inhibant l'induction d'apoptose, via un mécanisme de surexpression de Bcl-2 dépendant de la PI3K et une sous-expression de la molécule Fas (Lalli, Strainic et al. 2007). Comme CD59, CD55 semble donc réguler la réponse T en inhibant certaines molécules de l'activation du complément qui, elles, sont responsables d'une costimulation des lymphocytes T. Par ailleurs, le complément produit localement durant le contact T-CPA, ne donne pas seulement l'augmentation de la prolifération et de la production de cytokines. Il permet également de maintenir la viabilité et la survie des lymphocytes T naïfs de manière constitutive (Strainic, Liu et al. 2008). D'après d'autres études, la stimulation du TCR et de CD46 (MCP) sur des lymphocytes T humains induit la génération de lymphocytes T régulateurs sécrétant de l'IL-10 et produisant du granzyme en grande quantité (Kemper, Chan et al. 2003). Enfin, le complément semble également agir directement sur les lymphocytes B, et confère un second signal d'activation lorsque ces lymphocytes B reconnaissent un antigène opsonisé via le complément (Barrington, Zhang et al. 2001).

3.4 Inhibition du complément en transplantation

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

3.4.1 Chez le donneur

Depuis plusieurs années, différentes lignées de porcs transgéniques pour des molécules humaines régulatrices du complément ont été générées pour la recherche en xénotransplantation. Ainsi des porcs, exprimant les molécules CR1 (CD35), MCP (CD46), DAF (CD55) ou CD59 directement dans le greffon, ont permis de prévenir en partie les rejets hyperaigus à composante humorale en xénotransplantation. Preuve que la régulation locale du complément est importante et nécessaire lors des réponses humorales en transplantation (Le Bas-Bernardet, Anegon et al. 2008). Chez l'homme la thérapie génique du donneur n'est pas possible, mais l'anticipation par un prétraitement du greffon via les machines à perfusion pulsatiles, durant les 10-20 heures séparant le prélèvement de la transplantation, pourrait permettre la mise en place d'une régulation importante du complément au niveau du greffon, dès le déclampage. C'est ainsi qu'il a été montré que la perfusion d'un xéngreffon porcine par du C1- INH plasmatique humain concentré permet de retarder significativement le rejet hyperaigu dans un modèle *ex vivo* de perfusion par du sang humain (Fiane, Videm et al. 1999). Enfin, le complément du donneur semble également une source importante dans la réponse immune et dans le rejet d'allogreffe. En effet, les cellules épithéliales et les tissus vasculaires sont sources de production locale de complément en présence d'inflammation (Andrews, Zhou et al. 1995). Il a été démontré en utilisant des donneurs de rein C3 KO, que l'absence de production de C3 dans le greffon est capable de prévenir le rejet d'allogreffe dans leur modèle murin et que la réponse des lymphocytes T est significativement atténuée *in vivo* et *in vitro* (Pratt, Basheer et al. 2002). Une étude clinique a par ailleurs permis de démontrer que le polymorphisme de C3 du donneur dans la greffe de rein influe de manière significative la fonction et le devenir du greffon, confirmant chez l'homme que la production de complément par le greffon est une source non négligeable et génératrice d'immunité (Brown, Kondeatis et al. 2006). Ce résultat a été néanmoins contesté par une autre étude démontrant, sur une plus grande cohorte, qu'il n'y a aucune différence de survie ou d'incidence de rejet en fonction du polymorphisme de C3 du donneur (Varaganam, Yaqoob et al. 2009).

3.4.2 Chez le receveur

Le contrôle de l'activation du complément chez le receveur, à la manière du contrôle de l'activation T, est une stratégie thérapeutique grandissante en transplantation. En effet, le rejet humoral demeure toujours peu réversible avec l'immunosuppression actuelle, qui cible principalement les lymphocytes B et/ou la production d'immunoglobulines. De plus, la composante humorale dans le rejet chronique est maintenant bien établie et est diagnostiquée par la déposition au sein du greffon de fragments issus de l'activation du complément, le C4d (Mengel, Sis et al. 2012). De nombreuses stratégies inhibant, à différentes étapes, spécifiquement l'activation du complément ont été développées en transplantation, mais peu sont aujourd'hui disponible en pratique clinique. Ainsi, à partir de C1-INH concentré et extrait de plasmas humains, plusieurs études ont montré que bloquer l'activation du complément dès la première étape, avec une forte immunosuppression, permet de prévenir le rejet humoral hyperaigu en xénotransplantation chez le primate (Fiane, Videm et al. 1999; Vangerow, Hecker et al. 2001; Hecker, Lorenz et al. 2002). D'autres équipes se sont intéressées à inhiber le complément plus en amont, notamment au niveau de la C3-convertase. Le venin de cobra contient, entre autre dans ses toxines, du C3b (CVF= Cobra Venom Factor), activateur du complément qui est résistant à l'action des facteurs I et H humains. La C3-convertase ainsi formée C3b (cobra)- Bb (humain) est très stable et va consommer littéralement tous le C3 disponible, générant ainsi un déficit en facteurs nécessaires à l'activation du complément. Le CVF a été utilisé dans de nombreux protocoles de xénotransplantation ou de greffes ABO-incompatibles en Asie, et est probablement l'une des molécules les plus efficaces dans la prévention de l'activation du complément et dans l'induction d'accommodation (Leventhal, Dalmaso et al. 1993; Candinas, Lesnikoski et al. 1996). Cependant, ce traitement génère des anaphylatoxines C3a et C5a, ainsi que du C3b et C4b qui activent les macrophages et les neutrophiles, entraînant une inflammation systémique qui limite son utilisation. Cette molécule n'est pas approuvée pour une utilisation clinique en Europe et aux Etat-Unis. Le CR1 soluble (sCR1), qui se fixe au C3b et au C4b, et qui accélère la dégradation de la C3- et C5-convertase, a des effets protecteurs dans les modèles d'I/R, mais a beaucoup moins été étudié dans les modèles de transplantation. Des études chez le rat et le primate ont montré qu'une perfusion de sCR1 permet d'obtenir un léger retard du rejet en allo et xénotransplantation (Candinas, Lesnikoski et al. 1996; Pruitt, Bollinger et al. 1996; Pratt, Basheer et al. 2002). Enfin, une autre stratégie pour inhiber l'activation du complément

est d'agir encore plus en amont, de bloquer la conversion du C5, empêchant ainsi la formation de C5a et surtout du complexe d'attaque membranaire (C5b-9). Quelques études ont permis de montrer qu'un anticorps anti-C5, associé avec de la CsA, permet de prévenir le rejet humoral aigu dans des modèles de présensibilisation en allo ou xénogreffes chez le rongeur (Wang, Arp et al. 2007; Rother, Arp et al. 2008). Plus récemment, le groupe de Montgomery a introduit un anti-C5 (Eculizumab) en transplantation clinique : un seul cas, un individu développant un sévère AAMR réfractaire aux stéroïdes, a été traité avec l'anti-C5 associé aux IVIG, à l'anti-CD20 et une plasmaphérèse (Locke, Magro et al. 2009). Beaucoup plus récemment, un traitement préventif par eculizimab chez des patients possédant un taux élevé d'anticorps antidonneur, a permis de diminuer de façon significative le taux de rejet aigu (Stegall, Diwan et al. 2011). Enfin, comme le récepteur du C5a (C5aR) est surexprimé en transplantation rénale chez l'homme durant les épisodes de rejet, Gueler et coll. ont proposé d'injecter un antagoniste du C5aR, ce qui a pour conséquence de retarder le rejet dans 75% des cas dans leur modèle d'allogreffe murine, de réduire l'infiltration en macrophages et en neutrophiles et d'atténuer la réponse des lymphocytes T (Gueler, Rong et al. 2008). Une autre étude a démontré que la perfusion de greffons avec cet antagoniste du C5aR et une solution de conservation permet de prévenir les lésions de l'I/R (Lewis, Kohl et al. 2008).

3.4.3 Le C1 inhibiteur en pratique clinique

Son action thérapeutique ne semble pas limitée au traitement des déficits congénitaux en C1 inhibiteur responsable de l'angioœdème neurotique et son action a été explorée en transplantation dans de nombreux modèles cliniques de façon souvent empirique :

- transplantation pulmonaire, avec amélioration des lésions de reperfusion (Struber, Hagl et al. 1999)
- greffe de cœur et de poumon ABO incompatible (Mohacsi, Rieben et al. 2001; Pierson, Loyd et al. 2002)
- traitement d'une thrombose hépatique après greffe de cellules souches (Heying, Nurnberger et al. 1998)
- traitement des pancréatites aiguës après greffe de moelle osseuse (Schneider, Nurnberger et al. 1999)
- traitement d'un choc septique après transplantation hépatique (Marx, Nashan et al. 1999)

- traitement du syndrome de fuite capillaire après transplantation hépatique (Nurnberger, Heying et al. 1997)

De nombreuses expérimentations in vitro suggèrent un grand potentiel thérapeutique du C1 inhibiteur en allo et xénotransplantation, d'autant plus qu'un recombinaut humain du C1 inhibiteur a été développé par le laboratoire Pharming, permettant de résoudre le problème de disponibilité de cette molécule auparavant extraite du plasma humain.

4. Les inhibiteurs du protéasome

4.1 Mode d'action

La plupart des protéines cellulaires ont une durée de vie courte : de quelques minutes à plusieurs semaines. Les protéines sont détruites par deux mécanismes différents : le système lysosomal (10-20% des protéines essentiellement superficielles) et le système du protéasome (près de 80% des protéines intracellulaires). Pour être détruites par le protéasome, les protéines sont d'abord liées à différents enzymes appelés ubiquitine, dont on distingue trois types E1, E2 et E3. Une fois « ubiquitinylée », la protéine est dégradée par une machinerie lytique : le protéasome composé de quatre anneaux comportant chacun 7 sous-unités. Trois d'entre elles ont une activité protéolytique connue : une unité dite pseudo-caspase, une unité à activité trypsine, une autre à activité chymotrypsine.

Les inhibiteurs du protéasome se lie à la partie 26s du protéasome pour inhiber son fonctionnement. Tout d'abord développé pour traiter le myélome multiple, les inhibiteurs du protéasome, dont le chef de file est le Bortézomib, semblent avoir un intérêt notable en transplantation. Il existe quatre principaux effets physiologiques du protéasome dont l'inhibition apporte des effets immunomodulateurs et expliquent son efficacité dans le rejet à médiation humoral :

- inhibition de l'activité de NF- κ B (facteur de transcription impliqué dans la réponse immune)
- inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose par arrêt du cycle cellulaire
- induction de l'apoptose via le stress du Reticulum Endoplasmic
- diminution de l'expression du CMH de classe I via la réduction de la production de peptides endogènes.

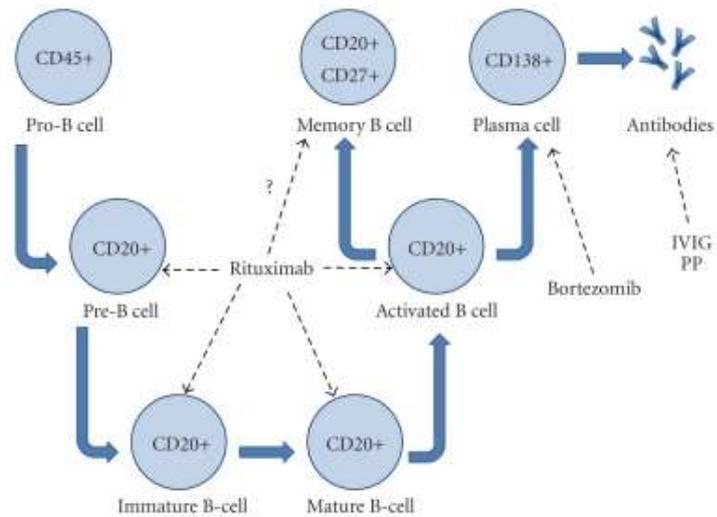


Figure 8 : Diagramme exposant le niveau d'action des thérapies du rejet aigu à médiation humorale

4.2 Utilisation en transplantation

4.2.1 Modèles animaux

L'administration d'un inhibiteur du protéasome (DPBA : Dipeptide Boronic Acid) dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris a permis de quintupler la survie des animaux (35 jours vs 7 jours pour les témoins) (Luo, Wu et al. 2001). La même équipe a également expérimenté l'effet du DPBA dans un modèle murin d'allogreffe d'ilots pancréatiques (Wu, Han et al. 2004), en obtenant 50% de survie des ilots à 60 jours contre 7 jours pour les témoins. Aucun effet délétère sur la fonction endocrine des ilots n'a été observé. Dans un autre modèle murin de greffe cardiaque, l'administration de bortezomib a permis de prévenir le rejet aigu à médiation humorale et d'allonger la survie des greffons. Les auteurs ont également constaté des niveaux inférieurs d'anticorps anti-CMH de classe I et II moins de 7 jours après la transplantation. Dans cette même étude il a également été montré une diminution à long terme de la fibrose interstitielle et de la vasculopathie d'allogreffe (Ashton-Chess, Mai et al. 2010).

4.2.2 Utilisation en pratique clinique

Désensibilisation des receveurs immunisés par le Bortézomib :

La première utilisation des inhibiteurs du protéasome dans un protocole de désensibilisation date de 2008 et a été décrite par Idica. Treize patients hyperimmunisés ont reçu un inhibiteur du protéasome (nombre de cycle non spécifié) et 77% avaient une réduction de leurs taux de DSA (Idica, Kaneku et al. 2008). Trivedi a rapporté chez 11 patients en post-transplantation, la diminution des taux d'anticorps avec un délai moyen, de 24 jours, en dehors du traitement d'un rejet aigu. Toutefois le traitement par inhibiteur du protéasome a été suivi par des plasmaphérèses et des traitements par stéroïdes. L'étude a suggéré que le bortézomib peut être utilisé pour diminuer les niveaux de DSA avec une toxicité minimale (Trivedi, Terasaki et al. 2009). Quatre des 11 patients ont eu réapparition de anticorps anti-HLA, malgré une réduction initiale efficace avec un cycle de bortézomib. Les auteurs ont suggéré que certains patients peuvent avoir besoin de plus de un cycle de traitement pour diminuer cliniquement leur taux de DSA. Dans la série de cas de Wahrmann, deux cycles de bortézomib en pré-transplantation ont été utilisés pour désensibiliser deux receveurs hyperimmunisés. Chez les deux patients, les PRA ont diminué, passant de 87% à 80% chez le patient 1 et 37% à 13% chez le patient 2 (Wahrmann, Haidinger et al. 2010). Les inhibiteurs du protéasomes semblent donc avoir une certaine efficacité pour diminuer l'alloimmunisation avant la transplantation mais la plupart des publications rapportent des traitements adjuvants nécessaires comme la plasmaphérèse ou l'immunoabsorption.

Traitement du rejet aigu humoral :

Plusieurs études de cas et de petites séries ont été publiées concernant l'utilisation du bortézomib. Ces publications sont résumées dans le tableau 6. Everly a été le premier à décrire l'utilisation du Bortézomib pour traiter le rejet aigu à médiation humorale. Cette équipe a rapporté le traitement de six patients et ont observé une inversion rapide du rejet, la réduction des niveaux de DSA, une amélioration de la fonction rénale, et une diminution de la récurrence du rejet (Everly, Everly et al. 2008). Le même groupe a décrit 2 ans après, le traitement de deux patients qui ont rapidement inversé leur rejet et dont les DSA ont disparu en 14 jours (Walsh, Everly et al. 2010). Toutefois il faut noter que le bortézomib a toujours

été associé aux traitements conventionnels du rejet aigu à médiation humorale : Plasmaphérèse, Corticostéroïde et injection d'immunoglobulines. Parfois le Bortezomib est associé ou comparé au rituximab. (Everly, Everly et al. 2008; Perry, Burns et al. 2009; Flechner, Fatica et al. 2010; Walsh, Everly et al. 2010; Hardinger and Murillo 2011; Waiser, Budde et al. 2012)

Auteurs/année	Nb de patients	Traitement adjuvant	Résultats
Waiser ; 2011	10	PP+IVIG	Survie greffon 60%
Hardinger ; 2011	7	PP+IVIG	Survie greffon 5/7
Flechner ; 2010	16	CS+PP+IVIG	Survie greffon 85%
Walsh ; 2010	2	PP+IVIG	Survie greffon 100% Disparition DSA
Mai ; 2009	3		
Perry ; 2009	4	NS	Diminution DSA
Everly ; 2008	6	Variable	Diminution DSA 50%

Tableau 6 : Etudes cliniques du traitement de l'AAMR par le Bortézomib en transplantation rénale

Le bortézomib a donc été utilisé en pratique clinique sans études préliminaires chez le grand animal. La pharmacocinétique et la pharmacodynamie de cette molécule ont essentiellement été étudiées dans des modèles animaux ou chez l'homme atteint de myélome.

L'effet des inhibiteurs du protéasome sur la ligné B est donc purement théorique. Cela souligne le dénuement des cliniciens pour traiter les épisodes de rejet aigu à médiation humorale.

Résultats

1. Projet 1

1.1 Objectifs

Le manque d'efficacité thérapeutique lors d'un RVA peut s'expliquer, en partie, par un manque d'études précliniques sur des modèles animaux adéquats. De plus, la physiopathologie du RVA reste partiellement comprise, à l'inverse des rejets hyper aigus observés dans les contextes de greffe avec présence d'anticorps préformés dirigés contre le donneur (cross-match positif), d'incompatibilité ABO ou de xéno greffe. Un seul modèle a été décrit chez le porc (Poirier, Maillet et al. 2007) montrant la possibilité de construire ce modèle expérimental chez le primate.

Dans cette première étude, nous nous sommes donc intéressés au développement, puis à l'étude d'un modèle expérimental de RVA chez le babouin. Puisque le RVA est principalement un rejet à médiation humorale, le but était de réaliser une transplantation rénale chez des animaux préalablement immunisés par des injections intradermiques de « lymphocytes périphériques » du donneur, afin d'obtenir un rejet précoce et ayant les caractéristiques histologiques et immuno-histologiques d'un RVA à composante humorale.

Un tel modèle nous a permis ensuite d'étudier dans un second temps une intervention thérapeutique préventive par inhibition précoce du complément. En effet, l'inhibition par du C1 inhibiteur recombinant, de la cytotoxicité induite par des allo et xénoanticorps a été démontré *in vitro* (Poirier and Blancho 2008).

1.2 Article 1

**Le C1 inhibiteur recombinant humain prévient le
rejet à médiation humorale chez le babouin
alloimmunisé**

Article paru dans *Kidney International* en Janvier 2010

X. Tillou*^{1,2}, N. Poirier*¹, S. Le Bas-Bernardet¹, J. Hervouet¹, D. Minault¹, K. Renaudin³, F. Vistoli¹, G. Karam¹, M. Daha⁴, JP. Soulillou¹, G. Blancho¹
Kidney International (2010) 78, 152–159

see commentary on page 125

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

Xavier Tillou^{1,2,5}, Nicolas Poirier^{1,5}, Stéphanie Le Bas-Bernardet¹, Jeremy Hervouet¹, David Minault¹, Karine Renaudin³, Fabio Vistoli¹, Georges Karam¹, Mohamed Daha⁴, Jean Paul Souillou¹ and Gilles Blancho¹

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

Acute antibody-mediated rejection is an unsolved issue in transplantation, especially in the context of pretransplant immunization. The deleterious effect of preformed cytotoxic anti-HLA antibodies through complement activation is well proven, but very little is known concerning complement blockade to prevent/cure this rejection. Here, we used a baboon model of preimmunization to explore the prevention of acute antibody-mediated rejection by an early inhibition of the classical complement pathway using human recombinant C1-inhibitor. Baboons were immunized against peripheral blood mononuclear cells from allogeneic donors and, once a specific and stable immunization had been established, they received a kidney from the same donor. Rejection occurred at day 2 posttransplant in untreated presensitized recipients, with characteristic histological lesions and complement deposition. As recombinant human C1-inhibitor blocks *in vitro* cytotoxicity induced by donor-specific antibodies, other alloimmunized baboons received the drug thrice daily intravenously during the first 5 days after transplant. Rejection was prevented during this treatment but occurred after discontinuation of treatment. We show here that early blockade of complement activation by recombinant human C1-inhibitor can prevent acute antibody-mediated rejection in presensitized recipients. This treatment could also be useful in other forms of acute antibody-mediated rejection caused by induced antibodies.

Kidney International (2010) **78**, 152–159; doi:10.1038/ki.2010.75; published online 24 March 2010

KEYWORDS: alloantibodies; antibody-mediated rejection; complement regulation; kidney allograft; nonhuman primate

Correspondence: Gilles Blancho, ITERT, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France.
E-mail: gilles.blancho@chu-nantes.fr

⁵These authors contributed equally to this work.

Received 24 June 2009; revised 15 January 2010; accepted 26 January 2010; published online 24 March 2010

Acute antibody (Ab)-mediated rejection (AAMR) remains a major hurdle in transplantation, with a constant incidence (8–10% in renal transplantation) and a markedly poor prognosis (27–40% of graft loss at 1 year).^{1,2} The diagnosis of AAMR in renal allograft is based on three well-defined cardinal features:¹ (1) morphological evidence of acute tissue injury; (2) immunopathological evidence of Ab involvement (C4d and/or immunoglobulin (Ig) deposition³); and (3) serological evidence of circulating Abs to donor antigens (Ags).

Preformed donor-specific Abs (DSAs), induced by earlier blood transfusions, transplantations, or pregnancies, have a central role in this physiopathology. DSA are strongly associated with kidney graft loss and related to an increased risk of AAMR.^{4,5}

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

The role of the classical complement pathway is broadly documented in allo- and xenotransplantation.¹⁰ Briefly, the

classical pathway is activated on C1q binding to Ab–Ag complexes, leading to the formation of split products such as C4d, and finally to the deposition of membrane attack complex C5b–9, cell lysis, and severe graft injury. Several strategies that inhibit complement activation at different steps have been reported, such as the use of the soluble complement receptor 1,¹¹ C5a receptor antagonist,¹² anti-C5a Ab,¹³ and cobra venom factor,¹⁴ in the ABO-incompatible or xenotransplantation settings. Transgenic expression of human complement regulatory molecules, such as CD46,¹⁵ CD55, and CD59,¹⁶ has also shown efficacy in pig xenografts. A few studies reported the use of concentrated C1-inhibitor (a physiological inhibitor) extracted from human plasma, to specifically block the classical pathway by acting directly at its first step of activation.^{17,18} Recently, a recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) has been developed, produced in transgenic rabbit milk,¹⁹ and is currently undergoing phase III clinical trials for the treatment of hereditary angioedema.²⁰ We have recently proven that this rhC1INH inhibits *in vitro* cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies.²¹

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

RESULTS

Alloimmunization

Two intradermal injections of donor peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), with a 2-week interval, were sufficient to immunize all baboons. As determined by fluorescence-activated cell sorting (FACS), anti-donor IgG Abs were detectable in recipient sera 2 weeks after the second injection and increased until reaching a plateau after 3–4 weeks (Figure 1a). Some animals (3 of 10 in this study) developed earlier alloAbs (at 2 weeks after the first injection) and were therefore immunized a second time in order for the transplantations to be performed systematically during the plateau phase at a similar time after immunization. These alloAbs were specifically directed against donor Ag, as they bound donor cells, but neither autologous nor third-party cells (Figure 1b). The second peak of fluorescence detected by FACS corresponded to a nonspecific binding of the secondary Ab on B-cell membrane Ig. Recipient sera were then tested for cytotoxicity against donor cells at day 0 and at the plateau phase of the alloimmunization. Specific cytotoxicity for donor cells was observed without cytotoxicity against the third-party cells (Figure 1c). Finally, donor-specific sera lost their cytotoxicity when preabsorbed on donor platelets (expressing only class I Ag; Figure 1d), proving that the induced alloAbs were cytotoxic and directed against donor major histocompatibility complex class I molecules.

rhC1INH inhibits alloAb-mediated cytotoxicity

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

Anti-donor presensitization induces AAMR

Whereas nonimmunized and nonimmunosuppressed baboons ($n=3$) rejected their kidney allograft around day 6 posttransplantation, preimmunized recipients ($n=4$) developed an accelerated rejection ($P=0.0134$): three animals rejected at day 2 and one at day 3 (Figure 2a–d). At autopsy, none of the animals showed any signs of disseminated intravascular coagulation, platelet consumption, or vascular thrombosis (data not shown). Graft histology after rejection in nonimmunized animals showed typical signs of acute cellular rejection, with a large and diffuse mononuclear cell infiltrate with tubulitis and some vascular infiltration (Figure 3). In contrast, presensitized recipient grafts showed severe alterations and lesions characteristic of AAMR, with interstitial hemorrhage, edema, a diffuse acute tubular necrosis, intraglomerular thrombosis, fibrinoid necrosis, capillary margination of inflammatory cells, and also a small mononuclear cell infiltrate, but no tubulitis or intimal arteritis (Figure 3). By immunohistochemistry, deposition of C5b–9 and C3c was detected around glomeruli and tubules, as well as in arteries and capillaries, but was absent in controls. However, whereas C3c staining clearly revealed peritubular capillaries, C4d staining remained essentially restricted to glomeruli and arteriolar endothelium (Figure 3). Finally, the dense CD3+ and CD20+ cell infiltrates present in rejected grafts of nonsensitized recipients were barely detectable in rejected grafts of alloimmunized monkeys (Figure 3). IgG staining was poor (data not shown), but Abs can be broken down or internalized.

rhC1INH therapy prevents AAMR in presensitized recipients

Preliminary experiments showed the estimated half-life of rhC1INH to be ~6 h (data not shown). Therefore, recipients received i.v. injection every 8 h during the first 5 post-transplant days. The two first alloimmunized baboons, receiving 100 U/kg of rhC1INH, showed suboptimal plasma concentrations, with a C_{\max} at 15 min rising to just 0.6 g/l (Figure 4a). One of these two recipients rejected on day 4, whereas the second one rejected on day 6, 1 day after treatment discontinuation (Figure 2a–d). The four subsequent recipients received 200 U/kg and showed a better pharmacological profile, with a C_{\max} of 1 g/l at 15 min, but with the same C_0 as recipients receiving 100 U/kg (Figure 4a). No rejection occurred during the treatment, but did so rapidly thereafter at days 6 and 7, similar to the nonsensitized untreated recipients, except for one animal, which rejected later at day 14 after transplantation

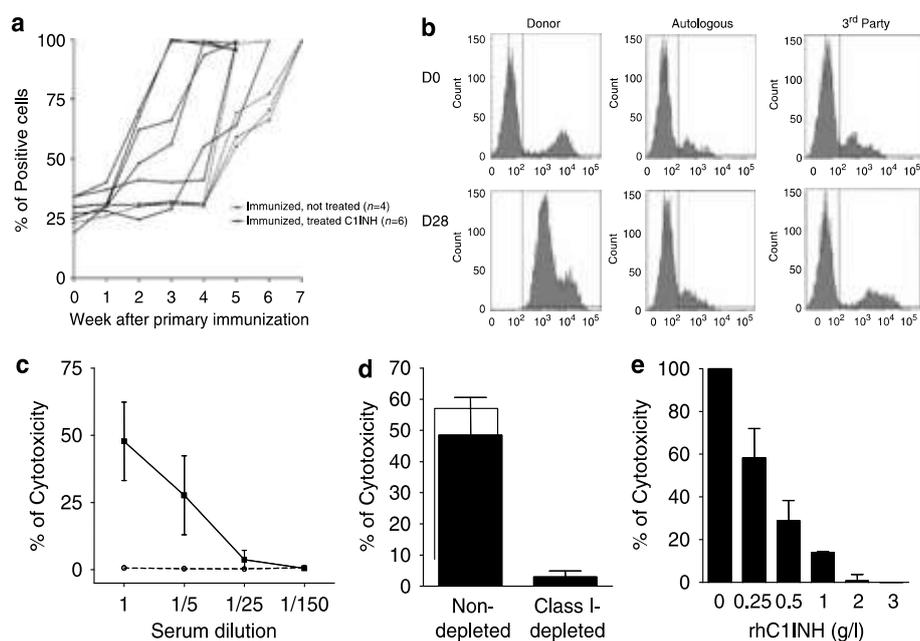


Figure 1 | Specificity and cytotoxicity of the induced alloantibody (alloAb). (a) Kinetics of anti-donor immunoglobulin G (IgG) development after primary immunization analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) each week. (b) Appearance of specific IgG, measured by FACS, against donor but not third-party or autologous cells in immunized animals at day 28 after primary immunization in comparison with day 0. (c) Complement-mediated cytotoxicity of immunized recipient serum against donor ($n = 6$) but not third-party cells ($n = 3$) at the plateau of immunization. (d) Depletion of anti-donor class I Abs in immunized recipient sera by donor platelet absorption abolished cytotoxicity, proving the induced alloAb to be specific for donor major histocompatibility complex class I ($n = 6$). (e) Anti-donor alloAb cytotoxicity is inhibited by increased recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) concentration ($n = 3$).

(Figure 2a–d). As expected, total IgG sera levels decreased in both groups (Figure 4b), suggesting an early but not deleterious, without complement activation, Ab binding into the graft. However, serum monitoring of the C3 and C4 complement fractions (Figure 4c and d), as well as analysis of the classical (50% complement hemolysis, CH50), alternate (50% alternate pathway, AP50), and mannose-binding lectin (50% mannose-binding lectin pathway, MBL50) pathways of the complement system (Figure 4e–i) did not differ significantly between treated and nontreated animals. On the other hand, a functional kinetic study of CH50, covering the half-life of the rhC1INH, on two treated animals showed that complement classical pathway was inhibited as long as rhC1INH was circulating in the periphery (Figure 4f). Finally, some activation of the alternate pathway was noticed from day 1 in all groups, probably due to the surgical stress as already known.²⁰ Histological examination of the rejected organs at 1 week after drug discontinuation in the treated group showed characteristic signs of AAMR and also of acute cellular rejection (Figure 3). Complement deposition did not differ at rejection between untreated presensitized recipients and recipients treated with 100 U/kg (data not shown), but C4d artery staining was absent, and C3c as well as C5b–9 deposition were much less pronounced in the 200 U/kg group, even 1–2 days after drug discontinuation (Figure 3). More importantly, kidney biopsies performed under

treatment (200 U/kg) at day 3 after transplantation showed any of the specific C4d, C3c, or C5b–9 deposition, as well as a poor T-cell and B-cell infiltration (Figure 3), showing that during the effective phase treatment, complement classical pathway activation was efficiently inhibited locally inside the graft.

DISCUSSION

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

According to our previous study in pigs,²² two subsequent intradermal injections of donor PBMCs were sufficient to immunize all recipients before transplantation. To ensure a stringent and reproducible model of AAMR, we preferred not to perform transplantation before the appearance of alloAbs, but rather only in graft recipients with a positive cross-match, with a plateau of anti-donor alloAbs. All immunized animals developed specific anti-donor Abs directed against

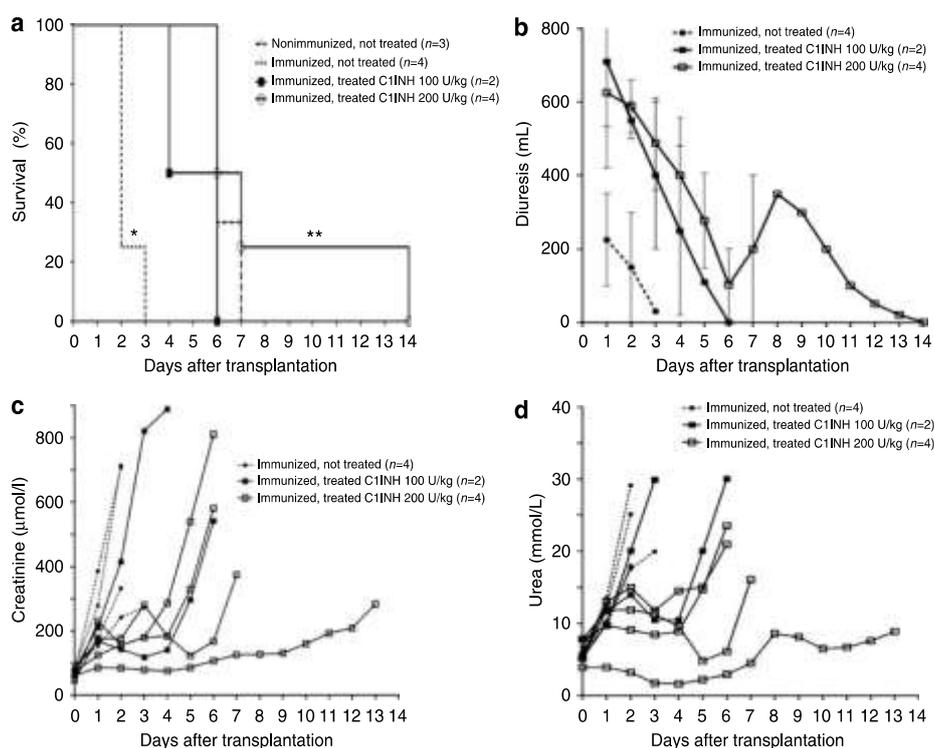


Figure 2 | Clinical and biological effects of recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) administration in presensitized transplanted recipients. (a) Renal allograft survival in nonimmunized baboons ($n = 3$), immunized baboons without therapy ($n = 4$), in those treated with 100 U/kg of rhC1INH ($n = 2$), or those with 200 U/kg of rhC1INH ($n = 4$). $*P = 0.0134$ versus the nonimmunized group. $**P = 0.0058$ versus the nontreated immunized group. (b) Daily diuresis of immunized baboons without therapy ($n = 4$), treated with 100 U/kg of rhC1INH ($n = 2$) or 200 U/kg of rhC1INH ($n = 4$). (c) Daily creatinine levels and (d) blood urea nitrogen measurement after transplantation in immunized recipients without therapy ($n = 4$), in those treated with 100 U/kg of rhC1INH ($n = 2$) or in those treated with 200 U/kg of rhC1INH ($n = 4$).

major histocompatibility complex Class I molecules that were cytotoxic in the presence of complement. This sensitization procedure resulted in an accelerated rejection of the immunizing donor organ, within 48–72 h, as opposed to 1 week for untreated nonimmunized baboons. At transplantectomy, rejected kidneys were characterized by an intense edema, congestion, hemorrhagic infiltration, or even graft ruptures without obvious signs of disseminated intravascular coagulation. The histology of these rejected grafts was compatible with that observed in presensitized or hyperimmunized patients with severe humoral injury. Infiltrating cells were rare at day 2, and were therefore unlikely to contribute to the rejection processes, to any great extent. C4d staining outside PTC (peritubular capillaries) (glomeruli, vessels etc.) in humans is generally considered as nonspecific. In this model, complement deposition (C3c, C4d, and C5b–9) was restricted to the mesangium, tubules, and blood vessels. Only C3c staining was detected in PTC. C4d, the well-characterized molecule that stains PTC in humans, thus appears to be less specific in nonhuman primates.

Given the pivotal role of complement-fixing alloAb clearly described in this context of AAMR, the aim of this study was to test the effect of blocking classical complement pathway activation, with a view of associating this strategy with other anti-humoral therapies. Recently, Montgomery's group

successfully used an Ab (Eculizumab) directed against the complement protein C5 to treat severe AAMR.²³ rhC1INH is currently being studied in a phase III trial of hereditary angioedema, but to date has never been used in transplantation or autoimmunity. This molecule may offer the advantage of specifically blocking the classical activation pathway and leaving the alternative and lectin pathways intact so as to preserve antibacterial defense. As previously described,²¹ this molecule was very efficient *in vitro* at inhibiting induced alloAb cytotoxicity. The 6–8 h half-life of rhC1INH in baboons meant that we had to establish a protocol of three i.v. injections per day. Such a treatment schedule could only be envisioned in the context of a short-term treatment of a rejection crisis or during the induction phase. In this proof of concept study, we administered the drug for 5 days simply to test whether monotherapy using complement blockade would enable the preimmunized recipients to experience the same posttransplant course as nonimmunized recipients who reject after days 5–6. The plasma concentrations of C1-inhibitor reached in our model seemed to be efficient in preventing AAMR during the effective treatment phase. As expected, most of our treated animals rejected their grafts at day 6 or 7, with humoral rejection and a few signs of cellular injury. However, early graft biopsies at day 3, which was the time of rejection in

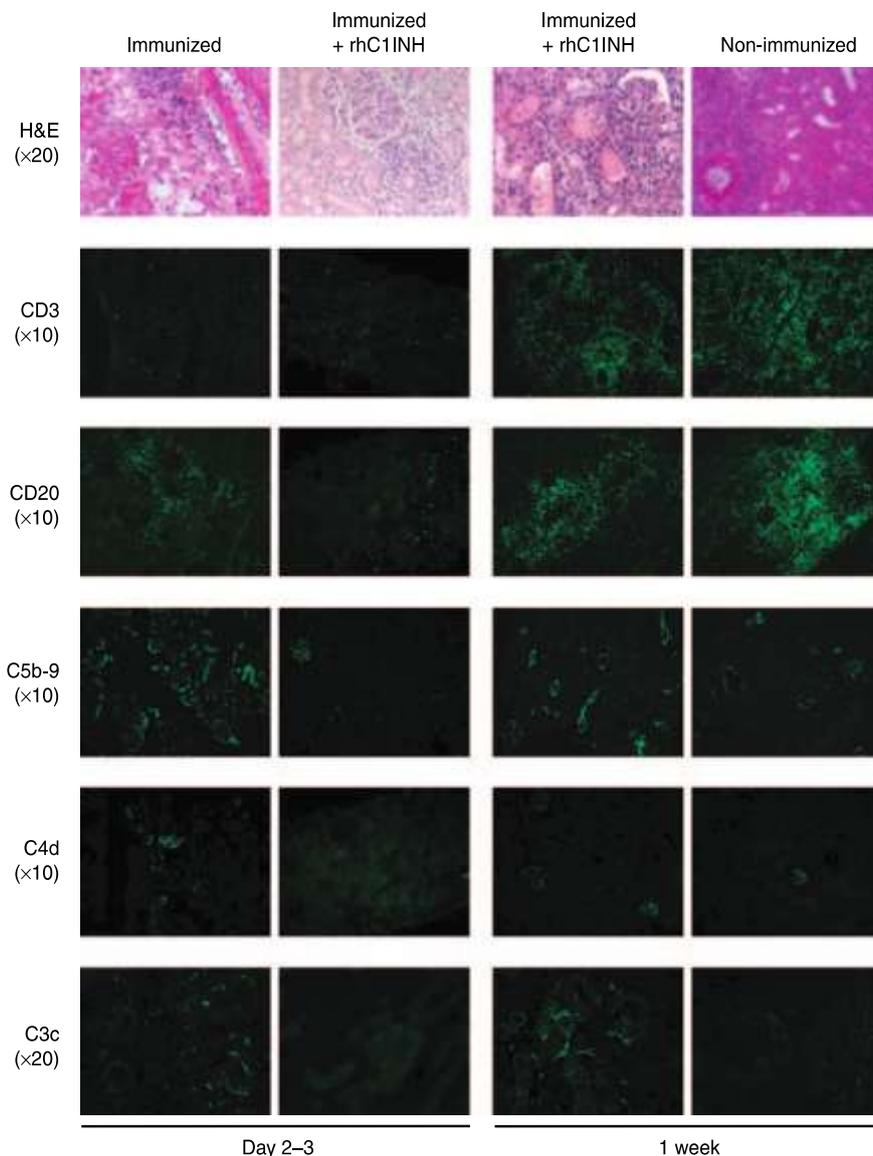


Figure 3 | Analysis of kidney allograft histology. Histology (hematoxylin and eosin staining) and immunostaining of infiltrating cells (CD3 and CD20) and complement deposition (C5b-9, C4d, and C3c) in kidney biopsies or grafts explanted from untreated nonimmunized recipients, untreated immunized recipients, and recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) (200 U/kg)-treated immunized recipients at early phase (days 2–3) or later point (1 week).

nontreated immunized animals, showed a very efficient inhibition of complement deposition within the graft under treatment. It is clear that a full curative strategy should associate T-cell and B-cell immunosuppression. This will be the object of our next *in vivo* studies in this model. In immunized, untreated, rejected animals, no activation of the classical pathway was noticed in peripheral blood, but was observed only locally inside grafts. On the other hand, we observed during the rhC1INH use that, as long as the molecule was circulating, classical pathway complement activation was efficiently inhibited in the serum. However, once the drug was no longer circulating, complement activity

returned to normal, suggesting that, according to the half-life of the molecule, a continuous perfusion could be considered for future experiments or clinical trials. C1-inhibitor has also been described as having a broad range of effects of potential interest in the context of transplantation, such as inhibition of T-cell activation, inhibition of leukocyte transmigration, inhibition of endothelial activation, and protection against ischemia–reperfusion damage (reviewed in Davis *et al.*²⁴). We therefore hypothesized that this broad range of additional effects could explain this late rejection at 14 days after transplantation, without any additional treatment, in one treated immunized recipient. However, in this model, we did

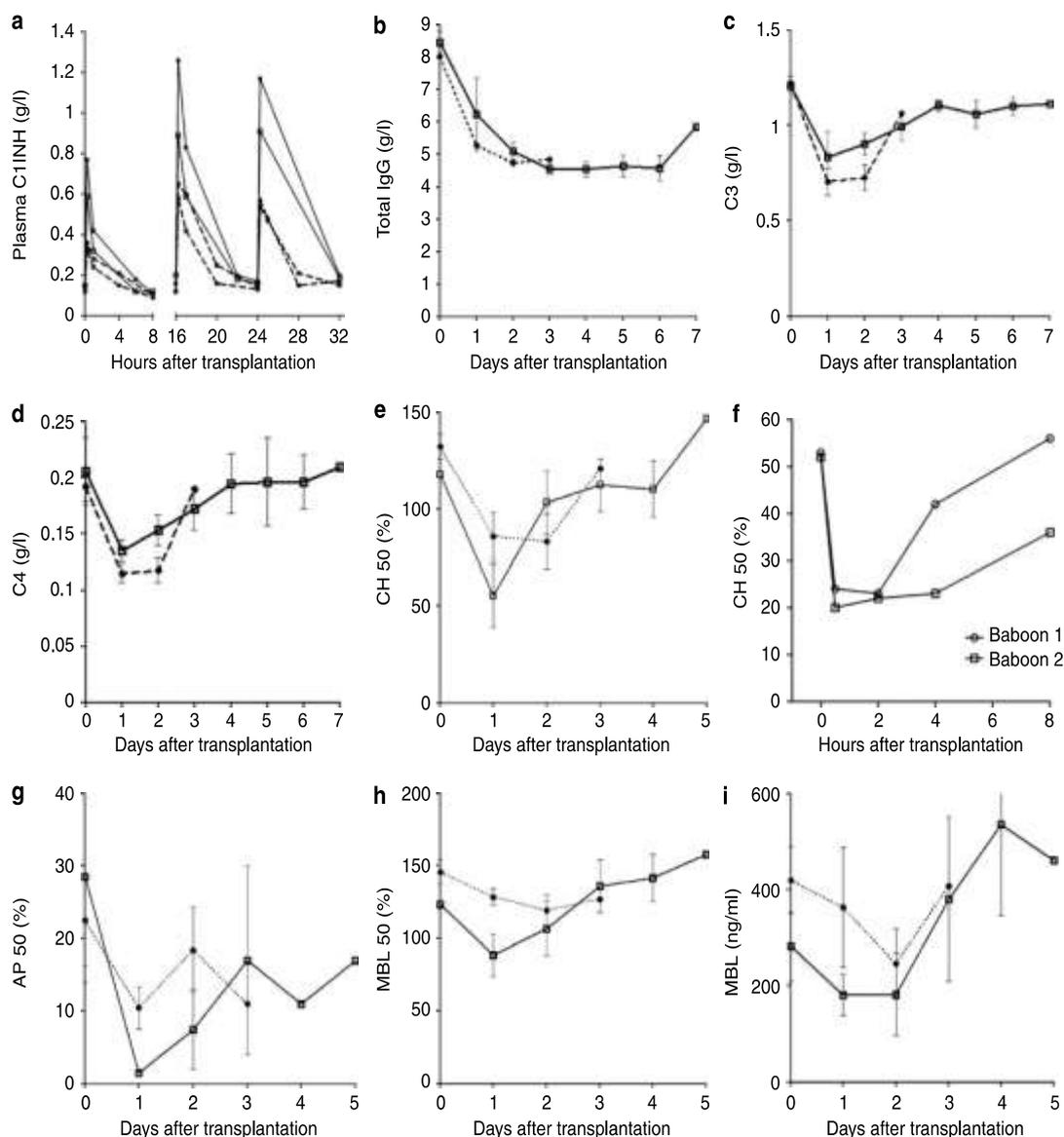


Figure 4 | Complement monitoring. (a) C1 inhibitor levels in immunized transplant recipients treated with recombinant human C1-inhibitor (rhC1INH) at 100 U/kg ($n=2$; dashed line) or 200 U/kg ($n=2$; solid line). (b) Total immunoglobulin G, (c) C3, and (d) C4 plasma level measurement after transplantation in immunized recipients without therapy ($n=4$; dotted line) or in those treated with rhC1INH ($n=4$; solid line). (e) The 50% complement hemolysis (CH50) analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay, (f) Functional CH50 kinetics analyzed during the first few hours after transplantation by sheep erythrocyte assay on two immunized recipients treated with 200 U/kg of rhC1INH, (g) the 50% alternate pathway (AP50), (h) the 50% mannose-binding lectin pathway (MBL 50) and (i) MBL plasma level measurement after transplantation in immunized recipients without therapy ($n=4$; dotted line) or in those treated with 100 U/kg of rhC1INH ($n=2$; solid line).

not observe any reduction in T-cell infiltration in other recipients and no effect was observed *in vitro* in T-cell activation and proliferation assays (data not shown). One important risk of any complement inhibiting strategy, especially in the context of additional immunosuppression, is a potentially increased susceptibility to infection. An interesting characteristic of C1-inhibitor is its protective role in sepsis through enhancement of bacterial uptake by and/or bactericidal capacity of phagocytes.²⁵ Moreover, we could

anticipate as well its use in Ab-mediated renal diseases such as lupus nephropathy or vasculitis.

In conclusion, we describe here a stringent preclinical model of AAMR in nonhuman primates that enabled us to study the mechanisms involved in the pathogenesis and to test a new strategy aimed at preventing or treating AAMR. In this study, we showed that early blockade of the classical complement pathway alone, using the rhC1INH molecule, could prevent AAMR in presensitized and hyperimmunized baboons. These

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

MATERIALS AND METHODS

Animals

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

Immunization protocol

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

Anti-donor Ab detection

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

Complement-mediated cytotoxicity assay

As previously described,²¹ donor PBMCs were stained with propidium iodide, after being incubated with recipient sera and rabbit complement, to be analyzed by FACS. To assess cytotoxic specificity, autologous and third-party cells were also tested. As previously described,²² to determine whether immunized animals developed anti-Class I alloAbs, positive recipient sera were incubated twice for 1 h at room temperature with 10×10^9 donor platelets and tested. In some experiments, the rabbit complement incubation step was performed in the presence of different concentrations of rhC1INH (0, 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, and 3 g/l).

Renal transplantation

Life-sustaining renal allotransplantation was performed as previously described.²² The 24-h diuresis as well as blood urea nitrogen were monitored daily. Transplantectomy was performed when plasma creatinine increased to 400 μM and/or absence of diuresis. Kidney graft biopsies were performed at day 3 posttransplantation in some immunized recipients treated with 200 U/kg of rhC1INH and surgical biopsies were performed in all animals before killing. One biopsy fragment was collected for hematoxylin and eosin histological examination and a second fragment was placed in Tissue Tek O.C.T. Compound (Miles, Tarrytown, NY, USA), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for immunohistochemical studies.

Histology and immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were cut into 4 μm -thick sections and stained with hematoxylin and eosin. All sections were examined by a pathologist in a blinded manner.

Immunostainings were performed on transplantectomy sections cut at a thickness of 10 μm and fixed in acetone. Sections were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-human CD3 (Dako, Glostrup, Denmark), mouse anti-human CD20 (clone L26, Dako), mouse anti-human C4d (Quidel, San Diego, CA, USA), mouse anti-human C5b-9 (clone aE11, Diatec, Oslo, Norway) or rabbit anti-human C3c (Dako). After washing, sections were incubated with either fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-mouse IgG (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) or fluorescein isothiocyanate-labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 90 min at room temperature. Sections were analyzed using a fluorescence microscope and Axion Vision software (Carl Zeiss, Le Pecq, France). All Abs used for staining were previously checked for crossreactivity on baboon counterpart.

Measurement of serum total IgG and complement monitoring

Total IgG level was evaluated by serum electrophoresis. Complement factors were measured in 1/20-diluted heparinized samples using rabbit antisera to human complement factors C1-inhibitor, C3, and C4 (Dade Behring, King of Prussia, PA, USA). Measurements were made by a Berhing Analyzer II machine using nephelometry at room temperature and after 4 h of incubation. Analysis of the classical (CH50), alternative (AP50), and mannose-binding lectin (MBL50) pathways of the complement system were determined by enzyme-linked immunosorbent assay as previously described.²⁶ Moreover, a functional kinetic analysis of CH50 was also performed during the first few hours after transplantation, as well as rhC1INH injection on two immunized recipients treated with 200 U/kg of rhC1INH, using a classical sheep erythrocyte assay dosing the released hemoglobin.

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martin Schata (Pharming Technologies BV) for supplying rhC1INH. This work was supported by a grant from the 'Agence de Biomédecine' (France) and the European Commission's Sixth Framework Programme, under the priority thematic area *Life Sciences, Genomics and Biotechnology for health*, contract no L5HB-CT-2006-037377, Xenome. This work was also funded by a grant from the 'Académie de Médecine' (France).

REFERENCES

- Racusen LC, Colvin RB, Solez K *et al.* Antibody-mediated rejection criteria – an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003; **3**: 708–714.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC *et al.* Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008; **8**: 753–760.
- Moll S, Pascual M. Humoral rejection of organ allografts. *Am J Transplant* 2005; **5**: 2611–2618.
- Lefaucheur C, Suberbielle-Boissel C, Hill GS *et al.* Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2008; **8**: 324–331.
- Wahrmann M, Exner M, Schillinger M *et al.* Pivotal role of complement-fixing HLA alloantibodies in presensitized kidney allograft recipients. *Am J Transplant* 2006; **6**: 1033–1041.
- Gloor J, Cosio F, Lager DJ *et al.* The spectrum of antibody-mediated renal allograft injury: implications for treatment. *Am J Transplant* 2008; **8**: 1367–1373.
- Becker YT, Becker BN, Pirsch JD *et al.* Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 2004; **4**: 996–1001.
- Locke JE, Zachary AA, Haas M *et al.* The utility of splenectomy as rescue treatment for severe acute antibody mediated rejection. *Am J Transplant* 2007; **7**: 842–846.
- Watanabe J, Scornik JC. IVIG and HLA antibodies. Evidence for inhibition of complement activation but not for anti-idiotypic activity. *Am J Transplant* 2005; **5**: 2786–2790.
- Platt JL, Saadi S. The role of complement in transplantation. *Mol Immunol* 1999; **36**: 965–971.
- Pruitt SK, Bollinger RR, Collins BH *et al.* Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts. *Transplantation* 1997; **63**: 900–902.
- Wang H, Rollins SA, Gao Z *et al.* Complement inhibition with an anti-C5 monoclonal antibody prevents hyperacute rejection in a xenograft heart transplantation model. *Transplantation* 1999; **68**: 1643–1651.
- Locke JE, Magro CM, Singer AL *et al.* The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009; **9**: 231–235.
- Leventhal JR, Dalmaso AP, Cromwell JW *et al.* Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; **55**: 857–865.
- Adams DH, Kadner A, Chen RH *et al.* Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates. *Xenotransplantation* 2001; **8**: 36–40.
- Lin SS, Weidner BC, Byrne GW *et al.* The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants. *J Clin Invest* 1998; **101**: 1745–1756.
- Kirschfink M. C1-inhibitor and transplantation. *Immunobiology* 2002; **205**: 534–541.
- Hecker JM, Lorenz R, Appiah R *et al.* C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation. *Transplantation* 2002; **73**: 688–694.
- Koles K, van Berkel PHC, Pieper FR *et al.* N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* 2004; **14**: 51–64.
- Longhurst H. Rhucin, a recombinant C1 inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and cerebral ischemia. *Curr Opin Investig Drugs* 2008; **9**: 310–323.
- Poirier N, Blancho G. Recombinant human C1-inhibitor inhibits cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies. *Transplant Proc* 2008; **40**: 581–583.
- Poirier N, Maillet F, Barussaud M *et al.* Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs. *J Surg Res* 2007; **139**: 261–268.
- Locke JE, Magro CM, Singer AL *et al.* The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2009; **9**: 231–235.
- Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* 2008; **45**: 4057–4063.
- Liu D, Lu F, Qin G *et al.* C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol* 2007; **179**: 3966–3972.
- Seelen MA, Roos A, Wieslander J *et al.* Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* 2005; **296**: 187–198.

1.3 Résultats complémentaires

1.3.1 Appariement des animaux

Afin d'optimiser l'alloimmunisation des animaux, il a été décidé d'utiliser deux méthodes différentes : D'une part un typage HLA par PCR permettant de détecter les animaux ayant les mêmes haplotypes (frères ou cousins) (données non disponibles), et d'autre part une culture mixte lymphocytaire (figure 9) permettant de s'assurer de la prolifération lymphocytaire du receveur potentiel contre les cellules du donneur. Les couples de donneur-receveurs ont été appariés en fonction de leur groupe sanguin (chez le babouin : A ou B, pas de O), et de leur groupe HLA effectué par PCR (génotypage réalisé par BPRC, Rijswijk, Pays Bas).

L'établissement de ces couples a été entériné par la réalisation de culture mixte lymphocytaire: Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont tout d'abord extraites par gradient de densité. Elles sont ensuite remises en suspension dans un milieu de culture dit « complet » : RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, UK), 1% d'une préparation de pénicilline-streptomycine, 1% de glutamine, 10 % de SVF décomplémenté, 1% d'HEPES, 1% de pyruvate de sodium et 1 % d'acides aminés non essentiels. Les cellules stimulatrices sont irradiées à une dose de 35 Gray délivrés en 319 secondes à la dose de 6,58 Grays/min (Etablissement Français du Sang, Nantes) afin d'inhiber toute capacité de prolifération sans altérer leur capacité de présentation. Dans une plaque à fond rond de 96 puits (Nunc Brand Products), 10^5 cellules répondeuses de l'éventuel receveur sont déposées en triplicats à raison de 100 μ L/puits en co-culture avec 10^5 cellules stimulatrices irradiées de l'éventuel donneur également à raison de 100 μ L/puits. Des témoins positifs sont utilisés en ajoutant aux cellules répondeuses seules de la concanavaline A à 10 μ g/mL (ConA : lectine stimulatrice non spécifique des lymphocytes). Les témoins négatifs sont composés de cellules répondeuses ou stimulatrices seules dans du milieu.

Les plaques sont ensuite incubées à 37°C pendant 5 jours dans un incubateur où l'air humidifié contient 5% de CO₂. La prolifération des cellules répondeuses est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée (³H-Td) dans l'ADN. Pour cela, 8 heures auparavant, la ³H-Td est ajoutée à 1 μ Ci/puits. Les cellules sont recueillies sur une plaque filtre cellulaire Unifilter (PerkinElmer, Boston, USA) et la radioactivité incorporée mesurée avec un

compteur à scintillation (Top count, Packard). Les résultats sont exprimés en moyenne des coups par minutes (CPM) +/- écart type.

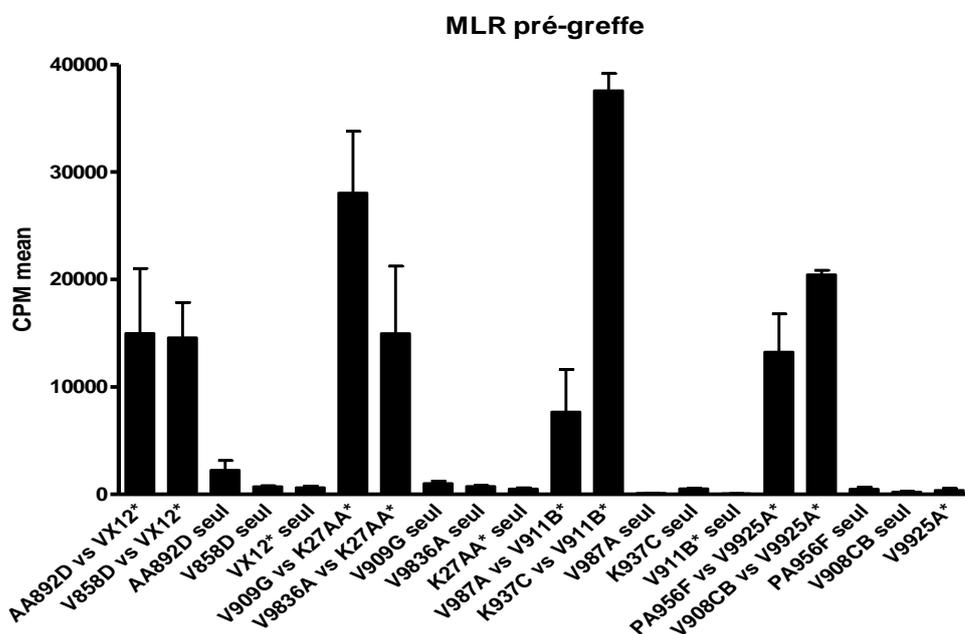


Figure 9 : Résultats des cultures mixtes lymphocytaires pour chaque choix donneur-receveur

Ces deux méthodes semblent efficaces pour appairer les animaux puisque 100% des babouins se sont alloimmunisés.

1.3.2 Pharmacocinétiques du rhC1 inhibiteur

Les données pharmacocinétique connues chez l'homme ont été confirmées chez le babouin. La demi vie est d'environ 3 à 4 heures avec un retour au taux physiologique de C1inh (0,121 à 0,172 g/L) après huit heures. L'injection continue à la seringue électrique n'a pas permis d'élever le taux de C1inh au delà du taux physiologique. (Figure 10)

Après plusieurs essais de différents modes d'administration, la stratégie thérapeutique a donc été une injection de 100 U/Kg toutes les 8 heures.

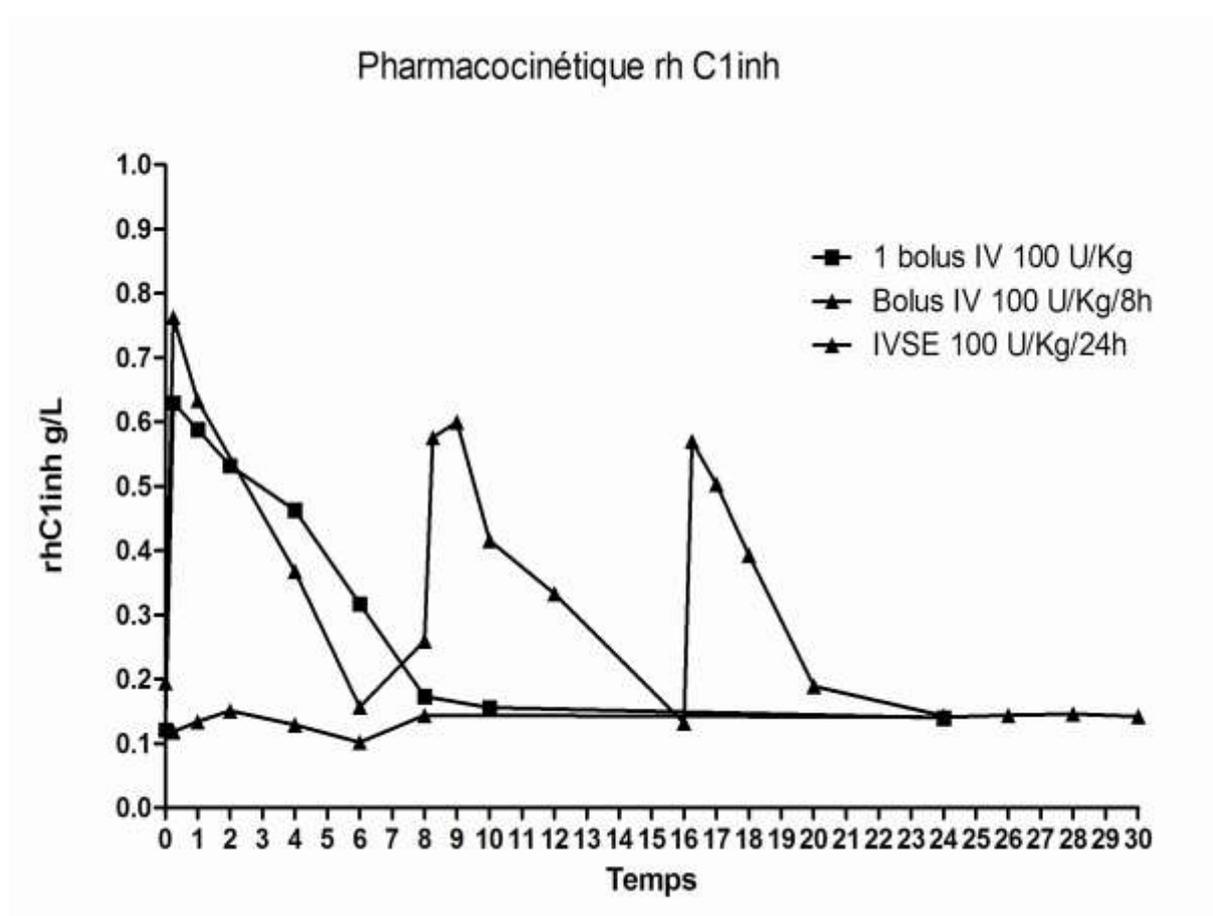


Figure 10 : Pharmacocinétique du rhC1inh chez le babouin.

1.4 Discussion et perspective

L'augmentation prévisible des rejets vasculaires aigus à médiation humorale (AAMR : Acute Antibody Mediated Rejection), corrélée à des traitements de ces rejets qui restent peu efficaces, justifie la nécessité de développer un modèle pertinent préclinique pour étudier les mécanismes impliqués dans cette pathologie et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette étude, nous décrivons un modèle primate de rejet aigu à médiation humorale qui se rapproche des rejets suraigus décrit chez les patients immunisés, ABO-incompatibles et en xénotransplantation. En outre, nous démontrons que le blocage rapide de la voie classique du complément, par le biais du rhC1INH, est efficace pour ralentir cette forme de rejet. Selon une précédente étude de notre équipe chez les porcs (Poirier and Blancho 2008), deux injections intradermiques de cellules mononuclées du donneur étaient suffisantes pour immuniser tous les receveurs avant la transplantation.

Il a été décidé d'immuniser les receveurs avec des PBMC, car ces cellules sont faciles d'accès (prélèvements d'une quantité raisonnable de sang veineux : 10 mL/Kg maximum) et ce sont les cellules utilisées pour étudier les capacités de prolifération. Dans une étude préliminaire de notre laboratoire (Poirier, Maillet et al. 2007), l'injection de PBMC s'était avérée aussi efficace qu'une greffe de peau (Rother, Arp et al. 2008), plus compliquée et dont les aspects rejet ou nécrose sont toujours difficiles à clarifier. Puisque la voie d'administration dicte la localisation du contact de l'antigène avec les cellules immunocompétentes, lors d'une immunisation par voie intra-dermique (mais également en sous-cutanée ou intra-musculaire) l'antigène est emporté vers les ganglions lymphatiques régionaux de drainage, alors que lors d'une immunisation par voie intra-veineuse, ou intra-péritonéale chez les petits rongeurs, l'organe lymphoïde sollicité est surtout la rate. La voie intra-veineuse étant moins immunogène, nous avons opté pour l'injection intra-dermique qui s'est révélée appropriée. En effet la présence de cellules présentatrices d'antigène dans l'épiderme conduit à une alloimmunisation par les voies directes et indirectes. Enfin, nous avons choisi 2 injections à 15 jours d'intervalle, pour accroître la spécificité et l'importance de la réponse immunitaire.

Pour assurer un modèle rigoureux et reproductible de l'AAMR, nous avons préféré effectuer la transplantation à cross-match positif, lorsque les anticorps antidonneur atteignent leur plateau. Tous les animaux immunisés ont développé des anticorps anti-donneur spécifiques (IgG), dirigés contre des molécules du CMH de classe I qui sont cytotoxiques en présence de complément. Par ailleurs, tous nos animaux immunisés ont développé une

réponse d'isotype IgG. Ceci correspond bien aux données de la littérature. Lors de la première rencontre avec un antigène, une réponse humorale se met en place avec une production d'immunoglobulines d'isotype IgM. Avec la deuxième confrontation avec le même antigène, la réponse va être amplifiée, avec notamment une production d'anticorps changeant d'isotype (commutation de classe) et de plus haute affinité (hypermutation somatique). Les anticorps (IgG) anti-donneur apparaissent à partir du 14^{ième} jour, atteignent un plateau maximal vers le 35^{ième} ou 42^{ième} jour et commencent à décroître pour certains après le 49^{ième} jour post-injection. L'hétérogénéité du délai de formation des alloanticorps n'a pas trouvé de réponse dans la littérature. La seule hypothèse est peut être un manque de reproductibilité de l'injection intradermique de cellules mononuclées.

Ce procédé a conduit à des rejets accélérés de l'organe du donneur, dans les 48-72h, par opposition à une semaine pour les babouins receveurs non traités non-immunisés. Sur les pièces de transplantectomie, les reins rejetés présentaient un oedème, des infiltrations hémorragiques, sans signes évidents de CIVD. L'histologie de ces greffons rejetés était compatible avec celle observée chez les patients présensibilisés ou hyperimmunisés. L'infiltration cellulaire étant peu probable au deuxième jour, elle ne peut contribuer aux processus de rejet. Une fixation C4d en dehors des capillaires peritubulaires est généralement considérée comme peu spécifique. Dans ce modèle, les dépôts des produits de dégradation du complément (C3c, C4d et C5b-9) étaient limités au mésangium, aux tubules et à l'endothélium capillaire. Seuls des dépôts de C3c ont été constatés en immunohistochimie au niveau des capillaires peritubulaires. La spécificité des dépôts de C4d, critère diagnostique du rejet à médiation humorale chez l'homme, semble moins évidente chez le primate non humain. Étant donné le rôle central de l'activation du complément dans les lésions tissulaires du rejet aigu à médiation humorale, l'étude du blocage de la voie classique du complément semblait une voie thérapeutique intéressante, avec pour objectif d'associer d'autres thérapies anti-humorales. Montgomery (Locke, Magro et al. 2009) a utilisé avec succès un anticorps dirigé contre la protéine C5 du complément (eculizumab) pour traiter des rejets aigus à médiation humorale.

Le rhC1INH est actuellement étudié dans un essai de phase III dans le traitement de l'angioedème héréditaire, mais à ce jour n'a jamais été utilisé en transplantation. Cette molécule peut présenter l'avantage de bloquer spécifiquement la voie d'activation classique et en épargnant la voie alterne et la voie des lectines afin de préserver les mécanismes antibactériens. Comme décrit précédemment, cette molécule a été très efficace *in vitro* pour inhiber la cytotoxicité induite par les alloanticorps (Poirier and Blanche 2008). Des études

pharmacocinétiques chez le babouin ont été préalablement conduites pour optimiser l'administration du rhC1inh. La concentration physiologique de base du C1 inh se situe autour de 125 mg/L, et le pic de concentration après injection de 100 U/Kg de rhC1inh atteint environ 700 mg/L soit 5,6 fois le taux physiologique. Ensuite un taux deux fois supérieur à la normale se maintient pendant environ 6 à 7 heures pour revenir au taux physiologique après 8 heures. Il n'existe pas encore dans la littérature de cible thérapeutique permettant une inhibition optimale du complément. Cette question reste à résoudre. Toutefois, la dose de 100 U/Kg toutes les 8 heures semble être la dose minimale à respecter. Les 6-8 heures de demi-vie du rhC1INH chez les babouins signifiaient que nous devions mettre en place un protocole de 3 injections intra veineuses par jour minimum. Une telle posologie est difficilement envisageable en pratique clinique mais le but de l'étude était de traiter les receveurs immunisés pendant les 5 jours suivant la transplantation pour démontrer l'efficacité du blocage du complément pour prévenir le rejet humoral. Les concentrations plasmatiques de C1-inhibiteur atteintes dans notre modèle semblent avoir été efficaces dans la prévention de l'AAMR pendant la phase de traitement. Comme prévu, la plupart de nos animaux traités a rejeté leurs greffons au jour 6 ou 7, avec rejet humoral et quelques signes de lésions cellulaires. Cependant, l'analyse des biopsies du greffon à 3 jours, délai de rejet des animaux non traités, a montré une inhibition très efficace de dépôts de complément au sein des greffons sous traitement. Il est clair qu'une stratégie curative complète devrait associer une immunosuppression des lymphocytes T et B. Nous avons observé lors de l'utilisation du rhC1INH que, aussi longtemps que la molécule était en circulation, l'activation de la voie classique du complément était inhibée efficacement dans le sérum. Cependant, une fois le traitement suspendu, l'activité du complément est revenue à la normale, ce qui suggère que, conformément à la demi-vie de la molécule, une perfusion continue pourrait être envisagée pour de futures expériences ou des essais cliniques. Le C1-inhibiteur a également été décrit comme ayant une vaste gamme d'effets d'intérêt potentiel dans le contexte de la transplantation, comme l'inhibition de l'activation des lymphocytes T (Eriksson and Sjogren 1995; Nissen, Bregenholt et al. 1998), l'inhibition de la transmigration des leucocytes, l'inhibition de l'activation endothéliale (Zhang, Qin et al. 2007), et la protection contre les dommages de l'ischémie-reperfusion (Arumugam, Magnus et al. 2006). Cela pourrait expliquer la survie prolongé de 14 jours d'un animal immunisé et ce sans aucun autre traitement immunosuppresseur.

Un risque important de toute stratégie visant l'inhibition du complément, en particulier dans un contexte d'immunosuppression supplémentaire, est une susceptibilité potentiellement

accrue aux infections bactériennes qui dépendent des voies alternes et des lectines. Toutefois Une caractéristique intéressante de C1-inhibiteur est son rôle protecteur en cas de sepsis (Liu, Lu et al. 2007) grâce à l'amélioration de la phagocytose des bactéries et / ou la capacité bactéricide des phagocytes. En outre, nous pourrions envisager son utilisation pour traiter des pathologies rénales secondaires à des dépôts d'anticorps telles que la néphropathie lupique ou certaines vascularites.

Ce modèle de rejet aigu à médiation humorale chez le primate non humain possède un grand potentiel et pourrait permettre, notamment, d'étudier l'action des inhibiteurs du protéasome. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, leur utilisation relève de l'empirisme, servant de traitement de « sauvetage » lorsque les thérapeutiques classiques du RVA sont un échec.

Les projets suivants seront donc de poursuivre l'étude de ce modèle en associant le rhC1INH et un inhibiteur du protéasome que ce soit en traitement préventif du rejet aigu en gardant le concept de greffe à cross match positif, ou en traitement de l'épisode de rejet, après avoir attendu la décroissance des anticorps anti donneur.

2. Projet 2

2.1 Objectifs

Après les progrès spectaculaires observés dans les années 1990 avec la production de porcs transgéniques pour des protéines régulatrices du complément permettant de franchir la barrière du rejet suraigu, la xénotransplantation a connu une autre évolution majeure avec la nouvelle génération de porcs Gal KO. Les résultats obtenus en allotransplantation lors de l'étude précédente, nous ont conduit à explorer le traitement du rejet à médiation humorale par l'inhibition du complément dans un modèle de xénotransplantation.

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle de transplantation de rein porcin chez le babouin. Les porcs portaient à la fois la modification génétique, Gal-KO et étaient transgéniques pour hCD55, hCD59, hCD39, et la fucosyltransférase humaine. L'objectif a été de franchir l'obstacle du rejet aigu à médiation humorale en inhibant le complément et en utilisant des inhibiteurs du protéasome pour bloquer la lignée B et les plasmocytes.

2.2 Article 2

Xénotransplantation de reins de porcs Gal KO, transgénique CD55, CD59, CD39 et Fucosyl Transférase chez le babouin

S. Le Bas-Bernardet^a, X. Tillou^a, N. Poirier^a, N. Dilek^a, M. Chatelais^a, J. Devallière^a, B. Charreau^a, D. Minault^a, J. Hervouet^a, K. Renaudin^b, C. Crossan^c, L. Scobie^c, P.J. Cowan^d, A.J.F. d'Apice^d, C. Galli^e, E. Cozzi^f, J.P. Soulillou^a, B. Vanhove^a, G. Blanco^a,
Transplant Proc. 2011 Nov; 43 :3426-30.

Article paru dans Transplantation Proceedings en Novembre 2011



Xenotransplantation of Galactosyl-Transferase Knockout, CD55, CD59, CD39, and Fucosyl-Transferase Transgenic Pig Kidneys Into Baboons

S. Le Bas-Bernardet, X. Tillou, N. Poirier, N. Dilek, M. Chatelais, J. Devallière, B. Charreau, D. Minault, J. Hervouet, K. Renaudin, C. Crossan, L. Scobie, P.J. Cowan, A.J.F. d'Apice, C. Galli, E. Cozzi, J.P. Souillou, B. Vanhove, and G. Blancho

ABSTRACT

Galactosyl-transferase knockout (GT-KO) pigs represent the latest major progress to reduce immune reactions in xenotransplantation. However, their organs are still subject to rapid humoral rejection involving complement activation requiring the ongoing development of further genetic modifications in the pig. In a pig-to-baboon renal transplantation setting, we have used donor pigs that are not only GT-KO, but also transgenic for human CD55 (hCD55), hCD59, hCD39, and fucosyl-transferase (hHT). We studied kidney xenograft survival, physiological and immunologic parameters, xenogeneic rejection characteristics, as well as viral transmission aspects among two groups of baboons: control animals ($n = 2$), versus those ($n = 4$) treated with a cocktail of cyclophosphamide, tacrolimus, mycophenolate mofetil, steroids, and a recombinant human C1 inhibitor. Whereas control animals showed clear acute humoral rejection at around day 4, the treated animals showed moderately improved graft survival with rejection at around 2 weeks posttransplantation. Biopsies showed signs of acute vascular rejection (interstitial hemorrhage, glomerular thrombi, and acute tubular necrosis) as well as immunoglobulin (IgM) and complement deposition in the glomerular and peritubular capillaries. The low level of preformed non-Gal- α 1.3Gal IgM detected prior to transplantation increased at 6 days posttransplantation, whereas induced IgG appeared after day 6. No porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission was detected in any transplanted baboon. Thus, surprisingly, organs from the GT-KO, hCD55, hCD59, hCD39, and hHT transgenic donors did not appear to convey significant protection against baboon anti-pig antibodies and complement activation, which obviously continue to be significant factors under a suboptimal immunosuppression regimen. The association, timing, and doses of immunosuppressive drugs remain critical. They will have to be optimized to achieve longer graft survivals.

AFTER INITIAL SPECTACULAR PROGRESS in the 1990s with the generation of pigs transgenic for complement regulatory proteins (CRP) leading to significant

prevention of hyperacute rejection (HAR), xenotransplantation has seen another major progression with the generation of pigs lacking expression of the major xenoantigen

From the Institut de Transplantation-Urologie-Néphrologie, ITUN and INSERM UMR643 (S.L.B.-B., X.T., N.P., N.D., M.C., J.D., B.C., D.M., J.H., J.P.S., B.V., G.B.) Nantes, France; Pathology Laboratory (K.R.), CHU-Hôtel Dieu, Nantes, France; the Department of Biological and Biomedical Sciences, Glasgow Caledonian University (C.C., L.S.), Glasgow, UK; Immunology Research Centre, St Vincent's Hospital (P.J.C., A.J.F.d'A.), Victoria, Australia; The Laboratorio di Tecnologia della Riproduzione, LTR (C.G.), Cremona, Italy; and the Consorzio per la Ricerca sul Trapianto d'Organi, CORIT (E.C.), Padua, Italy.

This work was supported by the European Commission's Sixth Framework Programme, under the priority thematic area Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health, contract No. LSHB-CT-2006-037377, XENOME.

Address reprint requests to Pr Gilles Blancho, ITUN-INSERM UMR 643, CHU-Hôtel Dieu, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail: gilles.blancho@chu-nantes.fr. S.L.B.-B., M.C., J.D., B.C., C.C., L.S., C.G., E.C., J.P.S., and G.B. are members of the European Consortium Xenome (No. LSHB-CT-2006-037377).

0041-1345/11/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2011.09.024

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Table 1. Animal Survival and Survival Outcome

Group	Animal	Treatment	Splenectomy	Diagnosis	Survival (d)
Control	V9910C	No	Yes	AXHR	4
Control	V857I	No	Yes	AXHR	3
Treated	V893AA	Yes	No	AXHR	15
Treated	PA956E	Yes	No	AXHR	13
Treated	V907J	Yes	Yes	AXHR	12
Treated	PA936H	Yes	Yes	Technical failure	4

AXHR, acute xenogeneic humoral rejection.

Gal α 1.3 Gal (Gal), against which humans and Old World primates have natural xenoantibodies (anti-Gal Ab).¹⁻⁴ The first use of pigs knocked out (KO) for the enzyme galactosyl-transferase (GT; GT-KO) was in pig-to-primate heart⁵ and kidney^{6,7} xenotransplantation. Heart survivals were prolonged from 2 to 6 months with graft loss associated with predominant thrombotic microangiopathy.⁵ Kidney xenotransplant survival was still limited to between 16⁷ and 30 days⁶ with evidence of cellular and humoral rejection in both studies. However, when the thymokidney strategy was applied to GT-KO pig-to-primate kidney xenotransplantation, graft survivals were prolonged to 83 days without evidence of rejection.⁶

In this study, we have transplanted into baboons kidneys from pigs bearing both genetic modification, GT-KO and transgenic for hCD55, hCD59, hCD39, human fucosyl-transferase,^{4,8} to study graft survival, immunologic responses, and viral transmission.

METHODS

Animals and Treatment

Genetically modified pigs (*Sus scrofa*), which were GT-KO and transgenic for hCD55, hCD59, hCD39, and hHT and generated by Cowan *et al.*^{4,8} were used as donors for heterotopic kidney xenotransplantation into baboons (*Papio anubis*). A control group constituted of untreated baboons ($n = 2$). To keep these animals alive after rejection to study their anti-pig immunization, one autologous kidney was removed at the time of surgery, whereas the other one was kept with a clamped ureter (under a powerful analgesia) to be declamped after rejection and graft removal. The experimental group constituted of treated ($n = 2$) and treated plus splenectomized baboons ($n = 2$; Table 1). Both subgroups received the same treatment with recombinant human C1 inhibitor (rhC1INH) kindly provided by Pharming (Netherlands) at 200 U/kg every 8 hours for 5 days, Cyclophosphamide (40 mg/kg on days -1 and 0, 20 mg/kg at day 2, and 10 mg/kg at day 4), mycophenolate mofetil (70 mg/kg/d), tacrolimus (0.2 mg/kg/d) for a trough level target >20 ng/mL, and steroids (1 mg/kg/d for the entire duration). At rejection, grafts were removed for histological analysis and recipients were euthanized. All operations were performed under general anesthesia. This protocol was approved by the regional ethical committee (governmental organization).

Histological Analyses

Paraffin-embedded tissues cut into 4-mm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin. All sections were examined by

a pathologist in a blinded manner. Immunostainings were performed on transplantectomy sections cut at a thickness of 10 mm and fixed in acetone. Sections were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal anti-human immunoglobulin (IgM) (AbD Serotec, United Kingdom), rabbit anti-human CD3 (Dako, Glostrup, Denmark), mouse anti-CD4 (13B8.2, Beckman Coulter, Fullerton, Calif, USA), mouse anti-CD8 (B9.11, Beckman Coulter), mouse anti-human CD20 (L26, Dako), mouse anti-CD11b (BEAR1, Beckman Coulter), mouse anti-CD68 (KP1, Dako), mouse anti-human C4d (Quidel, San Diego, Calif, USA), mouse anti-human C5b-9 (clone aE11, Diatec, Oslo, Norway), and rabbit anti-human C3c (Dako). After washing, sections were incubated with either Alexa568-labeled goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA) or fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa, USA) for 90 minutes at room temperature (RT). Sections were analyzed using fluorescence microscopy with Axion Vision software (Carl Zeiss, Le Pecq, France). All antibodies used for staining had been previously checked for cross-reactivity on the baboon counterpart.

Serum Reactivity and Cytotoxicity

Recipient sera were harvested at days 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, and 35 as well as monthly thereafter. Serum reactivity was assessed by a flow cytometry crossmatch using porcine aortic endothelial cells (PAEC) isolated from donor aorta as previously described.⁹ Briefly, heat-inactivated sera were incubated for 30 minutes at RT with 1 to 2 $\times 10^5$ PAEC. After washing twice with cold FACS buffer, the PAEC were incubated separately for 30 minutes at 4°C with rabbit polyclonal anti-human IgM (AbD Serotec, Oxford, UK) or polyclonal rabbit anti-human IgG conjugated to FITC (AbD Serotec). The anti-pig IgM was revealed using donkey anti-rabbit IgG conjugated to FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pa, USA). Washed cells were resuspended in FACS buffer for analysis using a Canto-II Flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, Calif, USA) with DIVA (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree stars, Ashland, Ore, USA).

Cytotoxicity of baboon serum was measured by a flow cytometry complement-mediated cytotoxicity assay. Briefly, heat-inactivated sera were incubated for 30 minutes at 4°C with 1 to 2 $\times 10^5$ PAEC. After the cells had been washed twice in FACS buffer, they were incubated for 30 minutes at 37°C with 1:3 diluted rabbit complement. Then, the cells were washed and propidium iodide added to detect dead cells. Cells were washed and resuspended in FACS buffer for analysis using a Canto-II Flow cytometer with DIVA and FlowJo software.

Porcine Endogenous Retrovirus Detection

Serum samples were obtained from control animals prexeno-graft as well as at day 41 and at month 3 (euthanasia). Serum samples were taken from treated animals prexeno-graft and at euthanasia. Viral RNA (vRNA) was extracted from baboon serum using the QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Crawley, UK). The presence of PERV RNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction amplification using primers corresponding to a region in the PERV pol gene and a method modified from that described by Paradis *et al.*¹⁰ To determine whether organ recipients showed microchimerism, we first isolated DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) preparations of recipient blood using the Blood and Cell Culture DNA mini kit (Qiagen, Crawley, UK). The DNA was then tested for the presence of porcine centromeric DNA and PERV as described previously.¹⁰

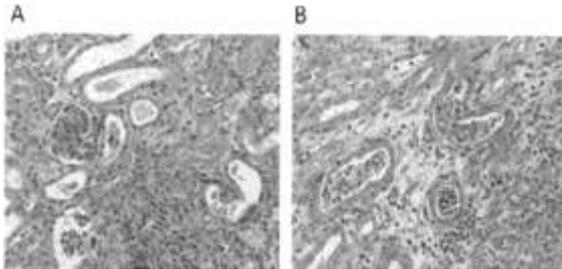


Fig 1. Histological analyses. (A) Control group, (B) treated group.

RESULTS

Survival

Whereas control animals showed acute humoral xenograft rejections (AHXR) at days 3 and 4, treated recipients demonstrated only moderate graft prolongation, rejecting their grafts at days 12, 13, and 15 (except for animal PA936H that was stopped at day 4 due to a technical failure; Table 1).

Histological Analysis

At the time of acute renal failure, grafts were removed when the macroscopic aspects of the kidney (data not shown) showed an acute vascular rejection. In fact, biopsies at rejection in control (Fig 1A) as well as in treated animals (Fig 1B) showed characteristic signs of AHXR: focal hemorrhages, some areas of tubular necrosis, glomerular thrombi, a moderate mainly macrophagic cellular infiltration, some ischemic glomerulitis, capillaritis with granulocytes, interstitial edema, and finally no obvious lesions of medium size arteries. Immunohistochemistry showed IgM and complement (C3c, C4d, and C5b-9) deposition in glomerular and peritubular capillaries (Fig 2), suggesting that the CRP transgenes protected the grafts for only a

limited time. Regarding cellular infiltration (data not shown), immunostaining in control and in treated recipients showed massive T-cell infiltration only in control animals, but restricted B-cell infiltrates in perivascular areas in both groups with a strong macrophagic perivascular infiltrates.

Serum Reactivity and Cytotoxicity

Serum reactivity measurement showed interindividual variability in preformed anti-pig IgM (Fig 3A and 3C). In both control and treated recipients circulating IgM decreased dramatically at day 3 suggesting trapping in the graft. Thereafter, circulating IgM increased from day 6 rising to a maximum at the time of rejection (around 2 weeks) in treated animals (Fig 3C) and at day 21 in controls (Fig 3A). No preformed anti-pig IgG was detectable (Fig 3B and 3D). IgG were induced after day 6, except in the splenectomized baboon (V907J), who presented with a low IgG level until rejection (Fig 3D). Control and treated (but not splenectomized) animals showed IgG to reach maximum values at day 28 (Fig 3B) and at rejection (days 13 and 15), respectively (Fig 3D).

FCCA of control sera showed increasing complement-dependent cytotoxicity (CDC) that correlated with the immunization (Fig 4). CDC on day 0 serum reached 30% of GT-KO PAEC lysis, showing preformed cytotoxic anti-pig IgM. These data suggested that epitopes other than Gal α -1,3 Gal expressed by PAEC were targets of preformed as well as elicited xenoantibodies (xenoAb) and hCD55 transgenic expression conferred only limited protection to the xenograft.

PERV Detection

Of the non-human primates (NHP) that received porcine kidney xenotransplants ($n = 4$), PA936H was not tested for PERV as death was due to technical failure. The three animals, V907J, PA956E, and V893AA, all exhibited mi-

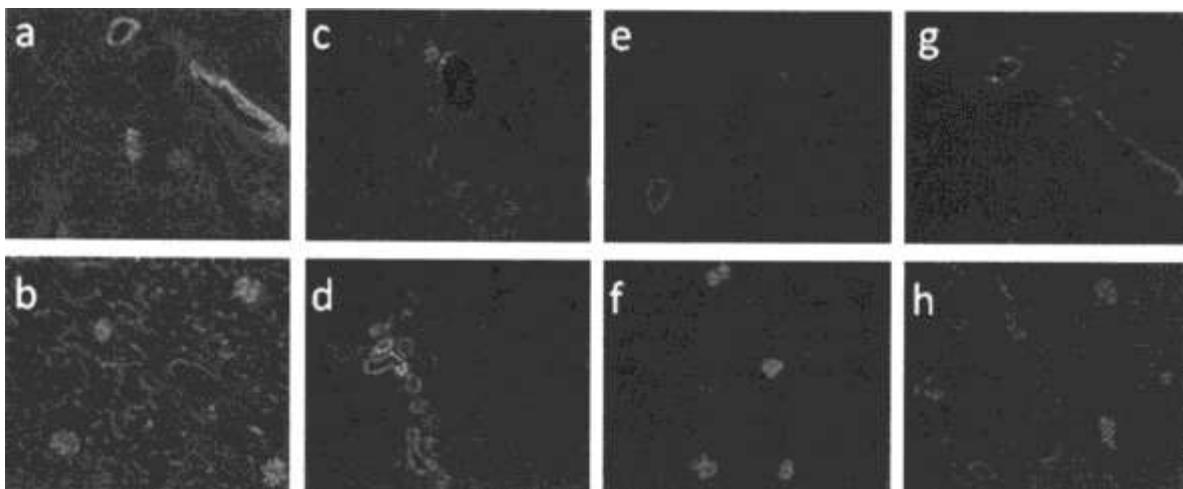


Fig 2. Immunohistochemistry analyses. Immunoglobulin M (a, b), C3c (c, d), C4d (e, f) and C5b-9 (g, h) staining were performed in frozen porcine kidney biopsies from control (a, c, e, g) and treated baboons (b, d, f, h).

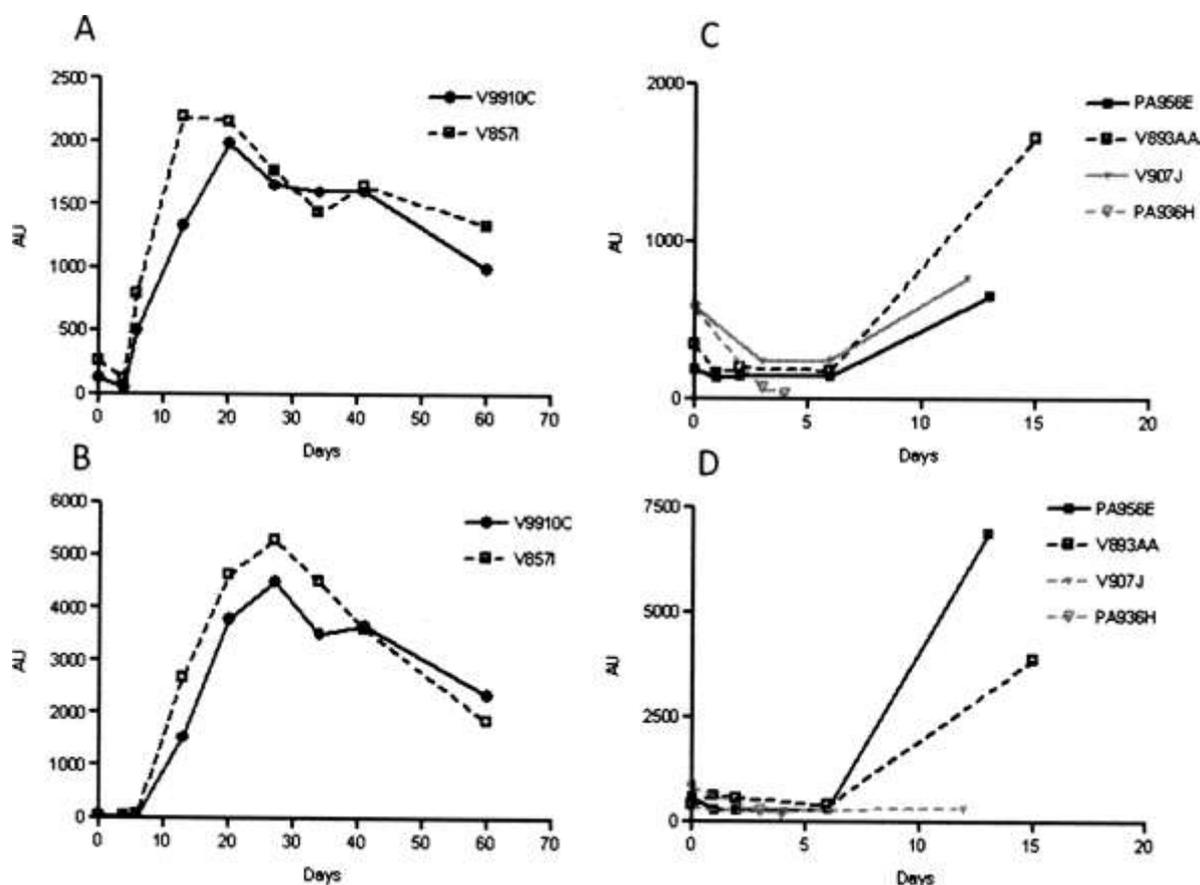


Fig 3. Serum reactivity was assessed by endothelial crossmatch in flow cytometry and expressed in arbitrary unit (percentage of positive cells \times median fluorescence intensity). (A) Immunoglobulin (IgM) and (B) IgG serum reactivity of control group ($n = 2$); (C) IgM and (D) IgG serum reactivity of treated group ($n = 4$).

crochimerism at euthanasia (up to day 15 postxenograft). V907J was also positive for PERV vRNA and DNA. As this animal also exhibited microchimerism, calculations showed a PERV:centromeric ratio of 0.0375, suggesting that this PERV-positive result was not indicative of true PERV infection as had been previously described.^{10,11} Control animals V9910C and V8571 were negative for PERV vRNA, DNA, and for microchimerism as expected.

DISCUSSION

These results showed that after grafting a GT-KO pig kidney, no baboon underwent HAR, as has already been shown.⁵⁻⁷ Although these organs were also transgenic for hCD55, hCD59, and hCD39. However, regardless of these additional transgenes, they were still subject to rapid AHXR. This was clearly unexpected since this improved generation of donors was supposed to be a major step to reduce rejection. Indeed the graft survivals were similar to¹² or even worse¹³ than those observed with pigs transgenic for hDAF (hCD55). Using GT-KO pigs as donors, Yamada et al⁶ showed prolonged xenograft survival up to 30 days and

up to 83 days using the thymokidney model. However, the thymokidney constitutes a particular immunologic situation that cannot be totally compared to single kidney transplantation. As shown herein, GT-KO and multitransgenic organs did not produce any advantage. One possible explanation could be an insufficient expression of the transgenes. This was clearly the case for hCD59, which displayed minor expression and hCD39 which was almost not expressed (data not shown). In contrast, human CD55 was clearly overexpressed but at a level that still needs to be quantified (data not shown). In this regard, the additional transgenes appeared to bring no significant advantage compared with the original GT-KO animals.

Regarding the recipient immune response, our results showed a rapid, strong anti-porcine humoral reaction directed against non-Gal epitopes expressed by the graft endothelium. Both preformed and induced nonGal Ab led to early intragraft IgM and subsequently complement deposition in control as well as treated animals. However, at this point, we cannot exclude that other mechanisms such as Ab-dependent cellular cytotoxicity played a role in rejection.

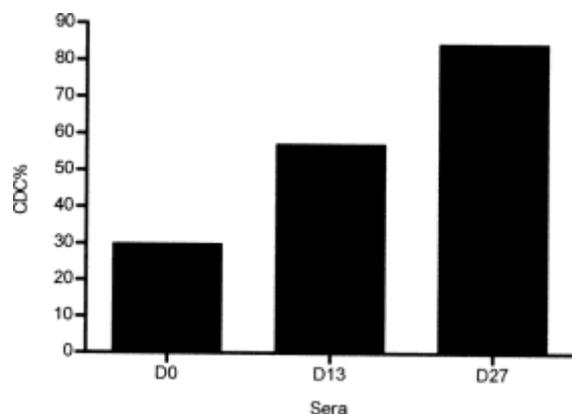


Fig 4. Cytotoxicity of control animal (V857I) sera (days 0, 13, 27) was assessed on donor endothelial cells by flow cytometry complement-mediated cytotoxicity assay.

tion, considering the level of macrophage infiltration. No particular coagulation disorders were observed. These data suggested that non-Gal epitopes, the major targets of preformed IgM, elicit IgG anti-pig xeno-antibody as already suggested by other workers⁷; transgenic expression of hCD55 brought only a limited protection to the graft; and immunosuppression remains a critical issue for xenotransplant success.

All animals were found to be negative for PERV infection. The detection of PERV in one host was probably due to the presence of porcine cells (ie, microchimerism) that is a well-known phenomenon in xenotransplantation and does not indicate true PERV transmission and infection.^{10,14}

The next steps in this study will be to better characterize the rejection responses and to optimize the immunosuppression to better control Ab and complement responses. One easy strategy will seek to eliminate the preformed Ab in the pregraft period using plasmapheresis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Martin Schata and Edwin van Amersfoort (Pharming Technologies BV) for supplying rhC1INH.

REFERENCES

- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, et al: Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295:1089, 2002
- Dai Y, Vaught TD, Boone J, et al: Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20:251, 2002
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al: Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299:411, 2003
- Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, et al: Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation* 14:339, 2007
- Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, et al: Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med* 11:29, 2005
- Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, et al: Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med* 11:32, 2005
- Chen G, Qian H, Starzl T, et al: Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 11:1295, 2005
- Cowan P.J., Aminian A, Barlow H, et al: Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation* 69:2504, 2000
- Coupe S, Leboeuf F, Boulday G, et al: RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15:2429, 2004
- Paradis K, Langford G, Long Z, et al: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science* 285:1236, 1999
- van der Laan L.J, Lockey C, Griffith BC, et al: Infection by porcine endogenous retrovirus after islet xenotransplantation in SCID mice. *Nature* 407:90, 2000
- Ashton-Chess J, Roussel JC, Bernard P, et al: The effect of immunoglobulin immunoadsorption on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation* 10:552, 2003
- Cozzi E, Vial C, Ostlie D, et al: Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation* 10:300, 2003
- Issa N.C, Wilkinson RA, Griesemer A, et al: Absence of replication of porcine endogenous retrovirus and porcine lymphotropic herpesvirus type 1 with prolonged pig cell microchimerism after pig-to-baboon xenotransplantation. *J Virol* 82:12441, 2008

2.3 Article 3

**Plasma/ B cells and complement blockade
do not improve survival of
pigs GT-KO and transgenic for human
CD55/CD59/CD39 kidneys in baboons.**

Le Bas-Bernardet S, Tillou X, Branchereau J, Dilek N, Poirier N, Châtelais M, Charreau B, Minault D, Hervouet J, Renaudin K, Crossan C, Scobie L, Robson S.C, Nottle M, Cowan P.J, d'Apice A.J.F, Galli C, Cozzi E, Soulillou J.-P, Vanhove B and Blancho G.

Article en préparation pour soumission à American Journal of Transplantation

Plasma/ B cells and complement blockade
do not improve survival of
pig GT-KO and transgenic for human
CD55/CD59/CD39 kidneys in baboons.

Le Bas-Bernardet S. 1,9, Tillou X. 1, Branchereau J. 1, Dilek N. 1, Poirier N. 1, Châtelais M. 1,8, Charreau B. 1,9, Minault D. 1, Hervouet J. 1, Renaudin K. 2, Crossan C. 3,9, Scobie L. 3,9, Robson S.C. 4, Nottle M. 5, Cowan P.J. 6, d'Apice A.J.F. 6, Galli C. 7,9, Cozzi E. 8,9, Soullillou J.-P. 1,9, Vanhove B. 1,9 and Blancho G. 1,9.

1 Institut de Transplantation- Urologie- Néphrologie (ITUN), CHU- Hôtel Dieu Nantes and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR-S 1064, Nantes, France.

2 Pathology Laboratory, CHU- Hôtel Dieu, Nantes, France.

3 Department of Biological and Biomedical Sciences, Glasgow Caledonian University, Glasgow, United Kingdom.

4 Transplant Institute, Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

5 Department of Obstetrics and Gynecology, University of Adelaide, Adelaide, Australia

6 Immunology Research Centre, Saint Vincent's Hospital, Victoria, Australia.

7 Laboratorio di Tecnologia della Riproduzione, (LTR), Cremona, Italy.

8 Conzorzio per la Rcerca sul Trapianto d'Organi (CORIT), Padua, Italy.

9 European Xenotransplantation Network Xenome (LSHB- CT- 2006- 037377)

Corresponding author:

Pr Gilles Blancho,

ITUN-INSERM UMR-S 1064

CHU-Hôtel Dieu

30 Bd Jean Monnet

44 093 NANTES Cedex 01

FRANCE

e-mail: gilles.blancho@chu-nantes.fr

Running title: Multi-transgenic and GT-KO kidney xenograft transplantation.

Key words: Xenotransplantation, kidney, GT-KO, genetically modified pigs, baboons, xeno-antibodies, B-cell and complement blocking

Abbreviations:

ACXR: Acute Cellular xenograft Rejection

AHXR: Acute Humoral Xenograft Rejection

AlloAb: Allo-antibodies

rhC1-INH: recombinant human C1 Inhibitor

CNI : Calcineurin inhibitor

CNRS: Centre National de la Recherche Scientifique

hCRP: human Complement Regulatory Proteins

DXR: Delayed Xenograft Rejection

ECM: Endothelial Cross-match

FCCA: Flow Cytometry Complement-Mediated Cytotoxicity Assay

Gal: Gal α 1,3 Gal epitope

GT-KO: Galactosyl-transferase knock-out

HAR: Hyper Acute Rejection

hHT: human Fucosyl-transferase

IHF: Immuno-histofluorescence

MMF: Mycophelate Mofetil

NHP: Non Human Primates

PAEC: Porcine Aortic Endothelial Cells

PE: Plasma Exchange

PERV: Porcine Endogenous Retrovirus

RT: Room Temperature

XenoAb: Xeno-antibodies

XenoAg: Xenoantigens

XT: Xenotransplantation

Abstract

Galactosyl-transferase knock-out (GT-KO) pigs could help to solve the problem of pig xenograft rejection, particularly in the context of additional complement regulatory molecule transgenesis. Thus, we have performed kidney xenograft transplantations from GT-KO pigs also transgenic for human CD55, CD59 and CD39 into baboons. Four groups of recipients received immunosuppressive treatments associating corticosteroid, Tacrolimus, Mycophenolate Mofetil, recombinant human C1 Inhibitor (rhC1-INH) and Cyclophosphamid or Bortezomib, with or without plasma exchanges. Treated animals rejected between days 9 and 15 with signs of acute humoral xenograft rejection (AHXR) in comparison to 2 controls who developed AHXR at d3 and 4. Immuno-histofluorescence analyses showed IgM, C3c, C5b-9 deposition and no C4d staining suggesting an efficient complement classical pathway blockade but a persistent alternate pathway. Moreover, monocytes/macrophages and CD4 T cells were clearly present in the interstitium as well as in glomeruli, contrasting with a low proportion of CD8 T cells and an absence of B cells under Bortezomib. Despite efficiency of Bortezomib and rhC1INH at blocking plasma/B cells and complement classical pathway respectively, pig GT-KO/CD55/CD59/CD39*Tg* xenografts were rejected through a combined aggressive response of monocytes/macrophages and T cells, a moderate xeno-antibodies recovery and activation of the complement alternate pathway, suggesting that the genetic modification of the pig could have opened other anti-pig responses and that immunosuppression remains a major challenge in xenotransplantation.

Introduction

In our days, the number of patients in waiting lists of organ allo-transplantation grows much rapidly than the number of patients who receive grafts. To compensate the shortage of organ donors, a solution could be the xenotransplantation (XT) of heart, kidney, liver...However, the XT of pig vascularized organs in humans as in non human primates (NHP) leads to hyperacute rejection (HAR), mainly induced by the presence of natural xeno-antibodies (XenoAb) directed against the major xenoantigen Gal α 1,3 Gal epitope (Gal). In these conditions, genetically modified pigs were generated expressing human complement regulatory proteins (hCRP) or more recently with an invalidation of the galactosyl-transferase (GT) gene, responsible of the Gal synthesis (Dai, Vaught et al. 2002; Lai, Kolber-Simonds et al. 2002; Phelps, Koike et al. 2003; Kolber-Simonds, Lai et al. 2004; Nottle, Beebe et al. 2007). The use of these organs in pig-to-NHP heart (Kuwaki, Tseng et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) and kidney (Cozzi, Bhatti et al. 2000; Ashton-Chess, Roussel et al. 2003; Cozzi, Vial et al. 2003; Chen, Qian et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) XT led to a significant progress: the prevention of the HAR. The first use of GT knockout (GT-KO) pigs XT showed heart survivals were prolonged from 2 to 6 months, with graft loss characterized by thrombotic microangiopathy associated with acute humoral xenograft rejection (AHXR) with Ig and complement deposition (Kuwaki, Tseng et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009). Kidney survival was different according to the therapeutic strategy applied to recipient. Yamada et al. (Yamada, Yazawa et al. 2005) showed in an induction of T- cell tolerance protocol, a thymo-kidney survival up to 3 months with no signs of rejection in comparison to kidney alone (with more conventional immunosuppression) which presented AHXR and acute cellular xenograft rejection (ACXR) between 1 and 4 weeks (Chen, Qian et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009). More recently, new strains of pigs were used as organ XT donors, combining multiples genetic modifications: GT-KO pigs transgenic for hCD55 (Tg) (McGregor, Ricci et al. 2012) or hCD46 (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012) were used in pig-to baboons heart XT showing respectively some delayed xenograft rejections (DXR) from 15 to 52 days (McGregor, Ricci et al. 2012) and a prolong heart survival up to 8 months with peri-transplant recipient B cell-depletion (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012). In this study, we performed XT of kidney from GT-KO pigs multitransgenic for human CD55, hCD59, hCD39, h fucosyl-transferase (HT) (GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg) in a life supporting transplant model in baboons and evaluated if additional genetic

modifications bring any advantage in comparison to pig organs simply GT-KO. Moreover, the recipients received combined therapeutic regimens (including the recombinant human C1 inhibitor (rhC1 INH) and the Bortezomib to respectively) to block the activation of the complement and the Ab producing cells to reduce the production of XenoAb, both involved in the AHXR development.

Materials and Methods:

Animals, xenotransplantation and treatments:

Genetically modified pigs (*Sus scrofa*), from 2 different strains were used as donors for kidney XT into baboons (*Papio Anubis*, from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) - primatology centre, Rousset, France). Recipients were prepared 3 weeks before transplantation with an auto-transfusion protocol and erythropoietin injection (EPO, Eprex® 400 U/week subcutaneously). Pig kidneys were grafted into NHP in heterotopic position, followed by a bilateral nephrectomy as it was described in details (Zaidi, Schmoeckel et al. 1998), excepted in controls (n=2 untreated baboons). Actually, in order to follow and study the anti-pig immunization of these 2 recipients, they were kept alive after rejection: one autologous kidney was removed during surgery whereas the other one was kept with clamped ureter (under a powerful analgesia) to be declamped at rejection and graft removal. Four experimental groups were constituted according to the treatment or the donor strain. In all groups, recipients were splenectomised (excepted for 2 baboons in group#1) (Table 1). At the end of surgery, baboons were fitted with an internal jugular catheter allowing perfusions, IV treatment and blood harvesting without any anaesthesia within the 10 first days. The clinical aspects and renal function was daily monitored by measurement of creatinemia, uraemia and diuresis as blood biochemistry.

The NHP groups are described in details in Table1 according to the pig strain used as donor for xenografts and the immunosuppressive regimens given to recipients. In brief, NHP from control group, groups#1, #2 and #3 were transplanted with a kidney from GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg pigs, generated by breeding of 3 different pig strains by Cowan *et al.* (Cowan, Aminian et al. 2000; Nottle, Beebe et al. 2007; Wheeler, Joseph et al. 2012), whereas kidneys grafted in baboons from group#4 came from pig only GT-KO (kindly proved by Dr D. Sachs) (Kolber-Simonds, Lai et al. 2004) (Table 1). Recipients from group#1, (n=4), received a combined treatment slightly modified from the one used in our previous hCD55 transgenic pig-to baboon kidney XT (Ashton-Chess, Roussel et al. 2003;

Ashton-Chess, Meurette et al. 2004): rhC1INH (kindly provided by Pharming (Netherland) and already used in our alloAb-mediated rejection model (Tillou, Poirier et al. 2010)) at 200U/Kg every 8 hours for 5 days, Cyclophosphamide at 40 mg/Kg at days (d) -1 and d0, 20 mg/Kg at d2 and 10 mg/kg at d4, Mycophelate Mofetil (MMF) at 70 mg/kg/day, Tacrolimus at 0,2 mg/Kg/day (for a trough level objective > 20ng/ml), and corticosteroids at 1 mg/Kg/day for the entire duration of the XT. In group#2 (n=4) Bortezomib, molecule indicated in B lymphoma therapy, was given instead of Cyclophosphamide, at 1.3mg/m² (baboon body surface was estimated to 0.78m²), at d-17, -14, -10, -7, -4, -1 and d7, rhC1INH was given at 200U/Kg for 2 NHP and at 400U/Kg for the 2 others every 8 hours from d5 to d9, MMF, Tacromilus and steroids remained unchanged. In addition, in this group two plasma exchanges (PE) were performed at d-4 and d-1 to remove preformed circulating xenoAb. Recipients from groups#3 (n=4) and #4 (n=2) received the same treatment that group#2 with small modifications: rhC1INH was given at 400U/Kg from d4 to d8 every 8 hours and an additional PE was performed at d3 (Table1). From group#2, protocol biopsies were performed at d4 under functioning graft and at rejection, grafts were removed for histological analysis and recipients were euthanized, excepted for controls that were euthanized 3 months later. All operations were performed under general anesthesia. This pig-to-primate kidney XT protocol was submitted to and approved by our regional ethical committee (governmental organization).

Histological analyses:

Paraffin-embedded tissues were cut into 4 mm-thick sections and stained with hematoxylin and eosin. A pathologist examined all sections in a blinded manner. Immunostaining was performed on biospsy and graft nephrectomy sections cut at a thickness of 10 mm and fixed in acetone. Controls of gene inactivation (KO), transgene expression and immunological staining were performed on sections by incubations overnight at 4°C with *Bandeiraea simplicifolia*- Isolectin B4 (IB4)- fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma, Saint-Louis, MI, USA), mouse anti-hCD55 (67), mouse anti-hCD59 (MEM-43), mouse anti-hCD39 (A1), rabbit polyclonal anti-hIgM all from AbDSerotec (Oxford, UK), rabbit anti-hCD3, mouse anti-hCD20 (L26), mouse anti-hCD68 (KP1), rabbit anti-hC3c all from Dako (Glostrup, Denmark) , mouse anti-hCD4 (13B8.2) mouse anti-hCD8 (B9.11), mouse anti-hCD11b (BEAR1) all from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA), mouse anti-hC4d (Quidel, San Diego, CA, USA) and mouse anti-hC5b-9 (aE11, Diatec, Oslo, Norway). After washing, sections were incubated with either Alexa568-labeled goat anti-mouse IgG

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or FITC-labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) for 90 min. at room temperature (RT). Sections were analyzed using a fluorescence microscope and Axion Vision software (Carl Zeiss, Le Pecq, France). All antibodies used for staining were previously checked for crossreactivity on baboon counterpart.

Flow cytometry:

Controls of gene inactivation (KO) and transgene expression were performed on porcine aortic endothelial cells (PAEC) isolated from donor aorta as it was previously described (Chatelais, Devalliere et al. 2011). Briefly 1 to 2×10^5 PAEC, after 2 washes in cold FACS buffer, were incubated for 30 min. at 4°C with IB4-FITC, mouse anti-hCD55 (67), mouse anti-hCD59 (MEM-43) and mouse anti-hCD39 (A1) all from AbDSerotec. Then cells were washed 2 times, incubated with anti-mouse IgG-FITC (for 30 min. at 4°C), washed and resuspended in FACS buffer before analysis.

The baboon serum xenoreactivity was assessed by flow endothelial cross-matches (ECM) in donor PAEC. Recipient sera were harvested at d-17, d-4 pre-PE, d-4 post-PE, d-1 pre-PE, d-1 post-PE, d0, d1, d2, d3 pre-PE, d3 post-PE, d4, d7, d14, d21, d28, d35 and monthly thereafter. Briefly, heat inactivated sera were incubated for 30 min at RT with 1 to 2×10^5 PAEC, cells were washed 2 times in cold FACS buffer, then incubated separately for 30 min at 4°C with rabbit polyclonal anti-hIgM or anti-monkey IgG conjugated to FITC all for AbD Serotec. The anti-pig IgM was revealed using donkey anti-rabbit IgG conjugated to FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Cells were washed and resuspended in FACS buffer before analysis.

The baboon serum cytotoxicity was measured by Flow Cytometry Complement-Mediated Cytotoxicity Assay (FCCA) on donor PAEC. Briefly, heat inactivated sera were incubated for 30 min. at 4°C in 1 to 2×10^5 PAEC, cells were washed 2 times in FACS buffer and incubated for 30 min at 37°C with 1:3 diluted rabbit complement. Then, cells were washed and propidium iodide was added to detected dead cells. Cells were washed and resuspended in FACS buffer before analysis.

Cells were analyzed using a Canto-II Flow cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) with DIVA (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree stars, Ashland, OR, USA).

and then analyzed using a Canto-II Flow cytometer with DIVA and FlowJo software. All antibodies used for staining were previously checked for crossreactivity on baboon counterpart.

B-, T-lymphocytes, T Regulatory (TReg) and Natural Killer (NK) cells were monitored and quantified in peripheral blood, plasma cells in bone marrow and labeled with directly conjugated anti- human CD3 (SP34-2), CD4 (L200), CD8 (RPA-T8), CD16 (3G8), CD19 (HIB19), CD20 (2H7), CD25 (M-A251), CD27 (M-T271), CD38 (OKT10), NHP- CD45 (DO58-12083), CD127 (hIL-7R-M21), CD138 (MI15) (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, CA, USA), FoxP3 (236A/E7, eBioscience, San Diego, CA, USA) and NKp46 (BAB281, Beckman Coulter). Briefly, blood was incubated with red blood cell lyses solution at RT for 8 min., then was washed twice and incubated with Ab mix for 30 min. at 4°C in dark, washed twice and resuspended in FACS buffer. Cells for TReg staining were permeabilized according to manufacture recommendations, then incubated with anti-FoxP3 for 30 min. at 4°C in dark, washed twice, resuspended in FACS buffer and analyzed using a Canto-II Flow cytometer with DIVA and FlowJo software.

PERV detection:

Serum samples were taken from control animals pre-xenograft, day 41, and month 3 (euthanasia). Serum samples were taken from treated animals pre xenograft and at euthanasia. Viral RNA (vRNA) was extracted from baboon serum using the QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Crawley, UK). The presence of PERV RNA was detected by RT-PCR amplification using primers corresponding to a region in the PERV pol gene and a method modified from that described by Paradis *et al* (Paradis, Langford et al. 1999). To determine if organ recipients presented microchimerism, DNA was first isolated from PBMC preparations from the recipient's blood using the Blood and Cell Culture DNA mini kit (Qiagen, Crawley, UK). The DNA was then tested for the presence of porcine centromeric DNA and PERV as described previously (Paradis, Langford et al. 1999).

Results:

Transgene expression and knocked-out in pig kidney

The lacking of Gal synthesis and the expression of hCD55, hCD59 and hCD39 transgenes were assessed by FACS on PAEC (Fig1A) and by immuno-histofluorescence (IHF) staining on pig kidney biopsies (Fig1B). Both analyses confirmed the non expression of Gal epitope, a high expression of hCD55, a moderate expression of hCD59 and almost no expression of hCD39 in PAEC and in pig kidney (no clear specific CD39 staining was shown in pig kidney biospsy despite a marked background (Fig1B)).

Survival and histological analyses

In any group of recipients transplanted with a GT-KO (+/- transgenes) kidney, we did not observe any clinical either histological sign of HAR (Table 2, Fig 2) confirming that the lack of α Gal expression prevents from HAR and improves the xenograft survival, however pig kidneys were already rejected by NHP. In control group, the kidney survival did not exceed d4, showing histological signs of acute vascular rejection (Fig1a), suggesting (i) an important role of XenoAb in development of rejection and (ii) an insufficient expression of hCRP transgenes controlling the complement activation due to XenoAb. In treated animals, 3 kidneys were lost because of a technical failure at d3, 4 and 4, whereas the remaining eleven recipients rejected their xenograft between d9 and d15 post-transplantation (Table 2) (median 12d; mean 12d). Although recipients from groups#3 and #4 did not show a significant different graft survival to others, they showed a better renal function, a better physiological, metabolic and compartmental state with a rapid degradation in the very last 2 days compared to others animals that showed more progressive renal function degradation (data not shown). The graft survival of GT-KO kidney in group#4 (d11, n=1) was not different from those of GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg kidneys in other groups (#1, 2, 3), suggesting that hCD55, hCD59 and hCD39 transgenes did not bring any advantage regarding to the graft survival in our study. In all cases, histological analysis showed some characteristic signs of acute vascular rejection with focal interstitial hemorrhage, glomerular and capillary thrombi, interstitial cellular infiltrate and edema qualified as AHXR and ACXR (Fig.1).

Immuno- histolofluorescence analyses

Immunostaining analyses showed a clear IgM deposition into the graft from d3 post-transplantation in vascular and glomerular area in controlled (Fig3aA), as in treated animals

with (Fig3a.B and C) or without (Fig3a.D) multiple PE. These results suggest that only a few amount of circulating preformed anti-nonGal Ab could bind rapidly the vascular structure of xenograft and induce profound and early damages. Regarding the complement binding, IHF staining showed a C3c, C4d and C5b-9 deposition in similar kinetic than Ig when animals did not received (Fig3aA) and after the end of rhC1-INH treatment (Fig3aC: d12; D: d15). We observed a C3c and C5b-9 deposition with no C4d staining at d4 in a functioning graft (Fig3aB) when recipient#PA936G was under rhC1-INH treatment, suggesting an efficient complement classical pathway blockade by this molecule but a persistent alternate pathway. Moreover, this classical pathway blockade seems to be efficient only during the rhC1-INH treatment. In group#4, recipient#V906F who was stopped at d3 for technical failure, before the starting of rhC1-INH (Table1), displayed an equivalent feature of IgM, C3c, C4d and C5b-9 deposition (data not shown) compared to recipients from control group (Fig 3aA) who rejected their xenograft at d3 and 4, whereas the main difference between these two groups at this point (excepted PE), is that donors from group#4 did not express hCRP transgenes (Table1). Taken together these findings suggest that the hCRP transgene no bring any advantage regarding the control of complement activation in our study.

Regarding the cellular infiltrates of kidney xenograft, it was observed a modest B cell infiltration (CD20) in perivascular area in controls and group#1 animals (Fig.3b A & D), whereas this infiltrate was almost abrogated in biopsies of animals from groups#2, 4 (data not shown) and #3 (Fig.3b B & C), suggesting an efficient B cell blockade by the Bortezomib use. We observed in all groups an early (from d3, Fig.3bA) and massive monocytes/macrophages infiltrate (CD11b, CD68) in perivascular, glomerular area as in peritubular interstitium and capillaries, suggesting an important part of innate cellular response in GT-KO xenogeneic rejection. Although we observed a marked infiltrate of CD4+ T cells in perivascular area in control recipients, this infiltrate decreased but did not disappear in xenograft from treated animals. By contrast, we only saw a low proportion of CD8+ T cell infiltration.

Serum xenoreactivity and cytotoxicity

The baboon serum xenoreactivity was assessed by flow ECM in donor PAEC, and most recipients displayed some IgM and IgG, but in fewer amount, preformed xenoAb (Fig.4A). In control group, since recipients were kept alive after xenograft rejection, we could measure immunization in a longer period than in others. Elicited IgM and IgG anti-nonGal grew up respectively from d6 and from d9 to reach a maximum around d21 and d28, to decrease after slowly. This kinetic was almost the same in recipients from group#1, with a maximum of

immunization at xenograft rejection. In this group, in most of the cases, we observed a decrease of IgM as IgG anti-nonGal Ab in the first three days post-XT suggesting a trapping of xenoAb inside the graft. The use of Bortezomib in pre-transplant treatment in animals (group#2, 3, 4) induced a modest reduction of preformed IgM (in 8/10 cases) and IgG (in 7/10 cases). In addition to Bortezomib administration, each PE (groups#2, 3, 4) showed a supplementary and efficient decrease of the amount of peripheral preformed anti-nonGal Ab, but each time XenoAb, IgM as IgG, reappeared quickly in a rebound. After the last PE (d-1 group#2, d3 group#3, 4), half of baboons showed no re-increase of IgM as IgG xenoAb.

The analysis of serum complement dependant cytotoxicity (CDC) showed that in most of the case, this cytotoxicity correlated with the baboon xeno-immunization and even few amount of xenoAb was detectable in periphery, they presented a non negligible degree of CDC against donor cells (up to 75%) (Fig4B). Taken together, these findings plus the early deposition of xenoAb into the xenograft, our results confirm the quick and important involvement of anti-nonGal Ab in inducing early damages into the graft contributing to the development of AHXR.

Discussion:

In this study, we performed XT of kidney from GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg pigs in a life supporting transplant model in baboons and evaluated if combined genetic modifications bring any advantage in comparison to organs simply GT-KO in a therapeutic strategy combining complement activation and Ab producing B cell blockage to control the AHXR development.

Surprisingly, transgenic expression of hCD59 and hCD39 in the GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg pigs used as donor in our study, was lower of those observed in the original hCD55.hCD59.hHTTg (Cowan, Aminian et al. 2000) and hCD39Tg swine (Wheeler, Joseph et al. 2012) bred together with the GT-KO strain (Nottle, Beebe et al. 2007) to generate our kidney pig donor. This phenomenon could likely be explained by some epigenetic regulations as DNA methylation (variegation) and/or silencing occurring over the breeding of transgenic animals overexpressing a gene of interest (Hofmann, Kessler et al. 2006; Baup, Fraga et al. 2010). It is to note that the expression of hHTTg historically introduced in the genetic construction in the context of α Gal expression and shown to be weak in the original hCD55.hCD59.hHTTg pig strain (Cowan, Aminian et al. 2000), represents no interest in the context of GT-KO.

In our study, we did not see any sign of HAR of GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg and GT-KO organs in baboons with or without treatment confirming that the absence of Gal epitope improved clearly the xenograft, similarly to other groups (Chen, Qian et al. 2005; Kuwaki, Tseng et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Mohiuddin, Corcoran et al. 2012), even though some HAR were reported in GT-KO context (McGregor, Ricci et al. 2012). However, these survivals remained modest, up to 15 days in treated animals, showing no major difference between different treatments and genetic donor profiles suggesting that (i) the various tested immunosuppressive strategies remain insufficient and (ii) the additional transgenes do not seem to bring advantage regarding to the original GT-KO pigs, even if in this last group, results from only one animal were exploitable. Despite this strong immunosuppressive strategy (Ab producing cells and complement activation blockade, PE, anti-proliferative, anti-cytokinic and anti-inflammatory molecules), we have continued to observe the development of AXHR and AXCR in our baboons. However, AHXR and ACXR were already described in GT-KO heart (Hisashi, Yamada et al. 2008; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) as well as kidney XT (Chen, Qian et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005), developed only few days post-transplantation and remain some immunological hurdles to overpass. However cardiac and kidney xenografts are not completely comparable since heart is not transplanted in a life-supporting model, then their organ function is not assessed in a comparable manner.

Our results have shown some circulating IgM and IgG preformed anti-nonGal Ab in baboons as it was also demonstrated by others (Chen, Qian et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009; McGregor, Ricci et al. 2012), their early deposition into the graft, an induction of peripheral elicited anti-nonGal Ab but depending of treatment, their non negligible cytotoxic power, even in modest amount, suggesting their quick and important involvement in the development of AHXR, without inducing HAR in treated as well as untreated recipients. Moreover, as it was clearly shown in controls, GT-KO xenograft induced IgM as well as IgG elicited anti-nonGal Ab, and their CDC was correlated with animal immunization. As it was already described (Chen, Qian et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) this finding was also observed in treated animals, but we described different profiles of xenoreactivity and cytotoxicity even more with treatment using PE and Bortezomib. Actually, the peri-transplant treatment of Bortezomib to reduce Ab producing cells induced a decrease of bone marrow plasma cells but only a modest reduction of circulating preformed IgM/G xenoAb. The multiple pre- and post-XT PE were efficient in reducing circulating preformed xenoAb, but each time we observed their rebound in following days, suggesting a

mobilization of Ab producing cells to “normalize” their circulating level. Taken together these results suggest that desensitization and B cell blockade strategy needs to be improved to better control elicited xenoAb. Others groups have used Rituximab (anti-CD20 Ab) (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012) to control B cell line (from the pre-B to the mature B cells) however this treatment could not deplete plasma cells which not express CD20.

Actually, and despite the use of GT-KO donors, preformed and elicited anti-nonGal Ab seem to be a new immunological barrier in vascularized XT, since their powerful CDC leading to the Ab-mediated rejection. An important objective is to identify the nonGal targets, helping the development of new strategies preventing their Ab-mediated rejection. Several biochemical analyses investigated the specificity of targets recognized by anti-nonGal Ab in different xenograft models at protein level (Suyama, Li et al. 2000; Ezzelarab, Hara et al. 2006; Byrne, Stalboerger et al. 2008; Burlak, Wang et al. 2012) as well as glycolipids/carbohydrates level (Diswall, Angstrom et al. 2010; Byrne, Stalboerger et al. 2011). Anti-*N*-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc) Ab were found among anti-nonGal Ab in human sera (Zhu and Hurst 2002), however, this finding could not explain some of anti-nonGal reactivity in NHP who, like the majority of mammals, express Neu5Gc.

As our results showed, the preformed and elicited anti-nonGal Ab presented a strong CDC activity, even in low level, supporting the idea that control of complement activation remains an important hurdle in controlling the Ab-mediated rejection. Our first strategy to control the complement activation was the transgenic expression of hCRPs (hCD55 and hCD59) by the donor. However, we have seen, in controls (GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg pig kidney) as in treated recipients from group#4 (GT-KO pig kidney) in absence of rhC1-INH treatment in first post-transplantation days, an equivalent feature of C3c, C4d and C5b-9 deposition in the xenografts suggesting that the hCRP transgenes in our model did not bring any advantage compared to GT-KO alone. These results suggest, in consistence with hypothesis advanced in GT-KO.hCD55Tg (McGregor, Ricci et al. 2012) as well as GT-KO.hCD46Tg (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012) heart XT model, either that transgenic expression was too low, what is clearly the case for hCD59, and/or their expression could be efficient only a short time post-XT, and thereafter would be exceeded by the cytotoxic power of preformed plus elicited xenoAb. Our second strategy was to use the rhC1-INH. Their use, even partially effective during treatment (do not block the alternate pathway), could not protect the xenograft after treatment interruption, requiring a more efficient complement blockade molecule.

Taken together these results emphasize the importance to control the humoral response by targeting the two essential parameters (i) preformed and elicited xenoAb by desensibilization of recipients prior XT and blockade of xenoAb producing cells prior to and during XT, but also (ii) the complement activation (in all pathways) resulting from xenoantigens (xenoAg) - Ab recognition/binding. Regarding the complement blockade, Eculizumab (anti-C5 Ab, indicated in the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as in atypical hemolytic-uremic syndrome) could be a new therapeutic strategy to block together the classical and alternate pathway. Regarding the anti-nonGal immunization, it would be possible that GT-KO as transgene expression perturb glycoprotein expression in pig endothelium and emphasize the original humoral as cellular xenogeneic responses. Then, we could hypothesize than new antigens appeared or nonGal antigens were expressed in higher proportion that favorites another type of xenogeneic response.

As it was already showed in GT-KO heart (Hisashi, Yamada et al. 2008; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) and kidney XT (Ezzelarab, Garcia et al. 2009), we observed a strong monocytes/macrophages xenograft infiltrate in all groups of baboons independently of treatment, as it was already observed in xenogeneic organs expressing α Gal. Regarding the importance of infiltration, in number as in localization, it seems to be important, in addition to humoral response, to consider a new immunosuppression approach to control also this innate cellular xenogeneic response. Ide et al. (Ide, Wang et al. 2007) have shown in an *in vitro* study than a human CD47-Fc fusion protein inhibits partially the porcine cell phagocytose by human macrophages. Another approach could be the generation of new genetically modified pigs expressing the hCD47 able to interact with SIRP α of NHP, in contrast with porcine CD47, and then contribute to control the macrophage-mediated xenograft rejection (part of ACXR). A second aspect would be to block the xenoAg processing and (direct and indirect) presentation by macrophages as antigen presenting cells (APC) to control the adaptative response.

In addition to macrophages infiltrate, we have also observed some CD4 and few CD8 T cells infiltrate in all groups of baboons independently of treatment. Another strategy would be to block the co-stimulation by the use of antagonist anti-CD28 as it was used in kidney allotransplantation in baboon (Poirier, Azimzadeh et al. 2010). In this model, we have shown that CD28 blockade (i) increases intragraft and peripheral blood Treg cells (ii) prevents graft rejection and vasculopathy in synergy with calcineurin inhibitor (CNI), and (iii) inhibits the induction of elicited alloAb when combined with CNI. Moreover, it was already shown in a pig transgenic for hCD55 or hCD46 cardiac xenograft model in baboons that the co-

stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 (by a CTLA4-Fc) blocked the AXCR and modulated the induced anti-nonGal Ab response in a context of donor α Gal expression (Wu, Pfeiffer et al. 2005). Then, we could hypothesize that combined with CNI, already used in our XT model; a selective blockade of co-stimulation by an antagonistic anti-CD28 Ab could control both one part of AXCR by reducing T cell infiltrate and AXHR by controlling induction of elicited anti-nonGal Ab.

This study provides one of the first results of multiple hCRP expression in GT-KO kidney XT. We showed a modest graft survival due to AHXR with circulated xenoAb and with Ab and complement deposition in graft, suggesting that the hCRP transgenes expression brought only a limited protection to the graft but did not prolong the xenograft survival. We also showed the existence of a pre-immunization with the presence nonGal Ab at a low titer but highly cytotoxic. Despite efficiency of Bortezomib and rhC1-INH at blocking plasma/B cells and complement classical pathway respectively, pig GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg xenografts were rejected through a combined aggressive response of monocytes/macrophages and T cells, a moderate xenoAb recovery and activation of the complement alternate pathway, suggesting that the genetic modification of the pig could have opened other anti-pig responses and that immunosuppression and desensibilization remains a major challenge in xenotransplantation.

Acknowledgments:

We thank Edwin van Amersfoort (Pharming Technologies BV) for supplying the rhC1INH.

This work was supported by the European Commission's Sixth Framework Programme, under the priority thematic area Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health, contract N°. LSHB- CT- 2006- 037377, XENOME.

Table 1: Recipient conditioning or Animals and treatments

Groups	Recipients	Pig donor	Splenectomy	Plasmatic exchange		Treatment
Control	V9910C	GT-KO, tg hCD55,	+	-		-
	V857I	hCD59, hCD39, hHT	+	-		-
Treated #1	V893AA		-	-		
	PA956E	GT-KO, tg hCD55,	-	-		Cyclophosphamid rhC1INH 200U/kg d0 to d5
	V907J	hCD59, hCD39, hHT	+	-		
	PA936H		+	-		
Treated #2	PA997C		+		MMF, CS, Tacrolimus	Bortezomib rhC1INH 200U/kg d5 to d9
	V9912B	GT-KO, tg hCD55,	+	d -4, -1		
	O22VB	hCD59, hCD39, hHT	+			
	O22VC		+			
Treated #3	PA936G		+		Bortezomib rhC1INH 400U/kg d4 to d8	
	PA936F	GT-KO, tg hCD55,	+	d -4, -1, 3		
	K24E	hCD59, hCD39, hHT	+			
	K921F		+			
Treated #4	K13F		+	d -4, -1, 3	Bortezomib rhC1INH 400U/kg d4 to d8	
	V906F	GT-KO	+			

GT-KO: Galactosyl-transferase knock-out, tg : transgenic, HT : Fucosyl-transferase, MMF: Mycophenolate Mofetil, CS: corticosteroids, rhC1INH : recombinant human C1 Inhibitor.

Table 2: Survival of xenogeneic kidney.

Groups	Recipients	Survival (in days)	Diagnosis
Control	V9910C	4	AHXR & ACXR
	V857I	3	Id.
Treated #1	V893AA	15	AHXR & ACXR
	PA956E	13	Id.
	V907J	12	Id.
	PA936H	4	Technical failure
Treated #2	PA997C	9	AHXR & ACXR
	V9912B	9	Id.
	O22VB	11	Id.
	O22VC	4	Technical failure
Treated #3	PA936G	12	AHXR & ACXR
	PA936F	14	Id.
	K24E	12	Id. (+ fracture capsulaire)
	K921F	14	Id.
Treated #4	K13F	11	AHXR & ACXR
	V906F	3	Technical failure

AHXR: Acute Humoral Xenograft Rejection, ACXR: Acute Cellular Xenograft Rejection.

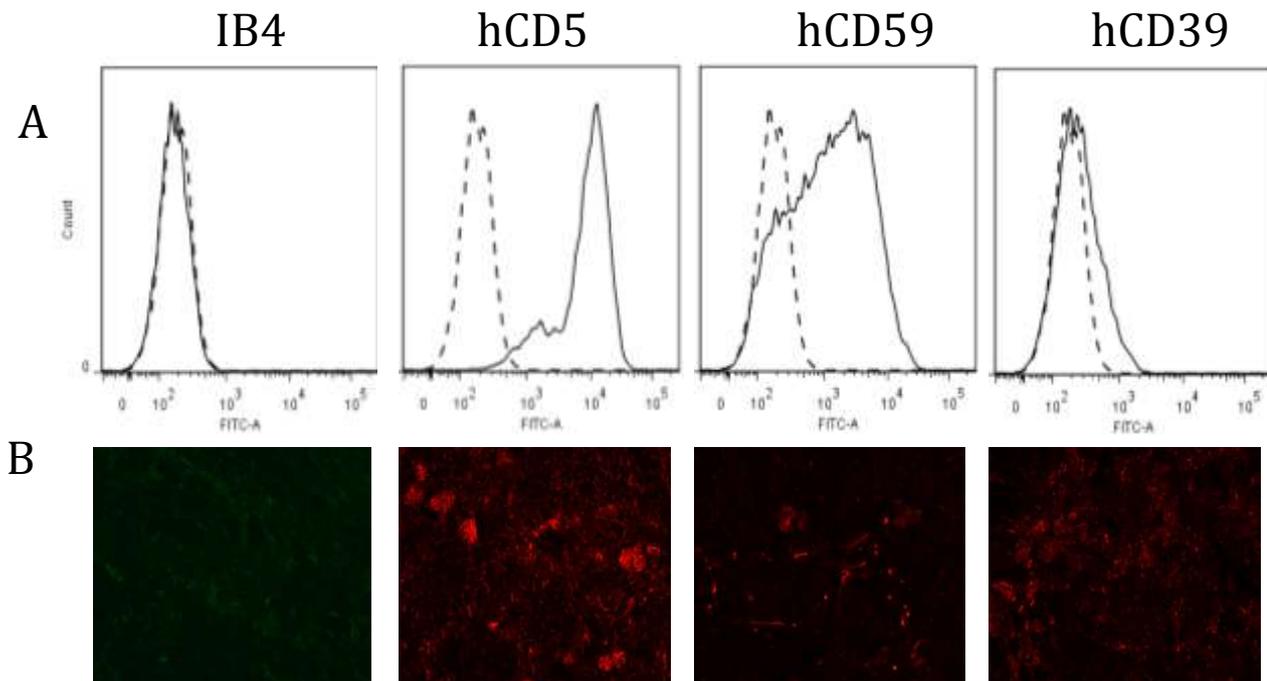


Figure 1: Transgene expression and knockout in Pig cells and Tissue. The expression of Gal epitope, hCD55, hCD59 and hCD39 was assessed by FACS on GT-KO and transgenic porcine aortic endothelial cells (PAEC) (A): negative control (black dashed line) and PAEC#006 (black plane line); and by immune-histofluorescence staining on GT-KO and transgenic pig#006 kidney biospies (B).

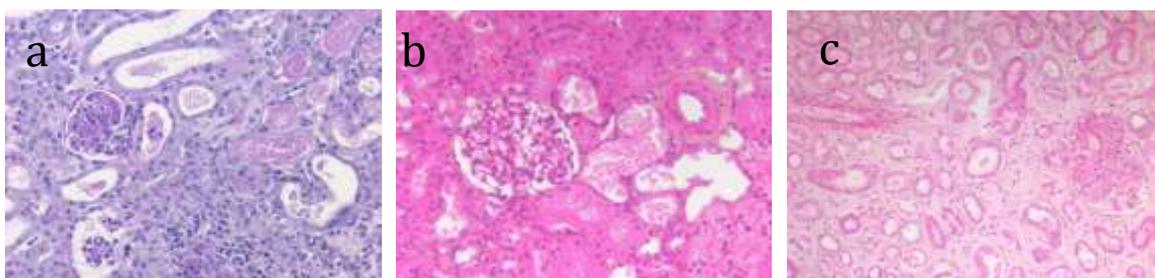


Figure 2: Histological analyses of animals from control group (a: V857I) and from group#3 (K921F: b, c). a (x20), c (x10) showed kidney biospies at rejection respectively at day 3 and d14 whereas b (x20) showed protocol biospies at d4 in functioning graft.

Figure 3a

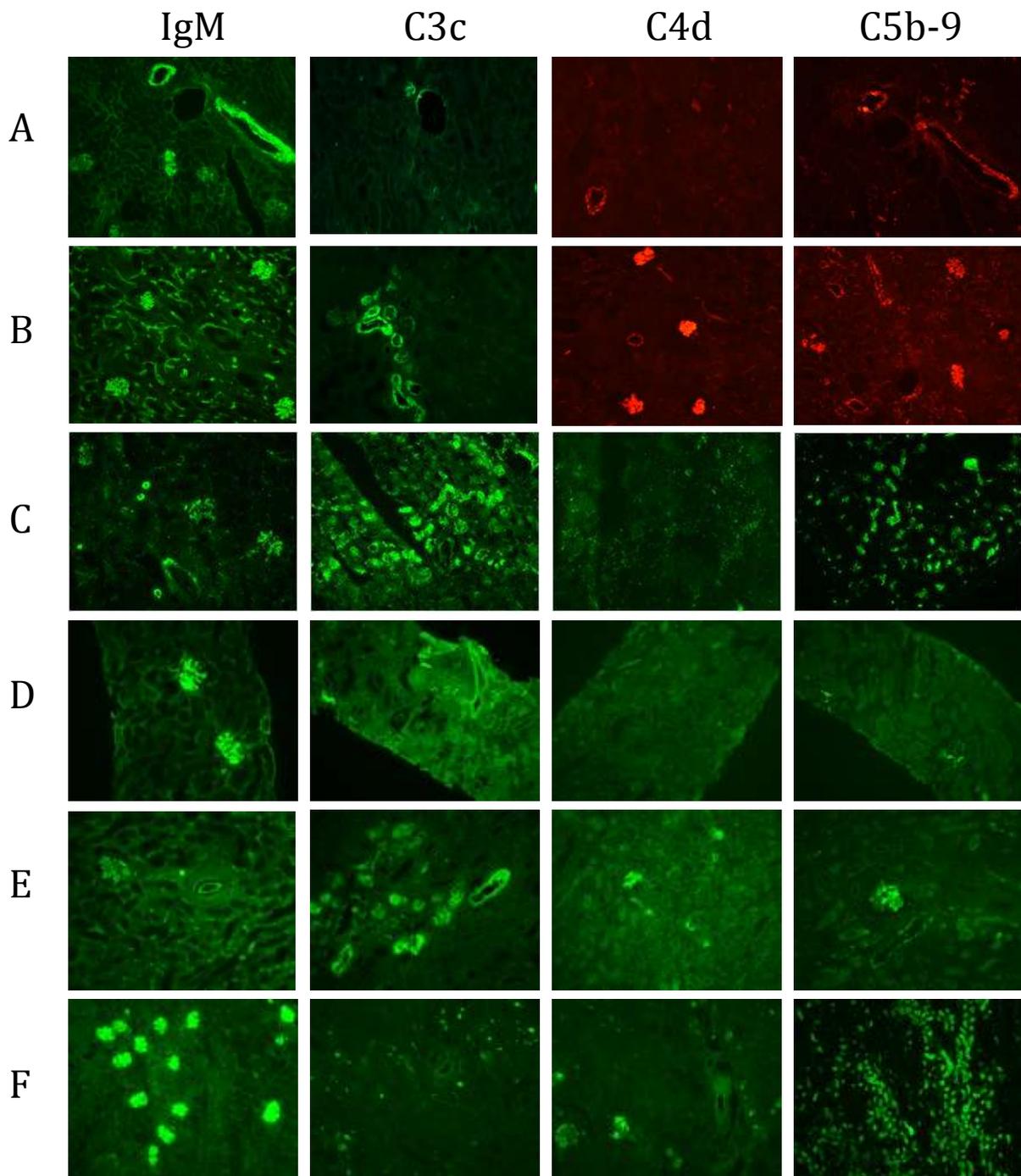


Figure 3b :

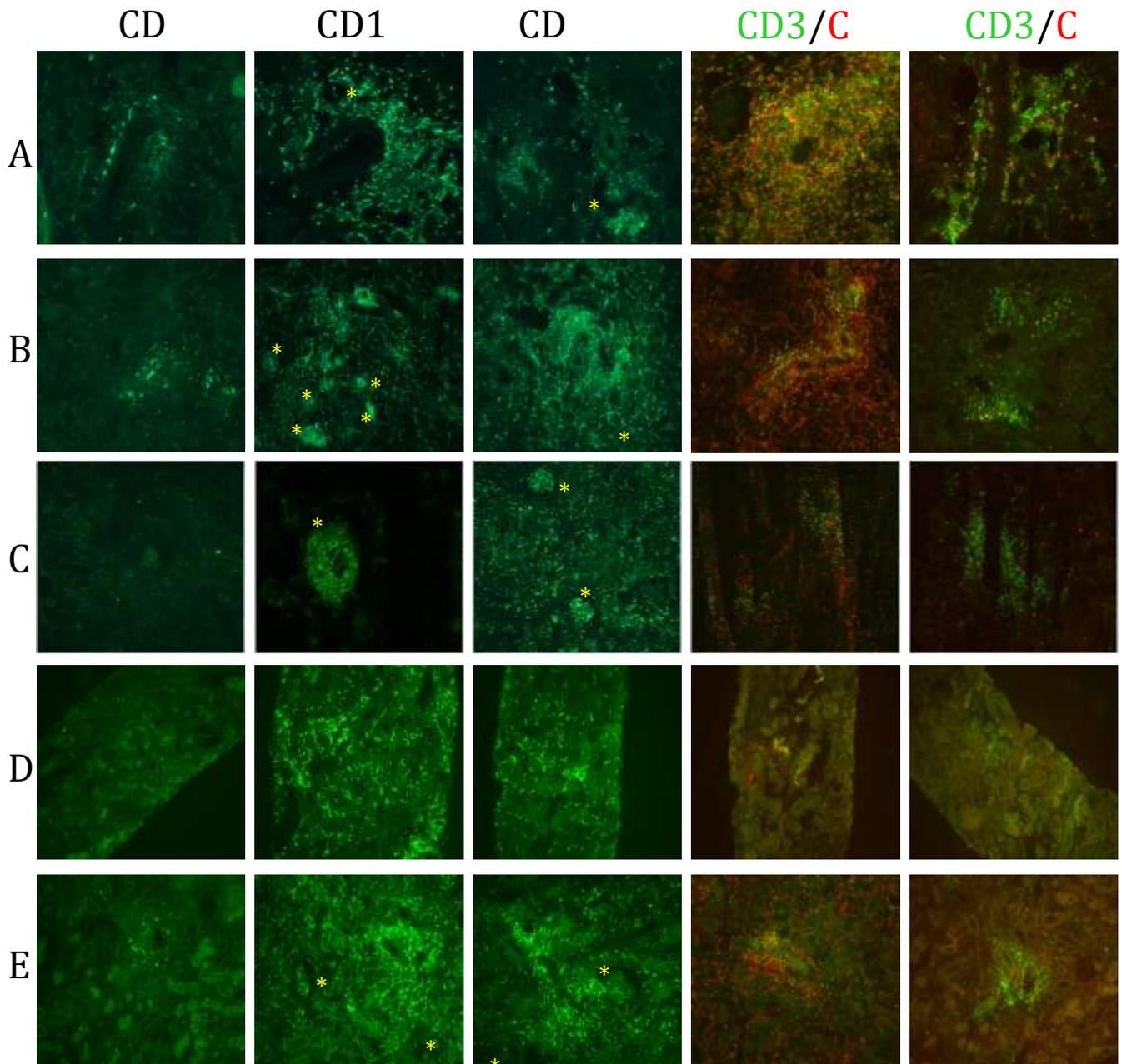


Figure 3: Immuno-histofluorescence analyses. Immunoglobulin M, C3c, C4d, C5b-9 staining (3a) and cellular staining (3b): B cells (CD20), monocytes/macrophages (CD11b, CD68): yellow star is emphasizing the presence of monocytes/macrophages in glomerular capillaries, CD4 and CD8 T cells, were performed in frozen kidney biopsies from recipients A: control group (V857) at rejection d3, B from group#1 at rejection at d15 (V893AA), C from group# 2 at rejection at d9 (PA997C), D & E: from group#3 (PA936G) respectively at d4 in functioning graft (D) and at rejection at d12 (E), and F: from group#4 (V906F) at d3 in functioning graft.

Bibliography

1. Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol.* 2002 Mar;20(3):251-5.
2. Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1089-92.
3. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen SH, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science.* 2003 Jan 17;299(5605):411-4.
4. Kolber-Simonds D, Lai L, Watt SR, Denaro M, Arn S, Augenstein ML, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11;101(19):7335-40.
5. Nottle MB, Beebe LF, Harrison SJ, McIlfatrick SM, Ashman RJ, O'Connell PJ, et al. Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer. *Xenotransplantation.* 2007 Jul;14(4):339-44.
6. Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med.* 2005 Jan;11(1):29-31.
7. Ezzelarab M, Garcia B, Azimzadeh A, Sun H, Lin CC, Hara H, et al. The innate immune response and activation of coagulation in alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients. *Transplantation.* 2009 Mar 27;87(6):805-12.
8. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M, Chavez G, Smith KG, Zaidi A, et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation.* 2000 Jul 15;70(1):15-21.
9. Ashton-Chess J, Roussel JC, Bernard P, Barreau N, Karam G, Dantal J, et al. The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons. *Xenotransplantation.* 2003 Nov;10(6):552-61.
10. Cozzi E, Vial C, Ostlie D, Farah B, Chavez G, Smith KG, et al. Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts. *Xenotransplantation.* 2003 Jul;10(4):300-10.
11. Yamada K, Yazawa K, Shimizu A, Iwanaga T, Hisashi Y, Nuhn M, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat Med.* 2005 Jan;11(1):32-4.
12. Chen G, Qian H, Starzl T, Sun H, Garcia B, Wang X, et al. Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med.* 2005 Dec;11(12):1295-8.
13. McGregor CG, Ricci D, Miyagi N, Stalboerger PG, Du Z, Oehler EA, et al. Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation.* 2012 Apr 15;93(7):686-92.
14. Mohiuddin MM, Corcoran PC, Singh AK, Azimzadeh A, Hoyt RF, Jr., Thomas ML, et al. B-cell depletion extends the survival of GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months. *Am J Transplant.* 2012 Mar;12(3):763-71.
15. Zaidi A, Schmoeckel M, Bhatti F, Waterworth P, Tolan M, Cozzi E, et al. Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. *Transplantation.* 1998 Jun 27;65(12):1584-90.

16. Cowan PJ, Aminian A, Barlow H, Brown AA, Chen CG, Fasicaro N, et al. Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons. *Transplantation*. 2000 Jun 27;69(12):2504-15.
17. Wheeler DG, Joseph ME, Mahamud SD, Aurand WL, Mohler PJ, Pompili VJ, et al. Transgenic swine: expression of human CD39 protects against myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 May;52(5):958-61.
18. Ashton-Chess J, Meurette G, Karam G, Petzold T, Minault D, Naulet J, et al. The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide. *Xenotransplantation*. 2004 Mar;11(2):112-22.
19. Tillou X, Poirier N, Le Bas-Bernardet S, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, et al. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. *Kidney Int*. 2010 Jul;78(2):152-9.
20. Chatelais M, Devalliere J, Galli C, Charreau B. Gene transfer of the adaptor Lnk (SH2B3) prevents porcine endothelial cell activation and apoptosis: implication for xenograft's cytoprotection. *Xenotransplantation*. 2011 Mar-Apr;18(2):108-20.
21. Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, et al. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 1999 Aug 20;285(5431):1236-41.
22. Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, et al. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther*. 2006 Jan;13(1):59-66.
23. Baup D, Fraga L, Pernot E, Van Acker A, Vanherck AS, Breckpot K, et al. Variegation and silencing in a lentiviral-based murine transgenic model. *Transgenic Res*. 2010 Jun;19(3):399-414.
24. Hisashi Y, Yamada K, Kuwaki K, Tseng YL, Dor FJ, Houser SL, et al. Rejection of cardiac xenografts transplanted from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GalT-KO) pigs to baboons. *Am J Transplant*. 2008 Dec;8(12):2516-26.
25. Suyama K, Li H, Zhu A. Expression of Rh30 and Rh-related glycoproteins during erythroid differentiation in a two-phase liquid culture system. *Transfusion*. 2000 Feb;40(2):214-21.
26. Ezzelarab M, Hara H, Busch J, Rood PP, Zhu X, Ibrahim Z, et al. Antibodies directed to pig non-Gal antigens in naive and sensitized baboons. *Xenotransplantation*. 2006 Sep;13(5):400-7.
27. Byrne GW, Stalboerger PG, Davila E, Heppelmann CJ, Gazi MH, McGregor HC, et al. Proteomic identification of non-Gal antibody targets after pig-to-primate cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2008 Jul-Aug;15(4):268-76.
28. Burlak C, Wang ZY, Chihara RK, Lutz AJ, Wang Y, Estrada JL, et al. Identification of human preformed antibody targets in GTKO pigs. *Xenotransplantation*. 2012 Mar-Apr;19(2):92-101.
29. Diswall M, Angstrom J, Karlsson H, Phelps CJ, Ayares D, Teneberg S, et al. Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies. *Xenotransplantation*. 2010 Jan-Feb;17(1):48-60.
30. Byrne GW, Stalboerger PG, Du Z, Davis TR, McGregor CG. Identification of new carbohydrate and membrane protein antigens in cardiac xenotransplantation. *Transplantation*. 2011 Feb 15;91(3):287-92.
31. Zhu A, Hurst R. Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation*. 2002 Nov;9(6):376-81.

32. Ide K, Wang H, Tahara H, Liu J, Wang X, Asahara T, et al. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5062-6.
33. Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med*. 2010 Feb 3;2(17):17ra0.
34. Wu G, Pfeiffer S, Schroder C, Zhang T, Nguyen BN, Lea W, et al. Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft. *Xenotransplantation*. 2005 May;12(3):197-208.

2.4 Donnée complémentaire : Pharmacocinétique du Bortezomib

Les études publiées sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des inhibiteurs du protéasome ont été essentiellement réalisées chez les patients atteints d'un myélome (Schwartz and Davidson 2004). Aucune donnée n'était donc disponible sur l'effet objectif de cette classe thérapeutique sur la lignée B plasmatisque ainsi que les plasmocytes circulants et sur la lignée B au sein de la moelle osseuse. Cette étude a donc été réalisée chez le babouin. Cinq injections intraveineuses de Bortézomib à la dose de 1,3 mg/m² ont donc été faites à J0, 3, 7, 10, 14 et 21. Le babouin traité avait une surface corporelle estimée à 0,78 m². Les taux plasmatiques de lymphocytes T, B et NK ont été mesurés par cytométrie de flux à J0, 3, 7, 10, 14, 21, 24, 28, 31, 39, 46, 53 et 62 (Figure 11). La thrombopénie est un effet indésirable du traitement par inhibiteur du protéasome. Pouvant compliquer les xénotransplantations prévues, le taux de plaquette a également été observé. Les taux de plasmocytes dans la moelle osseuse ont été mesurés à J0, 7, 14, 21, 28, 39, 46, 53 et 62 par cytométrie de flux (Figure 12). Au préalable, les différents phénotypes des lymphocytes B et des plasmocytes au cours de leur maturation ont été discutés avec les médecins hématologues du laboratoire de biologie du CHU de Nantes. Cela a permis de mettre au point les marquages nécessaires pour le monitoring cellulaire lors de cette étude pharmacodynamique. Le phénotype des plasmocytes dit normaux (hors myélome) est CD38^{high}, CD138+, CD19+, CD 27+, CD45^{high}, CD56-.

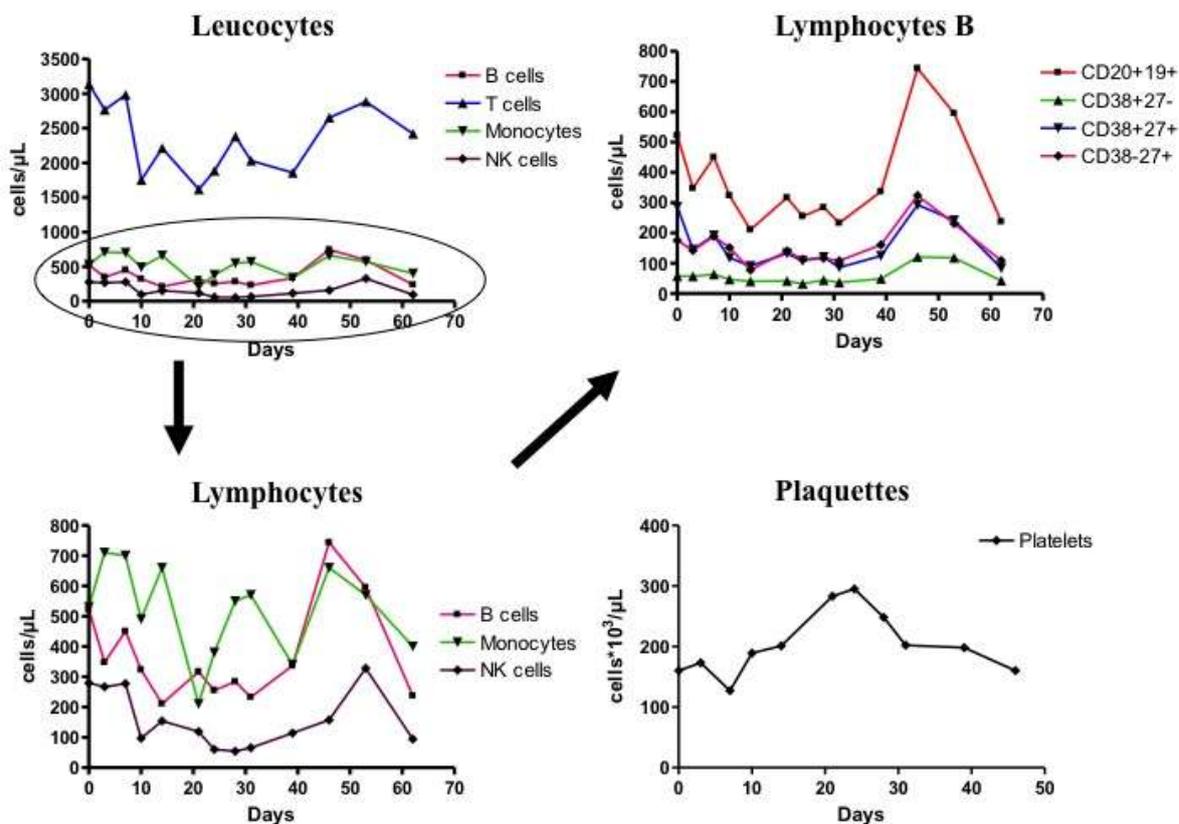


Figure 10: Effet du Bortézomib sur les taux plasmatiques des lymphocytes T, B, NK, des monocytes et des plaquettes.

On constate que les inhibiteurs du protéasome font globalement chuté les taux périphériques de lymphocytes et de monocytes. Toutefois cet effet n'est pas durable car dès J25, soit après la dernière injection de Bortézomib, ces différents taux reviennent à la normal. Il n'a pas été observé de toxicité plaquettaire.

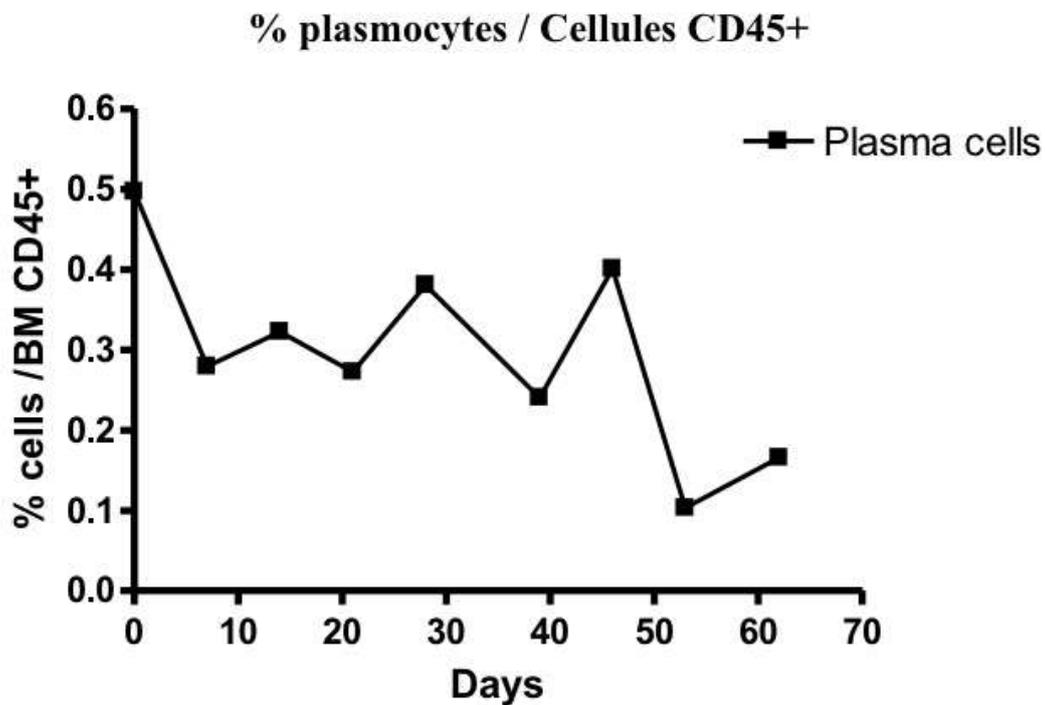


Figure 11: Effet du Bortézomib sur le taux de plasmocytes dans la moelle osseuse.

L'effet du Bortézomib semble plus nettement marqué et plus durable sur le taux de plasmocytes présents dans la moelle osseuse. Ces résultats étaient satisfaisant compte tenu de l'objectif de l'étude. En diminuant fortement le taux de plasmocytes, nous espérons diminuer la réponse humorale aux xénoantigènes. L'effet étant obtenu à partir de J10, la stratégie a donc consisté à traiter les animaux par deux cycles et demi (6 injections de J - 17 à J7) de Bortézomib.

2.5 Discussion et perspective

Tout d'abord, l'étude pharmacocinétique du Bortézomib chez le babouin a pour la première fois donnée des informations objectives de l'effet des inhibiteurs du protéasome sur les leucocytes du sang périphérique et les plasmocytes de la moelle osseuse. En transplantation d'organe l'utilisation de cette classe thérapeutique est basée sur les effets observés dans les lymphomes B, ou dans des situations d'impasse thérapeutique des rejets aigus humoraux en transplantation d'organe. Une des informations que fournit cette étude, est l'absence d'effet durable sur le taux de leucocytes périphériques car leur taux se normalise à l'arrêt du traitement. Par contre, l'effet apoptotique sur les plasmocytes de la moelle confirme l'intérêt de ce type de molécule pour le traitement des rejets aigus à médiation humorale.

Les premiers résultats expérimentaux ont montré qu'aucun receveur n'a développé de rejet suraigu après transplantation de rein porcin Gal-KO, comme cela a déjà été montré dans d'autres publications (Chen, Qian et al. 2005; Kim, Schuetz et al. 2012). Toutefois ces organes étaient également transgéniques pour hCD55 (Decay Accelerating Factor (DAF), régulateur du complément), hCD59 (Protectine, régulateur du complexe d'attaque membranaire), et hCD39 (Apyrase, inhibiteur membranaire de l'agrégation plaquettaire). Malgré la présence de ces transgènes humains, les receveurs ont présenté des rejets aigus à médiation humorale (AHXR). Ce fut inattendu car ces greffons transgéniques Gal-Ko représentent une évolution majeure pour limiter le rejet aigu en xénotransplantation. En effet la survie de ces greffons a été la même voir inférieure à celles observées avec des greffons porcins transgénique hCD55 seul. Yamada (Yamada, Yazawa et al. 2005) a obtenu des survies de 30 à 83 jours en utilisant des greffons Gal-Ko et une greffe thymique associée. Toutefois, ce modèle constitue une situation immunologique particulière qui ne peut être comparée à une transplantation rénale seule. L'utilisation de rein Gal-Ko multitransgénique ne semble pas avoir également apporté d'avantages.

En ce qui concerne la réponse immunitaire des receveurs, nos résultats ont montré une rapide et puissante réaction humorale anti-porcine dirigée contre les épitopes non-Gal exprimés par l'endothélium du greffon. Les anticorps non Gal préformés et induits ont conduit à un dépôt d'IgM au sein du greffon et une activation du complément aussi bien pour les animaux contrôles que les animaux traités. Toutefois, à ce stade, on ne peut exclure que d'autres mécanismes tels qu'une cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante, aient joué un rôle dans le

rejet, compte tenu du niveau d'infiltration macrophagique. Aucuns troubles de la coagulation n'ont été observés. Ces données suggèrent que les épitopes non-Gal, cibles majeures des IgM préformés induisent la formation des xénoanticorps anti porcs IgG. L'expression de hCD55 n'a apporté qu'une protection limitée des greffons. La stratégie d'immunosuppression reste donc un problème critique pour le succès des xéno greffes.

Tous les animaux se sont révélés négatifs pour l'infection PERV. La détection de PERV dans un hôte était probablement due à la présence de cellules porcines (microchimérisme) qui est un phénomène bien connu dans la xénotransplantation (Denner, Schuurman et al. 2009) et n'indique pas une vraie transmission de ces rétrovirus.

L'étape suivante de cette étude était donc de mieux caractériser les réponses de rejet et d'optimiser le traitement immunosuppresseur pour mieux contrôler les réponses humorales et du complément. Une stratégie simple peut s'appuyer sur des plasmaphères prétransplantation et l'injection d'inhibiteur du protéasome déjà utilisés de façon empirique en pratique clinique pour bloquer la synthèse d'anticorps en ciblant les plasmocytes. Le chef de file des inhibiteurs du protéasome est le Bortézomib. Plusieurs publications ont montré son intérêt pour traiter les rejets aigus à médiation humorale en pratique clinique. Toutefois son utilisation est basée sur des données théoriques et aucune étude expérimentale ne vient appuyer ce choix thérapeutique. Notre étude pharmacocinétique a donc confirmé ce choix empirique. Cette étude a donc été poursuivie et les résultats ont été comparés à ceux déjà obtenus. Ils font l'objet d'une publication en cours de rédaction.

Nous avons donc réalisé des xénotransplantations de rein de porcs GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg chez des babouins, et nous avons évalué si des modifications génétiques combinées apportent un avantage par rapport aux organes GT-KO seul. De plus nous avons évalué plusieurs stratégies thérapeutiques associant le blocage du complément et le blocage de la production d'anticorps afin de contrôler l'apparition d'un rejet aigu humoral (AHXR).

L'expression transgénique de hCD59 et hCD39 chez les porcs GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg utilisés comme donneurs dans notre étude, était inférieure à celles observées chez les porcs hCD55.hCD59.hHTTg d'origine et les porcs hCD39Tg (Cowan, Aminian et al. 2000; Wheeler, Joseph et al. 2012) accouplés avec la souche GT-KO (Nottle, Beebe et al. 2007) pour générer les donneurs de notre étude.

Ce phénomène est expliqué par des régulations épigénétiques comme la méthylation de l'ADN. De nombreuses études ont montré la variabilité d'expression des transgènes au cours d'une lignée et au sein même d'un individu (Hofmann, Kessler et al. 2006; Baup, Fraga et al. 2010). Il sera donc nécessaire, après de multiples reproductions, de sélectionner des lignées exprimant de façon stable et pan cellulaire les transgènes souhaités. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de rejet hyper aigu (HAR) des organes GT-KO et GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg chez le babouin avec ou sans traitement confirmant que l'absence d'épitope Gal améliore nettement les xéno greffes, à l'instar d'autres études (Chen, Qian et al. 2005; Kuwaki, Tseng et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Mohiuddin, Corcoran et al. 2012). Toutefois, les survies sont restées modestes, jusqu'à 15 jours chez les animaux traités, ne montrant aucune différence majeure entre les différents traitements et les profils génétiques des donneurs suggérant que les diverses stratégies d'immunosuppression restent insuffisantes et les transgènes supplémentaires ne semblent pas apporter d'avantage en ce qui concerne les porcs GT-KO.

En dépit d'une immunosuppression lourde associant plasmaphérèse, anti plasmocytes, inhibiteur du complément, inhibiteur de la calcineurine, inhibiteur de la synthèse des purines, stéroïdes, nous avons encore observé des AXHR et des xéno rejets aigus cellulaires (AXCR).

Cependant ces rejets ont été décrits dans des modèles de xéno greffes cardiaque (Hisashi, Yamada et al. 2008; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) ou rénales (Chen, Qian et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005), seulement quelques jours après la transplantation.

Nous avons également montré la circulation d'IgM et IgG anti-nonGal préformés chez le babouin comme cela été démontré par d'autres équipes (Chen, Qian et al. 2005; McGregor, Davies et al. 2005; Yamada, Yazawa et al. 2005; Ezzelarab, Garcia et al. 2009). Leur dépôt précoce dans le greffon et une puissance cytotoxique non négligeable, même en faible quantité, suggèrent leur implication rapide et importante dans le développement d'AHXR, sans induire d'HAR que ce soit chez les receveurs traités ou non. De plus, chez les receveurs témoins de reins GT-KO, la xéno greffe induit des anticorps IgM et Ig G et leur cytotoxicité complément dépendent était corrélée au degré d'immunisation des animaux. Comme cela a déjà été démontré (Chen, Sun et al. 2006; Ezzelarab, Garcia et al. 2009), ces résultats ont aussi été observés chez les animaux traités mais avec des profils de cytotoxicité différent surtout pour les animaux traités par plasmaphérèse et bortézomib. Le traitement par bortézomib a réduit de façon significative le taux de cellules productrices d'anticorps dans la moelle osseuse (ligné B), mais avec une faible diminution du taux d'anticorps préformés IgM/G. Seules les plasmaphérèses pré-transplantation ont été efficaces pour réduire le taux

circulant de xénoanticorps préformés, mais à chaque fois nous avons observé leur rebond dans les jours suivants, ce qui suggère une mobilisation des cellules productrices d'Ab afin de «normaliser» leur taux. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la stratégie de désensibilisation associée au blocage de la ligné B ne suffit pas à contrôler les réponses humorales xénogéniques. D'autres équipes ont utilisé le rituximab (Anticorps anti-CD20) (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012) pour contrôler la lignée cellulaire B (des cellules pré-B jusqu'aux cellules B matures) mais ce traitement pourrait ne pas détruire les cellules plasmiques qui n'expriment pas CD20. Malgré l'utilisation d'organes GT-KO, les anticorps préformés anti-nonGal semblent être une nouvelle barrière immunologique dans les xéno greffes vascularisées. L'étape suivante est donc d'identifier les cibles non Gal, pour développer de nouvelles stratégies visant à prévenir les rejets à médiation humorale.

Byrne et al. (Byrne, Stalboerger et al. 2008) par Western blot et analyse protéomique ont identifié des anticorps anti-nonGal. Dans un modèle de xénotransplantation de cœur porcin Gal-KO chez le primate, cette équipe a identifié des xénoanticorps IgG liés à la fibronectine, MG-160 (protéine de l'appareil de Golgi), diverses protéines cytoplasmiques, plusieurs protéines de choc thermique, l'annexine, et la vimentine. Irie et Saethre ont identifié l'antigène Hanganutziu-Deicher (Ide, Wang et al.), l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc), qui est un acide sialique présent sur des cellules de mammifère, mais absents des cellules chez l'homme. L'absence de Neu5Gc est due à une mutation dans le gène codant pour la CMP-NeuAc-hydroxylase, une enzyme nécessaire à sa synthèse. Il a été démontré que les anticorps anti-HD activent les cellules endothéliales Gal-KO suggérant que le xéno-antigène HD peut être une cible pertinente des anticorps anti-nonGal (Miwa, Kobayashi et al. 2004). Les résidus glucidiques α Gal est un autre xéno-antigène suspecté. Il a été montré qu'un faible niveau d'expression de glucides α Gal chez des souris déficientes en galactosyltransférase (Milland, Yuriev et al. 2007) entraîne une réponse xénogénique. Comme nous l'avons vu avec les greffes contrôles (rein de porc GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg), les receveurs traités du groupe 4 (rein de porc GT-KO), qui ne reçoivent pas de rhC1inh les premiers jours de la transplantation présentent des dépôts identiques de C3c, C4d et C5b-9 au sein des greffons suggérant que le transgène hCRP n'a apporté aucun avantage par rapport aux organes GT-KO seul. Ces résultats suggèrent, en cohérence avec de précédentes études utilisant des organes GT-KO.hCD55Tg (McGregor, Davies et al. 2005), ou GT-KO.hCD46Tg (Mohiuddin, Corcoran et al. 2012) dans un modèle de xénotransplantation cardiaque, soit que l'expression transgénique était trop faible, ce qui était clairement le cas pour hCD59, et / ou que leur

expression était efficace que peu de temps après la transplantation, et par la suite serait dépassé par la puissance cytotoxique des xéno anticorps préformés et produits.

Notre deuxième stratégie consistait à utiliser le rhC1inh. Son utilisation n'a pas pu protéger la xéno greffe au delà de l'interruption du traitement, ce qui nécessite une molécule inhibitrice du complément ayant une puissance et une cinétique plus efficace.

Ces résultats soulignent l'importance de contrôler la réponse humorale en ciblant les deux paramètres essentiels: d'abord « dépleter » les receveurs des xéno anticorps préformés et produits secondairement, en bloquant efficacement les cellules productrices d'anticorps avant et pendant la xéno transplantation, mais aussi inhiber l'activation du complément résultant de la reconnaissance des xénoantigènes par les anticorps. Une stratégie à explorer est l'utilisation de l'eculizumab, anticorps anti-C5, indiqué dans le traitement de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne et dans le syndrome hémolytique et urémique atypique (Bauters, Bordon et al. 2012; Zuber, Quintrec et al. 2012) pour bloquer plus efficacement la voie classique et alterne du complément. En ce qui concerne l'immunisation anti-nonGal, il est possible que le statut GT-KO, comme l'expression d'un transgène, perturbent l'expression des glycoprotéines de l'endothélium porcine et accentuent des réponses humorales et cellulaires non spécifiques. Une autre hypothèse, est que de nouveaux antigènes soit impliqués et que ces antigènes non Gal soient surexprimés favorisant le xénorejet. Comme cela a déjà été montré dans des modèles de greffe de cœur porcine GT-KO (Hisashi, Yamada et al. 2008; Ezzelarab, Garcia et al. 2009) et de reins GT-KO (Ezzelarab, Garcia et al. 2009), nous avons observé une forte infiltration de monocytes et macrophages dans les greffons dans tous les groupes de babouins indépendamment du traitement. L'importance de cette activation de l'immunité innée, souligne la nécessité de contrôler, en plus de la réponse humorale, la réponse cellulaire xénogénique innée par de nouvelles stratégies immunosuppressives. Ide et al. (Ide, Wang et al. 2007) ont montré dans une étude *in vitro* qu'une protéine de fusion CD47-Fc humain inhibe partiellement la phagocytose de cellules de porc par les macrophages humains. Une autre approche pourrait être la création de nouveaux porcs génétiquement modifiés exprimant la hCD47 capable d'interagir avec des SIRP α (Signaling Regulatory Protein) des primates non humains, permettant ainsi de contrôler le rejet de xéno greffe « médié » par les macrophages. Un deuxième aspect serait de bloquer directement la reconnaissance des xénoantigènes (directe et indirecte) présentés par les macrophages (les cellules présentatrices d'antigènes) pour contrôler la réponse adaptative.

En plus de l'infiltration macrophagique, nous avons aussi observé quelques lymphocytes T CD4 et CD8 s'infiltrer dans tous les greffons de tous les groupes de babouins

indépendamment du traitement. Une autre stratégie serait donc de bloquer la co-stimulation par l'utilisation d'un antagoniste de l'anti-CD28 comme il a été utilisé en allo-transplantation chez le babouin (Poirier, Azimzadeh et al. 2010) (Annexe). Dans ce modèle, notre équipe a montré que le blocage CD28 favorise l'apparition au sein du greffon et dans le sang de lymphocyte T régulateur (Treg) inhibant le rejet du greffon et la diminuant la vasculopathie d'allogreffe en synergie avec les inhibiteurs de la calcineurine (CNI). Par ailleurs, il a déjà été démontré dans un modèle de xéno greffe cardiaque de porc transgénique pour hCD55 ou hCD46 chez les babouins que le blocage de la co-stimulation ciblant CD154 et CD28/B7 (par un CTLA4-Fc) permet de bloquer l'AXCR et de moduler la réponse humorale anti-nonGal (Wu, Pfeiffer et al. 2007). Combiné avec un CNI, déjà utilisé dans notre modèle d'allotransplantation (Poirier, Azimzadeh et al. 2010), un blocage sélectif de la co-stimulation par un anticorps anti-CD28 pourrait contrôler à la fois la première partie de l'AXCR en réduisant l'infiltration T et l'AXHR en contrôlant leur activation induite par les anticorps anti-nonGal.

Conclusion

En transplantation rénale, la recherche de nouvelles thérapeutiques du rejet aigu humoral s'inscrit dans un contexte d'une augmentation du nombre de patients immunisés qui relèvent ou vont relever de plus en plus d'une deuxième voire troisième transplantation.

La première partie de ce travail a consisté à développer un modèle préclinique du rejet aigu à médiation humorale en allotransplantation, afin de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, un tel modèle n'existait pas, alors que cette physiopathologie demeure toujours mal comprise en pratique clinique, avec en particulier un arsenal thérapeutique disponible qui n'est que partiellement efficace. Nous avons donc immunisé les receveurs par deux injections consécutives de PBMC du donneur avant transplantation. Les animaux immunisés développent ainsi des anticorps cytotoxiques IgG, dirigés spécifiquement contre les molécules du CMH de classe I du donneur. Ces animaux immunisés, après transplantation rénale, développent un rejet violent très rapidement, avec une histologie évocatrice de rejet humoral, comprenant des dépôts d'Ig et de complément dans la microvascularisation. Bien que le complément semble être le bras effecteur de ce type de rejet, aucune thérapeutique actuelle de transplantation ne permet de le bloquer spécifiquement. Nous nous sommes donc intéressés à la molécule recombinante humaine du C1-inhibiteur (rhC1INH) qui permet de bloquer, dès les premières étapes, l'activation de la voie classique du complément tout en laissant indemne les voies alternes et des lectines notamment pour les défenses anti-microbiennes. Une simple monothérapie avec du rhC1INH dans ce modèle, de transplantation à « cross-match » positif, permet de prévenir efficacement le rejet aigu à médiation humorale au moins pendant le temps du traitement et jusqu'à l'apparition d'un rejet cellulaire. Ce rejet pourrait être contrôlé par une immunosuppression du lymphocyte T. Par ailleurs, la faible demi-vie de cette molécule en fait un traitement de la crise de rejet ou d'induction après transplantation mais en aucun cas un traitement d'entretien. Il sera également intéressant de l'associer à une stratégie permettant une déplétion efficace des lymphocytes B et, surtout, des plasmocytes de la moelle pour faire chuter le titre en alloanticorps.

Ce fut donc l'objet du travail suivant explorant un modèle de xénotransplantation de reins de porcs transgéniques chez le babouin. Il constitue l'un des premiers résultats de l'étude de reins GT-KO multitransgéniques pour des protéines humaines de régulation du complément en xénotransplantation. Les traitements associant inhibition du complément et

blocage de la lignée B, précédés de plasmaphérèses, n'ont pas permis d'obtenir des survies plus longues que dans la littérature. Le rejet aigu à médiation humoral avec dépôt de xénoanticorps et de complément n'a pu être contrôlé dans ce modèle. L'expression de transgènes de protéines régulatrices du complément n'a pas permis de protéger les greffons. Toutefois nous avons montré l'existence d'une pré-immunisation avec la présence d'anticorps nonGal à un titre faible, mais hautement cytotoxique. Malgré l'efficacité du bortézomib et du rhC1-INH pour bloquer la lignée B et la voie classique du complément, les xéno greffes de porc GT-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg ont été rejetées par une réponse immune combinant une infiltration du greffon par des monocytes / macrophages et les lymphocytes T, un dépôt de xénoanticorps et l'activation de la voie alterne du complément, ce qui suggère que les modifications génétiques des porc auraient ouvert d'autres réponses immunologiques xénogéniques anti-porc et que l'immunosuppression et la désensibilisation prégreffe restent un défi majeur en xénotransplantation.

A chaque obstacle franchi, il semble se dresser d'autres mécanismes de rejet mais l'étude de ces modèles permet de mieux connaître les mécanismes immunologiques impliqués dans le rejet aigu à médiation humorale que ce soit en xénotransplantation mais aussi en allotransplantation.

Références

- (2000). "Report of the Food and Drug Administration Subcommittee on Xenotransplantation: meeting of 13 January 2000, Center for Biologics Evaluation and Research." Xenotransplantation **7**(2): 75-79.
- Akiyoshi, T., T. Hirohashi, et al. (2012). "Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection." Hum Immunol.
- Andrews, P. A., W. Zhou, et al. (1995). "Tissue synthesis of complement as an immune regulator." Mol Med Today **1**(4): 202-207.
- Arumugam, T. V., T. Magnus, et al. (2006). "Complement mediators in ischemia-reperfusion injury." Clin Chim Acta **374**(1-2): 33-45.
- Ashton-Chess, J., H. L. Mai, et al. (2010). "Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection." Kidney Int **77**(10): 880-890.
- Ashton-Chess, J., G. Meurette, et al. (2004). "The study of mitoxantrone as a potential immunosuppressor in transgenic pig renal xenotransplantation in baboons: comparison with cyclophosphamide." Xenotransplantation **11**(2): 112-122.
- Ashton-Chess, J., J. C. Roussel, et al. (2003). "The effect of immunoglobulin immunoadsorptions on delayed xenograft rejection of human CD55 transgenic pig kidneys in baboons." Xenotransplantation **10**(6): 552-561.
- Bailey, L. L., S. L. Nehlsen-Cannarella, et al. (1985). "Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate." JAMA **254**(23): 3321-3329.
- Barnard, C. N., A. Wolpowitz, et al. (1977). "Heterotopic cardiac transplantation with a xenograft for assistance of the left heart in cardiogenic shock after cardiopulmonary bypass." S Afr Med J **52**(26): 1035-1038.
- Barrington, R., M. Zhang, et al. (2001). "The role of complement in inflammation and adaptive immunity." Immunol Rev **180**: 5-15.
- Barth, R. N., S. Yamamoto, et al. (2003). "Xenogeneic thymokidney and thymic tissue transplantation in a pig-to-baboon model: I. Evidence for pig-specific T-cell unresponsiveness." Transplantation **75**(10): 1615-1624.
- Bauer, A., J. Postrach, et al. (2010). "First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation." Xenotransplantation **17**(3): 243-249.
- Baup, D., L. Fraga, et al. (2010). "Variegation and silencing in a lentiviral-based murine transgenic model." Transgenic Res **19**(3): 399-414.
- Bauters, T., V. Bordon, et al. (2012). "Successful Use of Eculizumab in a Pediatric Patient Treated for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria." J Pediatr Hematol Oncol.
- Becker, Y. T., B. N. Becker, et al. (2004). "Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection." Am J Transplant **4**(6): 996-1001.
- Besse, T., L. Duck, et al. (1994). "Effect of plasmapheresis and splenectomy on parameters involved in vascular rejection of discordant xenografts in the swine to baboon model." Transplant Proc **26**(2): 1042-1044.
- Bhatti, F. N., M. Schmoekel, et al. (1999). "Three-month survival of HDAFF transgenic pig hearts transplanted into primates." Transplant Proc **31**(1-2): 958.
- Blum, M. G., B. J. Collins, et al. (1998). "Complement inhibition by FUT-175 and K76-COOH in a pig-to-human lung xenotransplant model." Xenotransplantation **5**(1): 35-43.
- Bohmig, G. A., M. Wahrmann, et al. (2011). "Transplantation of the broadly sensitized patient: what are the options?" Curr Opin Organ Transplant **16**(6): 588-593.
- Bos, I. G., C. E. Hack, et al. (2002). "Structural and functional aspects of C1-inhibitor." Immunobiology **205**(4-5): 518-533.

- Brandl, U., S. Michel, et al. (2005). "Administration of GAS914 in an orthotopic pig-to-baboon heart transplantation model." Xenotransplantation **12**(2): 134-141.
- Brewer, R. J., M. J. Del Rio, et al. (1994). "Adsorption of xenoantibodies for cardiac xenotransplantation in total lymphoid irradiation-treated baboons." Transplant Proc **26**(3): 1355-1356.
- Brickman, C. M., G. C. Tsokos, et al. (1986). "Immunoregulatory disorders associated with hereditary angioedema. I. Clinical manifestations of autoimmune disease." J Allergy Clin Immunol **77**(5): 749-757.
- Brown, K. M., E. Kondeatis, et al. (2006). "Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome." N Engl J Med **354**(19): 2014-2023.
- Burlak, C., Z. Y. Wang, et al. (2012). "Identification of human preformed antibody targets in GTKO pigs." Xenotransplantation **19**(2): 92-101.
- Byrne, G. W., P. G. Stalboerger, et al. (2008). "Proteomic identification of non-Gal antibody targets after pig-to-primate cardiac xenotransplantation." Xenotransplantation **15**(4): 268-276.
- Byrne, G. W., P. G. Stalboerger, et al. (2011). "Identification of new carbohydrate and membrane protein antigens in cardiac xenotransplantation." Transplantation **91**(3): 287-292.
- Cai, S., V. S. Dole, et al. (2005). "A direct role for C1 inhibitor in regulation of leukocyte adhesion." J Immunol **174**(10): 6462-6466.
- Calne, R. Y., D. R. Davis, et al. (1970). "Hepatic allografts and xenografts in primates." Lancet **1**(7638): 103-106.
- Calne, R. Y., H. J. White, et al. (1968). "Pig-to-baboon liver xenografts." Lancet **1**(7553): 1176-1178.
- Candinas, D., B. A. Lesnikoski, et al. (1996). "Soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor in discordant xenotransplantation." Transplant Proc **28**(2): 581.
- Caro-Oleas, J. L., M. F. Gonzalez-Escribano, et al. (2012). "Clinical Relevance of Anti-HLA Donor-Specific Antibodies Detected by Luminex Assay in the Development of Rejection After Renal Transplantation." Transplantation **94**(4): 338-344.
- Carrel, A. and C. C. Guthrie (1905). "Functions of a Transplanted Kidney." Science **22**(563): 473.
- Cerilli, G. J., L. Brasile, et al. (1981). "Clinical significance of antimonocyte antibody in kidney transplant recipients." Transplantation **32**(6): 495-497.
- Chatelais, M., J. Devalliere, et al. (2011). "Gene transfer of the adaptor Lnk (SH2B3) prevents porcine endothelial cell activation and apoptosis: implication for xenograft's cytoprotection." Xenotransplantation **18**(2): 108-120.
- Chen, G., H. Qian, et al. (2005). "Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys." Nat Med **11**(12): 1295-1298.
- Chen, G., H. Sun, et al. (2006). "The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy." Transplantation **81**(2): 273-283.
- Christiaans, M. H., R. Overhof, et al. (1996). "No advantage of flow cytometry crossmatch over complement-dependent cytotoxicity in immunologically well-documented renal allograft recipients." Transplantation **62**(9): 1341-1347.
- Cooper, D. K., P. A. Human, et al. (1988). "Effects of cyclosporine and antibody adsorption on pig cardiac xenograft survival in the baboon." J Heart Transplant **7**(3): 238-246.
- Cooper, D. K., E. Koren, et al. (1993). "Genetically engineered pigs." Lancet **342**(8872): 682-683.
- Cowan, P. J., A. Aminian, et al. (2000). "Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons." Transplantation **69**(12): 2504-2515.

- Cozzi, E., F. Bhatti, et al. (2000). "Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts." *Transplantation* **70**(1): 15-21.
- Cozzi, E., C. Vial, et al. (2003). "Maintenance triple immunosuppression with cyclosporin A, mycophenolate sodium and steroids allows prolonged survival of primate recipients of hDAF porcine renal xenografts." *Xenotransplantation* **10**(4): 300-310.
- Cugno, M., A. Zanichelli, et al. (2009). "C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress." *Trends Mol Med* **15**(2): 69-78.
- Daggett, C. W., M. Yeatman, et al. (1998). "Total respiratory support from swine lungs in primate recipients." *J Thorac Cardiovasc Surg* **115**(1): 19-27.
- Daggett, C. W., M. Yeatman, et al. (1997). "Swine lungs expressing human complement-regulatory proteins are protected against acute pulmonary dysfunction in a human plasma perfusion model." *J Thorac Cardiovasc Surg* **113**(2): 390-398.
- Dai, Y., T. D. Vaught, et al. (2002). "Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs." *Nat Biotechnol* **20**(3): 251-255.
- Davis, A. E., 3rd, S. Cai, et al. (2004). "The biological role of the C1 inhibitor in regulation of vascular permeability and modulation of inflammation." *Adv Immunol* **82**: 331-363.
- Davis, E. A., F. Jakobs, et al. (1997). "Overcoming rejection in pig-to-primate cardiac xenotransplantation." *Transplant Proc* **29**(1-2): 938-939.
- Davis, E. A., S. K. Pruitt, et al. (1996). "Inhibition of complement, evoked antibody, and cellular response prevents rejection of pig-to-primate cardiac xenografts." *Transplantation* **62**(7): 1018-1023.
- Denner, J., H. J. Schuurman, et al. (2009). "The International Xenotransplantation Association consensus statement on conditions for undertaking clinical trials of porcine islet products in type 1 diabetes--chapter 5: Strategies to prevent transmission of porcine endogenous retroviruses." *Xenotransplantation* **16**(4): 239-248.
- Diswall, M., J. Angstrom, et al. (2010). "Structural characterization of alpha1,3-galactosyltransferase knockout pig heart and kidney glycolipids and their reactivity with human and baboon antibodies." *Xenotransplantation* **17**(1): 48-60.
- Ekser, B., M. Ezzelarab, et al. (2012). "Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?" *Lancet* **379**(9816): 672-683.
- Eriksson, H. and H. O. Sjogren (1995). "Inhibition of activation of human T lymphocytes by the complement C1 esterase inhibitor." *Immunology* **86**(2): 304-310.
- Evans, P. R., L. P. Trickett, et al. (1988). "Detection of kidney reactive antibodies at crossmatch in renal transplant recipients." *Transplantation* **46**(6): 844-852.
- Everly, M. J., J. J. Everly, et al. (2008). "Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection." *Transplantation* **86**(12): 1754-1761.
- Ezzelarab, M., B. Garcia, et al. (2009). "The innate immune response and activation of coagulation in alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients." *Transplantation* **87**(6): 805-812.
- Ezzelarab, M., H. Hara, et al. (2006). "Antibodies directed to pig non-Gal antigens in naive and sensitized baboons." *Xenotransplantation* **13**(5): 400-407.
- Farkas, H., L. Gyenyey, et al. (1999). "Coincidence of hereditary angioedema (HAE) with Crohn's disease." *Immunol Invest* **28**(1): 43-53.
- Fattouch, K., G. Bianco, et al. (2007). "Beneficial effects of C1 esterase inhibitor in ST-elevation myocardial infarction in patients who underwent surgical reperfusion: a randomised double-blind study." *Eur J Cardiothorac Surg* **32**(2): 326-332.
- Fehr, T. and A. Gaspert (2012). "Antibody-mediated kidney allograft rejection: therapeutic options and their experimental rationale." *Transpl Int* **25**(6): 623-632.
- Fiane, A. E., V. Videm, et al. (1999). "C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model." *Immunopharmacology* **42**(1-3): 231-243.

- Fischel, R. J., R. M. Bolman, 3rd, et al. (1990). "Removal of IgM anti-endothelial antibodies results in prolonged cardiac xenograft survival." Transplant Proc **22**(3): 1077-1078.
- Flechner, S. M., R. Fatica, et al. (2010). "The role of proteasome inhibition with bortezomib in the treatment of antibody-mediated rejection after kidney-only or kidney-combined organ transplantation." Transplantation **90**(12): 1486-1492.
- Fukushima, N., S. R. Gundry, et al. (1996). "Histological findings in heart grafts after orthotopic pig to baboon cardiac transplantation." Transplant Proc **28**(2): 788-790.
- Galili, U., S. B. Shoheit, et al. (1988). "Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells." J Biol Chem **263**(33): 17755-17762.
- Garcia, B., H. T. Sun, et al. (2004). "Xenotransplantation of human decay accelerating factor transgenic porcine kidney to non-human primates: 4 years experience at a Canadian center." Transplant Proc **36**(6): 1714-1716.
- Ghanekar, A., G. Lajoie, et al. (2001). "Treatment with rabbit antithymocyte serum permits a cyclophosphamide-free approach to prevention of hDAF transgenic porcine kidney xenograft rejection in baboons." Transplant Proc **33**(7-8): 3849-3850.
- Griesemer, A. D., A. Hirakata, et al. (2009). "Results of gal-knockout porcine thymokidney xenografts." Am J Transplant **9**(12): 2669-2678.
- Gueler, F., S. Rong, et al. (2008). "Complement 5a receptor inhibition improves renal allograft survival." J Am Soc Nephrol **19**(12): 2302-2312.
- Hall, B. M. (1991). "Cells mediating allograft rejection." Transplantation **51**(6): 1141-1151.
- Hardinger, K. L. and D. Murillo (2011). "The influence of bortezomib on donor specific antibody reduction in patients with antibody mediated rejection." Clin Transpl: 401-408.
- Hardy, J. D. (1964). "The Transplantation of Organs." Surgery **56**: 685-705.
- Hecker, J. M., R. Lorenz, et al. (2002). "C1-inhibitor for prophylaxis of xenograft rejection after pig to cynomolgus monkey kidney transplantation." Transplantation **73**(5): 688-694.
- Heeger, P. S., P. N. Lalli, et al. (2005). "Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity." J Exp Med **201**(10): 1523-1530.
- Heying, R., W. Nurnberger, et al. (1998). "Hepatic veno-occlusive disease with severe capillary leakage after peripheral stem cell transplantation: treatment with recombinant plasminogen activator and C1-esterase inhibitor concentrate." Bone Marrow Transplant **21**(9): 947-949.
- Hisashi, Y., K. Yamada, et al. (2008). "Rejection of cardiac xenografts transplanted from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout (GalT-KO) pigs to baboons." Am J Transplant **8**(12): 2516-2526.
- Hitchcock, C. R., J. C. Kiser, et al. (1964). "Baboon Renal Grafts." JAMA **189**: 934-937.
- Hofmann, A., B. Kessler, et al. (2006). "Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model." Mol Ther **13**(1): 59-66.
- Holmes, B. J., A. Richards, et al. (2001). "Antibody responses in early graft rejection in pig-to-primate renal xenotransplantation." Transplant Proc **33**(1-2): 717-718.
- Houser, S. L., K. Kuwaki, et al. (2004). "Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons." Xenotransplantation **11**(5): 416-425.
- Huber, L., N. Lachmann, et al. (2012). "Identification and therapeutic management of highly sensitized patients undergoing renal transplantation." Drugs **72**(10): 1335-1354.
- Ide, K., H. Wang, et al. (2007). "Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5062-5066.
- Idica, A., H. Kaneku, et al. (2008). "Elimination of post-transplant donor-specific HLA antibodies with bortezomib." Clin Transpl: 229-239.

- Itescu, S., P. Kwiatkowski, et al. (1998). "Role of natural killer cells, macrophages, and accessory molecule interactions in the rejection of pig-to-primate xenografts beyond the hyperacute period." Hum Immunol **59**(5): 275-286.
- Jaboulay, M. (1906). "Greffe de reins au pli du coude par soudures arterielles et veineuses." Lyon Med **107**: 575-577.
- Jansen, P. M., B. Eisele, et al. (1998). "Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock." J Immunol **160**(1): 475-484.
- Jiang, H., E. Wagner, et al. (2001). "Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway." J Exp Med **194**(11): 1609-1616.
- Johnson, E. M., R. J. Fischel, et al. (1992). "Plasma exchange, splenectomy, and cyclophosphamide for natural antibody removal: kinetics and xenograft survival." Transplant Proc **24**(2): 701.
- Kaplon, R. J., R. E. Michler, et al. (1995). "Absence of hyperacute rejection in newborn pig-to-baboon cardiac xenografts." Transplantation **59**(1): 1-6.
- Kaplon, R. J., J. L. Platt, et al. (1995). "Absence of hyperacute rejection in pig-to-primate orthotopic pulmonary xenografts." Transplantation **59**(3): 410-416.
- Karpinski, M., D. Rush, et al. (2001). "Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch." J Am Soc Nephrol **12**(12): 2807-2814.
- Kawase, T., T. Tojimbara, et al. (2008). "Successful third kidney transplantation with intensive immunosuppression in a highly sensitized recipient." Transplant Proc **40**(7): 2428-2430.
- Kawauchi, M., M. Takeda, et al. (1994). "Cardiac xenotransplantation from pig to Japanese monkey with splenectomy, tacrolims, filtration plasmapheresis, and nafamstat mesilate." Transplant Proc **26**(3): 1076-1077.
- Kemper, C. and J. P. Atkinson (2007). "T-cell regulation: with complements from innate immunity." Nat Rev Immunol **7**(1): 9-18.
- Kemper, C., A. C. Chan, et al. (2003). "Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype." Nature **421**(6921): 388-392.
- Kessel, A., R. Peri, et al. (2012). "The autoreactivity of B cells in hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency." Clin Exp Immunol **167**(3): 422-428.
- Kim, K., C. Schuetz, et al. (2012). "Up to 9-day survival and control of thrombocytopenia following alpha1,3-galactosyl transferase knockout swine liver xenotransplantation in baboons." Xenotransplantation **19**(4): 256-264.
- Kobayashi, T., S. Taniguchi, et al. (1996). "Delayed xenograft rejection in C3-depleted discordant (pig-to-baboon) cardiac xenografts treated with cobra venom factor." Transplant Proc **28**(2): 560.
- Kolber-Simonds, D., L. Lai, et al. (2004). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7335-7340.
- Korty, P. E., C. Brando, et al. (1991). "CD59 functions as a signal-transducing molecule for human T cell activation." J Immunol **146**(12): 4092-4098.
- Kuwaki, K., Y. L. Tseng, et al. (2005). "Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience." Nat Med **11**(1): 29-31.
- Lai, L., D. Kolber-Simonds, et al. (2002). "Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning." Science **295**(5557): 1089-1092.
- Lalli, P. N., M. G. Strainic, et al. (2007). "Decay accelerating factor can control T cell differentiation into IFN-gamma-producing effector cells via regulating local C5a-induced IL-12 production." J Immunol **179**(9): 5793-5802.

- Lam, T. T., B. Hausen, et al. (2004). "Hyperacute rejection of hDAF-transgenic pig organ xenografts in cynomolgus monkeys: influence of pre-existing anti-pig antibodies and prevention by the alpha GAL glycoconjugate GAS914." Xenotransplantation **11**(6): 517-524.
- Lam, T. T., B. Hausen, et al. (2002). "Cyclophosphamide-induced postoperative anemia in cynomolgus monkey recipients of hDAF-transgenic pig organ xenografts." Transplant Proc **34**(5): 1451-1452.
- Le Bas-Bernardet, S., I. Anegon, et al. (2008). "Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation." Gene Ther **15**(18): 1247-1256.
- Le Bas-Bernardet, S., M. Hourmant, et al. (2003). "Identification of the antibodies involved in B-cell crossmatch positivity in renal transplantation." Transplantation **75**(4): 477-482.
- Lefaucheur, C., C. Suberbielle-Boissel, et al. (2009). "Clinical relevance of preformed HLA donor-specific antibodies in kidney transplantation." Contrib Nephrol **162**: 1-12.
- Leventhal, J. R., A. P. Dalmaso, et al. (1993). "Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement." Transplantation **55**(4): 857-865; discussion 865-856.
- Leventhal, J. R., R. John, et al. (1995). "Removal of baboon and human antiporcine IgG and IgM natural antibodies by immunoadsorption. Results of in vitro and in vivo studies." Transplantation **59**(2): 294-300.
- Lewis, A. G., G. Kohl, et al. (2008). "Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival." Clin Exp Immunol **153**(1): 117-126.
- Lexer, G., D. K. Cooper, et al. (1986). "Hyperacute rejection in a discordant (pig to baboon) cardiac xenograft model." J Heart Transplant **5**(6): 411-418.
- Lin, C. C., M. Ezzelarab, et al. (2010). "Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation." Am J Transplant **10**(7): 1556-1568.
- Lin, S. S., B. C. Weidner, et al. (1998). "The role of antibodies in acute vascular rejection of pig-to-baboon cardiac transplants." J Clin Invest **101**(8): 1745-1756.
- Liu, D., F. Lu, et al. (2007). "C1 inhibitor-mediated protection from sepsis." J Immunol **179**(6): 3966-3972.
- Locke, J. E., C. M. Magro, et al. (2009). "The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection." Am J Transplant **9**(1): 231-235.
- Locke, J. E., A. A. Zachary, et al. (2007). "The utility of splenectomy as rescue treatment for severe acute antibody mediated rejection." Am J Transplant **7**(4): 842-846.
- Loss, M., R. Kunz, et al. (2000). "Influence of cold ischemia time, pretransplant anti-porcine antibodies, and donor/recipient size matching on hyperacute graft rejection after discordant porcine to cynomolgus kidney transplantation." Transplantation **69**(6): 1155-1159.
- Luo, H., Y. Wu, et al. (2001). "A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection." Transplantation **72**(2): 196-202.
- Luo, Y., S. Kosanke, et al. (1998). "Comparative histopathology of hepatic allografts and xenografts in the nonhuman primate." Xenotransplantation **5**(3): 197-206.
- Magee, J. C., B. H. Collins, et al. (1995). "Prevention of hyperacute xenograft rejection by intravenous immunoglobulin." Transplant Proc **27**(1): 271.
- Mannam, V. K., R. E. Lewis, et al. (2012). "The fate of renal allografts hinges on responses of the microvascular endothelium." Exp Mol Pathol.
- Marx, G., B. Nashan, et al. (1999). "Septic shock after liver transplantation for Caroli's disease: clinical improvement after treatment with C1-esterase inhibitor." Intensive Care Med **25**(9): 1017-1020.
- Mattiuzzo, G., Y. Takeuchi, et al. (2012). "Potential zoonotic infection of porcine endogenous retrovirus in xenotransplantation." Methods Mol Biol **885**: 263-279.

- McCurry, K. R., W. Parker, et al. (1997). "Humoral responses to pig-to-baboon cardiac transplantation: implications for the pathogenesis and treatment of acute vascular rejection and for accommodation." Hum Immunol **58**(2): 91-105.
- McGregor, C. G., W. R. Davies, et al. (2005). "Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(3): 844-851.
- McGregor, C. G., D. Ricci, et al. (2012). "Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts." Transplantation **93**(7): 686-692.
- Mengel, M., B. Sis, et al. (2012). "Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection." Am J Transplant **12**(3): 563-570.
- Michler, R. E., H. Xu, et al. (1996). "Newborn discordant cardiac xenotransplantation in primates: a model of natural antibody depletion." Transplant Proc **28**(2): 651-652.
- Milland, J., E. Yuriev, et al. (2007). "Carbohydrate residues downstream of the terminal Galalpha(1,3)Gal epitope modulate the specificity of xenoreactive antibodies." Immunol Cell Biol **85**(8): 623-632.
- Minanov, O. P., S. Itescu, et al. (1997). "Anti-Gal IgG antibodies in sera of newborn humans and baboons and its significance in pig xenotransplantation." Transplantation **63**(2): 182-186.
- Miwa, Y., T. Kobayashi, et al. (2004). "Are N-glycolylneuraminic acid (Hanganutziu-Deicher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation?" Xenotransplantation **11**(3): 247-253.
- Mohacsi, P., R. Rieben, et al. (2001). "Successful management of a B-type cardiac allograft into an O-type man with 3(1/2)-year clinical follow-up." Transplantation **72**(7): 1328-1330.
- Mohiuddin, M. M., P. C. Corcoran, et al. (2012). "B-cell depletion extends the survival of GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months." Am J Transplant **12**(3): 763-771.
- Montgomery, R. A., A. A. Zachary, et al. (2000). "Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients." Transplantation **70**(6): 887-895.
- Murata, K. and W. M. Baldwin, 3rd (2009). "Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection." Transplant Rev (Orlando) **23**(3): 139-150.
- Nankivell, B. J., R. J. Borrows, et al. (2003). "The natural history of chronic allograft nephropathy." N Engl J Med **349**(24): 2326-2333.
- Nielsen, E. W., C. Waage, et al. (2007). "Effect of supraphysiologic levels of C1-inhibitor on the classical, lectin and alternative pathways of complement." Mol Immunol **44**(8): 1819-1826.
- Nissen, M. H., S. Bregenholt, et al. (1998). "C1-esterase inhibitor blocks T lymphocyte proliferation and cytotoxic T lymphocyte generation in vitro." Int Immunol **10**(2): 167-173.
- Norin, A. J., R. J. Brewer, et al. (1996). "Enhanced survival of porcine endothelial cells and lung xenografts expressing human CD59." Transplant Proc **28**(2): 797-798.
- Nottle, M. B., L. F. Beebe, et al. (2007). "Production of homozygous alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by breeding and somatic cell nuclear transfer." Xenotransplantation **14**(4): 339-344.
- Ntokou, I. S., A. G. Iniotaki, et al. (2011). "Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules." Transpl Int **24**(11): 1084-1093.

- Nurnberger, W., R. Heying, et al. (1997). "C1 esterase inhibitor concentrate for capillary leakage syndrome following bone marrow transplantation." Ann Hematol **75**(3): 95-101.
- Paradis, K., G. Langford, et al. (1999). "Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group." Science **285**(5431): 1236-1241.
- Pascual, J., M. J. Perez-Saez, et al. (2012). "Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management." Transplant Rev (Orlando).
- Perry, D. K., J. M. Burns, et al. (2009). "Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production." Am J Transplant **9**(1): 201-209.
- Phelps, C. J., C. Koike, et al. (2003). "Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs." Science **299**(5605): 411-414.
- Pierson, R. N., 3rd, J. E. Loyd, et al. (2002). "Successful management of an ABO-mismatched lung allograft using antigen-specific immunoadsorption, complement inhibition, and immunomodulatory therapy." Transplantation **74**(1): 79-84.
- Poirier, N., A. M. Azimzadeh, et al. (2010). "Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation." Sci Transl Med **2**(17): 17ra10.
- Poirier, N. and G. Blancho (2008). "Recombinant human C1-inhibitor inhibits cytotoxicity induced by allo- and xenoantibodies." Transplant Proc **40**(2): 581-583.
- Poirier, N., F. Maillet, et al. (2007). "Acute humoral rejection of renal transplants in alloimmunized pigs." J Surg Res **139**(2): 261-268.
- Poling, J., M. Oezkur, et al. (2006). "Hyperacute rejection in ex vivo-perfused porcine lungs transgenic for human complement regulatory proteins." Transpl Int **19**(3): 225-232.
- Ponticelli, C. (2012). "The mechanisms of acute transplant rejection revisited." J Nephrol **25**(2): 150-158.
- Pratt, J. R., S. A. Basheer, et al. (2002). "Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection." Nat Med **8**(6): 582-587.
- Pruitt, S., R. R. Bollinger, et al. (1996). "Continuous complement (C) inhibition using soluble C receptor type 1 (sCR1): effect on hyperacute rejection (HAR) of pig-to-primate cardiac xenografts." Transplant Proc **28**(2): 756.
- Pruitt, S. K., R. R. Bollinger, et al. (1997). "Effect of continuous complement inhibition using soluble complement receptor type 1 on survival of pig-to-primate cardiac xenografts." Transplantation **63**(6): 900-902.
- Pruitt, S. K., A. D. Kirk, et al. (1994). "The effect of soluble complement receptor type 1 on hyperacute rejection of porcine xenografts." Transplantation **57**(3): 363-370.
- Ramirez, P., R. Chavez, et al. (2000). "The porcine liver supports metabolic homeostasis in the nonhuman primate: experimental study in a model of orthotopic liver transplantation from h-DAF transgenic pig to baboon." Transplant Proc **32**(5): 1112-1113.
- Ramirez, P., M. J. Montoya, et al. (2005). "Prevention of hyperacute rejection in a model of orthotopic liver xenotransplantation from pig to baboon using polytransgenic pig livers (CD55, CD59, and H-transferase)." Transplant Proc **37**(9): 4103-4106.
- Rebibou, J. M., J. Chabod, et al. (2002). "Flow cytometric evaluation of pregnancy-induced anti-HLA immunization and blood transfusion-induced reactivation." Transplantation **74**(4): 537-540.
- Reemtsma, K., B. H. McCracken, et al. (1964). "Renal Heterotransplantation in Man." Ann Surg **160**: 384-410.
- Roslin, M. S., Z. Zisbrod, et al. (1992). "15-day survival in pig-to-baboon heterotopic cardiac xenotransplantation." Transplant Proc **24**(2): 572-573.

- Rother, R. P., J. Arp, et al. (2008). "C5 blockade with conventional immunosuppression induces long-term graft survival in presensitized recipients." Am J Transplant **8**(6): 1129-1142.
- Rucker, J., L. H. Toledo-Pereyra, et al. (1982). "Improvement of kidney transplant survival after graft pretreatment with cyclosporin A." Transplantation **34**(6): 356-359.
- Sablinski, T., P. R. Gianello, et al. (1997). "Pig to monkey bone marrow and kidney xenotransplantation." Surgery **121**(4): 381-391.
- Salerno, C. T., D. M. Kulick, et al. (2002). "A soluble chimeric inhibitor of C3 and C5 convertases, complement activation blocker-2, prolongs graft survival in pig-to-rhesus monkey heart transplantation." Xenotransplantation **9**(2): 125-134.
- Schmoeckel, M., F. N. Bhatti, et al. (1998). "Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model." Transplantation **65**(12): 1570-1577.
- Schneider, D. T., W. Nurnberger, et al. (1999). "Adjuvant treatment of severe acute pancreatitis with C1 esterase inhibitor concentrate after haematopoietic stem cell transplantation." Gut **45**(5): 733-736.
- Schreiber, C., W. Heimisch, et al. (2006). "C1-INH and its effect on infarct size and ventricular function in an acute pig model of infarction, cardiopulmonary bypass, and reperfusion." Thorac Cardiovasc Surg **54**(4): 227-232.
- Schwartz, R. and T. Davidson (2004). "Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib." Oncology (Williston Park) **18**(14 Suppl 11): 14-21.
- Sellares, J., D. G. de Freitas, et al. (2012). "Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence." Am J Transplant **12**(2): 388-399.
- Shah, A., T. Nadasdy, et al. (2004). "Treatment of C4d-positive acute humoral rejection with plasmapheresis and rabbit polyclonal antithymocyte globulin." Transplantation **77**(9): 1399-1405.
- Shimizu, A., K. Yamada, et al. (2005). "Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts." J Am Soc Nephrol **16**(9): 2732-2745.
- Shimizu, T., T. Tanabe, et al. (2012). "Clinicopathologic analysis of acute vascular rejection cases after renal transplantation." Transplant Proc **44**(1): 230-235.
- Sivasankar, B., R. M. Donev, et al. (2007). "CD59a deficient mice display reduced B cell activity and antibody production in response to T-dependent antigens." Mol Immunol **44**(11): 2978-2987.
- Starzl, T. E., J. Fung, et al. (1993). "Baboon-to-human liver transplantation." Lancet **341**(8837): 65-71.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, et al. (1964). "Renal Heterotransplantation from Baboon to Man: Experience with 6 Cases." Transplantation **2**: 752-776.
- Stegall, M. D., T. Diwan, et al. (2011). "Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients." Am J Transplant **11**(11): 2405-2413.
- Storini, C., E. Rossi, et al. (2005). "C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation." Neurobiol Dis **19**(1-2): 10-17.
- Strainic, M. G., J. Liu, et al. (2008). "Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells." Immunity **28**(3): 425-435.
- Struber, M., C. Hagl, et al. (1999). "C1-esterase inhibitor in graft failure after lung transplantation." Intensive Care Med **25**(11): 1315-1318.
- Sumitran-Karuppan, S., G. Tyden, et al. (1997). "Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells." Transpl Immunol **5**(4): 321-327.

- Suyama, K., H. Li, et al. (2000). "Expression of Rh30 and Rh-related glycoproteins during erythroid differentiation in a two-phase liquid culture system." Transfusion **40**(2): 214-221.
- Tait, B. D., C. Susal, et al. (2012). "Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation." Transplantation.
- Talbot, D., A. L. Givan, et al. (1988). "Rapid detection of low levels of donor specific IgG by flow cytometry with single and dual colour fluorescence in renal transplantation." J Immunol Methods **112**(2): 279-283.
- Terasaki, P. I. and J. D. McClelland (1964). "Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins." Nature **204**: 998-1000.
- Thielmann, M., G. Marggraf, et al. (2006). "Administration of C1-esterase inhibitor during emergency coronary artery bypass surgery in acute ST-elevation myocardial infarction." Eur J Cardiothorac Surg **30**(2): 285-293.
- Tillou, X., N. Poirier, et al. (2010). "Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons." Kidney Int **78**(2): 152-159.
- Trivedi, H. L., P. I. Terasaki, et al. (2009). "Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition." Transplantation **87**(10): 1555-1561.
- Tseng, Y. L., K. Kuwaki, et al. (2005). "alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months." Transplantation **80**(10): 1493-1500.
- Valero, R., C. Cabrer, et al. (2000). "Normothermic recirculation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors." Transpl Int **13**(4): 303-310.
- Vangerow, B., J. M. Hecker, et al. (2001). "C1-Inhibitor for treatment of acute vascular xenograft rejection in cynomolgus recipients of h-DAF transgenic porcine kidneys." Xenotransplantation **8**(4): 266-272.
- Varagunam, M., M. M. Yaqoob, et al. (2009). "C3 polymorphisms and allograft outcome in renal transplantation." N Engl J Med **360**(9): 874-880.
- Vial, C. M., D. J. Ostlie, et al. (2000). "Life supporting function for over one month of a transgenic porcine heart in a baboon." J Heart Lung Transplant **19**(2): 224-229.
- von Willebrand, E., K. Salmela, et al. (1992). "Induction of HLA class II antigen and interleukin 2 receptor expression in acute vascular rejection of human kidney allografts." Transplantation **53**(5): 1077-1081.
- Wahrmann, M., M. Exner, et al. (2006). "Pivotal role of complement-fixing HLA alloantibodies in presensitized kidney allograft recipients." Am J Transplant **6**(5 Pt 1): 1033-1041.
- Wahrmann, M., M. Haidinger, et al. (2010). "Effect of the proteasome inhibitor bortezomib on humoral immunity in two presensitized renal transplant candidates." Transplantation **89**(11): 1385-1390.
- Waiser, J., K. Budde, et al. (2012). "Comparison between bortezomib and rituximab in the treatment of antibody-mediated renal allograft rejection." Nephrol Dial Transplant **27**(3): 1246-1251.
- Walsh, R. C., R. R. Alloway, et al. (2012). "Proteasome inhibitor-based therapy for antibody-mediated rejection." Kidney Int **81**(11): 1067-1074.
- Walsh, R. C., J. J. Everly, et al. (2010). "Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection." Transplantation **89**(3): 277-284.
- Wang, H., J. Arp, et al. (2007). "Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation." J Immunol **179**(7): 4451-4463.
- Wasowska, B. A., C. Y. Lee, et al. (2007). "New concepts of complement in allorecognition and graft rejection." Cell Immunol **248**(1): 18-30.

- Waterworth, P. D., E. Cozzi, et al. (1997). "Pig-to-primate cardiac xenotransplantation and cyclophosphamide therapy." Transplant Proc **29**(1-2): 899-900.
- Waterworth, P. D., J. Dunning, et al. (1998). "Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation." J Heart Lung Transplant **17**(12): 1201-1207.
- Wheeler, D. G., M. E. Joseph, et al. (2012). "Transgenic swine: expression of human CD39 protects against myocardial injury." J Mol Cell Cardiol **52**(5): 958-961.
- Wieselthaler, G. M., H. Schima, et al. (1999). "[The DeBakey VAD axial flow pump: first clinical experience with a new generation of implantable, nonpulsatile blood pumps for long-term support prior to transplantation]." Wien Klin Wochenschr **111**(16): 629-635.
- Wouters, D., I. Wagenaar-Bos, et al. (2008). "C1 inhibitor: just a serine protease inhibitor? New and old considerations on therapeutic applications of C1 inhibitor." Expert Opin Biol Ther **8**(8): 1225-1240.
- Wu, G., S. Pfeiffer, et al. (2007). "Coagulation cascade activation triggers early failure of pig hearts expressing human complement regulatory genes." Xenotransplantation **14**(1): 34-47.
- Wu, G., S. Pfeiffer, et al. (2005). "Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft." Xenotransplantation **12**(3): 197-208.
- Wu, Y., B. Han, et al. (2004). "Dipeptide boronic acid, a novel proteasome inhibitor, prevents islet-allograft rejection." Transplantation **78**(3): 360-366.
- Yamada, K., K. Yazawa, et al. (2005). "Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue." Nat Med **11**(1): 32-34.
- Ye, Y., F. A. Neethling, et al. (1994). "Intravenous administration of alpha-galactosyl carbohydrates reduces in vivo baboon serum cytotoxicity to pig kidney cells and transplanted pig hearts." Transplant Proc **26**(3): 1399.
- Yeatman, M., C. W. Daggett, et al. (1999). "Human complement regulatory proteins protect swine lungs from xenogeneic injury." Ann Thorac Surg **67**(3): 769-775.
- Zaidi, A., M. Schmoekel, et al. (1998). "Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors." Transplantation **65**(12): 1584-1590.
- Zhang, H., G. Qin, et al. (2007). "Suppression of complement regulatory protein C1 inhibitor in vascular endothelial activation by inhibiting vascular cell adhesion molecule-1 action." Biochem Biophys Res Commun **358**(4): 1120-1127.
- Zhu, A. and R. Hurst (2002). "Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum." Xenotransplantation **9**(6): 376-381.
- Zuber, J., M. L. Quintrec, et al. (2012). "Eculizumab for Atypical Hemolytic Uremic Syndrome Recurrence in Renal Transplantation." Am J Transplant.

[see original article on page 152](#)

A complementary approach to treating antibody-mediated transplant rejection

Peter S. Heeger¹

Current treatment for antibody-mediated kidney transplant rejection is inadequate. Tillou and colleagues administered recombinant C1 inhibitor to block complement activation to prevent antibody-initiated injury in sensitized baboon recipients of kidney allografts. These early but encouraging results support further testing of the safety and efficacy of complement inhibition as part of a comprehensive strategy to treat this disease, both in animal models and ultimately in humans.

Kidney International (2010) **78**, 125–127. doi:10.1038/ki.2010.80

Because kidney allografts transplanted into sensitized recipients with donor-reactive antibodies against human leukocyte antigen (HLA) are rapidly rejected,¹ the current standard of care is to avoid transplantation in such donor–recipient combinations. As a consequence of this practice, sensitized transplant candidates have prolonged waiting times, and sensitized candidates constitute an increasingly large proportion of the transplant waiting list. Low titers of anti-HLA antibodies below detection thresholds and antibodies that develop *de novo* after transplantation can also injure allograft tissue. Acute vascular rejection, chronic fibrosis, tubular atrophy, and ultimately graft failure are in part antibody mediated.² Currently available immunosuppression adequately controls pathogenic alloreactive T cells but is inadequate to prevent or treat alloantibody formation or antibody-initiated injury. Short- and long-term kidney transplant outcomes are far worse when recipients' sera contain anti-donor HLA antibodies.^{2,3} Several strategies attempting to target antibodies and B cells, including

antibody removal by plasmapheresis, B-cell depletion with anti-CD20 (rituximab), and blockade of antibody-mediated effector functions with intravenous immunoglobulin, have met with limited success in preventing or reversing alloantibody-associated rejection (reviewed by Stegall and Gloor⁴).

Data derived from animal models and from human transplant recipients indicate that antibody-initiated complement activation is one dominant mechanism through which anti-HLA antibodies cause allograft injury. Alloantibodies that bind to HLA molecules expressed on donor endothelium are cross-linked by the C1 complex (C1qrs), which undergoes a conformational change to initiate classical pathway complement activation (Figure 1a). Cleavage of C4 and subsequently C2 yields a C3 convertase that functions as a key amplification step of the cascade. Downstream cleavage of C3 to C3b followed by cleavage of C5 to C5b releases the proinflammatory anaphylatoxins C3a and C5a, respectively, and initiates formation of the C5b-9 membrane attack complex (Figure 1a). Resultant local inflammation, denudation of the vascular endothelium, thrombus formation, and intravascular coagulation can lead to vasculitis, tissue ischemia, and ultimately graft failure. C4d, a C4 cleavage end product, covalently binds to cell membranes,

and tissue staining for C4d has been widely accepted as a diagnostic tool indicative of antibody-mediated rejection.⁵ The recognition that antibody-mediated rejection is, at least in part, classical pathway complement dependent has raised the possibility that complement inhibition could be used as a therapeutic strategy for this disease.

Tillou *et al.*⁶ (this issue) use a novel approach in an effort to prevent antibody-mediated rejection by blocking complement activation with recombinant C1 inhibitor (C1INH). C1INH is a natural, circulating, serum protein and a member of the serpin family of serine protease inhibitors.⁷ It binds to and disengages C1r and C1s, inactivating the C1 complex, thereby preventing classical pathway complement activation (Figure 1b). C1INH is not specific for the C1 complex. Other substrates include mannose-binding lectin-associated serine proteases (MASPs), which initiate the complement mannose-binding lectin pathway, the proinflammatory mediator kallikrein, and the coagulation pathway components factor XIIa and factor XIa.⁷ Deficiency or blockade of C1INH function is the etiology underlying hereditary angioedema.⁷

Tillou and colleagues⁶ developed a model of antibody-induced kidney rejection in baboons by preimmunizing the recipients with peripheral blood cells obtained from an unrelated donor. Following sensitization, the authors documented anti-donor antibodies in the serum and demonstrated that the antibodies mediated complement-dependent lysis of donor cells *in vitro*. Upon transplantation, the research group found that kidneys from the donor to which they were sensitized were rejected with accelerated kinetics as compared with controls (2 versus 6 days), and the rejected kidneys exhibited evidence of antibody-initiated, complement-mediated injury. Administration of recombinant C1INH prolonged survival of the allografts transplanted into the sensitized recipients as compared with non-sensitized controls, but rejection ensued essentially immediately upon halting of the treatment. Serum complement

¹Renal Division, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, USA

Correspondence: Peter S. Heeger, Mount Sinai School of Medicine, One Gustave Levy Place, Annenberg Building Box 1243, New York, New York 10029, USA.
E-mail: peter.heeger@mssm.edu

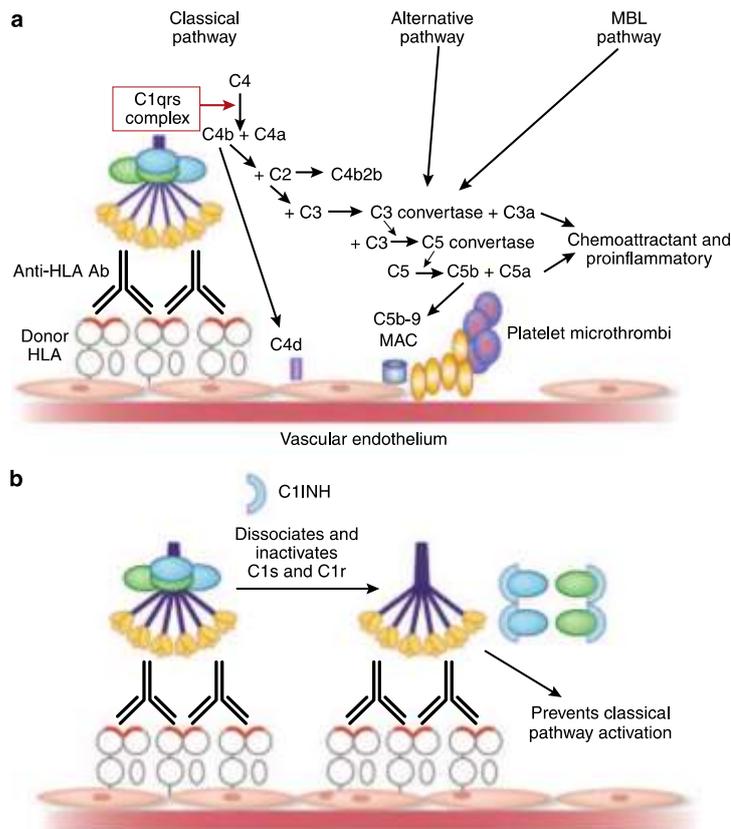


Figure 1 | Mechanism of C1 inhibitor (C1INH). Schematic diagram illustrating (a) classical pathway complement activation initiated by C1q complex cross-linking of anti-HLA antibody bound to donor vascular endothelium, and (b) the inhibitory mechanism of C1INH. HLA, human leukocyte antigen; MAC, membrane attack complex; MBL, mannose-binding lectin.

activity was diminished during therapy, and weaker staining for complement activation products was noted in biopsies of the functioning allografts in C1INH-treated animals.

Together the data provide ‘proof of concept’ that C1INH can limit complement-dependent, antibody-mediated kidney rejection in a primate model. The clinical impact of the intervention was modest, prolonging graft survival by about 4 days, and longer-term efficacy of the treatment regimen was not tested. The reported data are consistent with the interpretation that the effects of C1INH in this model are at least in part related to inhibition of classical pathway complement activation. Whether additional mechanisms are in play, including blockade of the

mannose-binding lectin pathway, inhibition of kallikrein activation, and/or the restraining of intravascular coagulation, was not determined.

The data add to the findings published by other research groups who used alternative complement inhibition strategies in attempts to prevent or treat antibody-mediated allograft injury. Transgenic overexpression of the complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55) and membrane cofactor protein (CD46), which dissociate C3 convertases (limiting downstream complement activation), has been used with limited success to prolong survival of antibody-mediated allograft and xenograft rejection in large animals.⁸ An antibody that blocks complement activation at the C5 convertase step was demonstrated

to prevent antibody-mediated heart graft injury in mice,⁹ and anecdotal reports in human kidney transplant recipients using an analogous reagent show promise.⁴

Therapy with C1INH has a theoretical advantage compared with these other approaches in that C1INH predominantly targets classical pathway complement activation, without significant effects on alternative pathway and common pathway complement function. By permitting complement-dependent protection against some invading pathogenic organisms, C1INH-induced complement inhibition could lessen the likelihood of certain opportunistic infections. Ultimately, comparative studies will be required to assess the relative efficacy and safety of the different complement inhibitors.

While complement activation clearly functions as one effector mechanism underlying antibody-induced allograft injury, alloantibodies can directly transduce proliferative signals to endothelial cells upon binding to class I HLA,¹⁰ a mechanism that probably contributes to the development of allograft vasculopathy. Alloantibodies can also cause damage through Fc receptor-dependent processes by activating macrophages and natural killer cells, among other cell types.² Thus, complement inhibition alone is unlikely to fully prevent alloantibody-initiated pathology of transplanted organs.

How could one envision using complement inhibitors such as C1INH in the transplant clinic? One possible approach would be to use this agent in the setting of antibody-mediated rejection as a temporizing treatment that prevents or halts acute complement-dependent tissue damage while additional therapies aimed at removing antibodies and/or eliminating antibody-secreting B cells and plasma cells are implemented. Without additional clinical data, the presumed risk of infection associated with complement inhibition, particularly in a setting in which other immunosuppressant drugs are being administered, is still too great for the extended use of complement inhibitors to be justified in transplant recipients. Removal of the alloantibody

(and/or its cellular source) will likely be required in order (1) to prevent recurrence of complement-mediated injury and (2) to prevent graft pathology induced by complement-independent mechanisms initiated by the alloantibody. Newer agents targeting B cells and plasma cells, including proteasome inhibitors that are currently being tested in transplantation,⁴ may prove to be more efficacious than currently available reagents for this purpose.

The report by Tillou *et al.*⁶ represents a small but important step toward developing an effective therapeutic strategy for antibody-mediated transplant rejection. The findings support further development and testing of the safety and efficacy of complement inhibition as part of a comprehensive strategy to treat this disease in humans.

DISCLOSURE

The author declared no competing interests.

REFERENCES

1. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; **280**: 735–739.
2. Vongwivatana A, Tasanarong A, Hidalgo LG *et al.* The role of B cells and alloantibody in the host response to human organ allografts. *Immunol Rev* 2003; **196**: 197–218.
3. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005; **80**: 1194–1197.
4. Stegall MD, Gloor JM. Deciphering antibody-mediated rejection: new insights into mechanisms and treatment. *Curr Opin Organ Transplant* 2010; **15**: 8–10.
5. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S *et al.* Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 574–582.
6. Tillou X, Poirier N, Le Bas-Bernardet S *et al.* Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. *Kidney Int* 2010; **78**: 152–159.
7. Wagenaar-Bos IG, Hack CE. Structure and function of C1-inhibitor. *Immunol Allergy Clin North Am* 2006; **26**: 615–632.
8. Manez R, Lopez-Pelaez E, Centeno A *et al.* Transgenic expression in pig hearts of both human decay-accelerating factor and human membrane cofactor protein does not provide an additional benefit to that of human decay-accelerating factor alone in pig-to-baboon xenotransplantation. *Transplantation* 2004; **78**: 930–933.
9. Rother RP, Arp J, Jiang J *et al.* C5 blockade with conventional immunosuppression induces long-term graft survival in presensitized recipients. *Am J Transplant* 2008; **8**: 1129–1142.
10. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009; **9**: 2459–2465.

Annexe 2 : Autres publications et communications orales

- **Publications**

ORGAN TRANSPLANTS

Inducing CTLA-4–Dependent Immune Regulation by Selective CD28 Blockade Promotes Regulatory T Cells in Organ Transplantation

Nicolas Poirier,^{1*} Agnes M. Azimzadeh,^{2*} Tianshu Zhang,^{2*} Nahzli Dilek,¹ Caroline Mary,³ Bao Nguyen,² Xavier Tillou,¹ Guosheng Wu,² Karine Reneaudin,⁴ Jeremy Hervouet,¹ Bernard Martinet,¹ Flora Coulon,¹ Emma Allain-Launay,¹ Georges Karam,¹ Jean-Paul Souillou,¹ Richard N. Pierson III,^{2†} Gilles Blancho,^{1†‡} Bernard Vanhove^{1†}

(Published 3 February 2010; Volume 2 Issue 17 17ra10)

Transplantation is the treatment of choice for patients with end-stage organ failure. Its success is limited by side effects of immunosuppressive drugs, such as inhibitors of the calcineurin pathway that prevent rejection by reducing synthesis of interleukin-2 by T cells. Moreover, none of the existing drugs efficiently prevent the eventual rejection of the organ. Blocking the CD28-mediated T cell costimulation pathway is a nontoxic alternative immunosuppression strategy that is now achieved by blockade of CD80/86, the receptor for CD28 on antigen-presenting cells. However, interaction of CD80/86 with cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) is required for immune regulation. Therefore, CD28 blockade, instead of CD80/86 blockade, might preserve regulatory signals mediated by CTLA-4 and preserve immune regulation. By using monovalent antibodies, we identified true CD28 antagonists that induced CTLA-4–dependent decreased T cell function compatible with regulatory T (Treg) cell suppression. In transplantation experiments in primates, blocking CD28 augmented intragraft and peripheral blood Treg cells, induced molecular signatures of immune regulation, and prevented graft rejection and vasculopathy in synergy with calcineurin inhibition. These findings suggest that targeting costimulation blockade at CD28 preserves CTLA-4–dependent immune regulation and promotes allograft survival.

Sci Transl Med **2**, 17ra10 (2010);

Transplant Immunology xxx (2012) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Transplant Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/trim



Gene transfer of human CD40Ig does not prevent rejection in a non-human primate kidney allotransplantation model

Mathieu Angin^{a,1}, Nicolas Poirier^a, Dilek Nazli^a, Caroline Le Guiner^b, Alice Toromanoff^b, Antoine Blancher^c, Chere Yan^d, Jack-Yves Deschamps^d, Xavier Tillou^a, Karine Renaudin^e, David Minault^a, Jeremy Hervouet^a, Gilles Blancho^a, Bernard Vanhove^a, Ignacio Anegon^a, Brigitte Le Mauff^{a,f,*}

- **Communications orales**

1^{er} auteur

1. Recombinant human C1-inhibitor prevents acute antibody-mediated rejection in alloimmunized baboons. **Tillou X**, Poirier N, et al. *European society of transplantation (ESOT-ETCO), Paris 2009*
2. Recombinant Human C1-Inhibitor prevents Acute Antibody-Mediated Rejection in alloimmunized baboon. **Tillou X**, Poirier N, Lebas Bernardet S, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, Vistolli F, Karam G, Daha M and Blancho G. *American Transplantation Congress (Sablinski, Gianello et al.), Boston (US) 2009*

Coauteur

1. Les anticorps anti-nonGal préformés sont hautement cytotoxiques même contre des organes porcins knockout pour la Galactosyl-transférase et transgéniques pour CD55, CD59, CD39 humains dans un modèle de transplantation rénale chez le babouin. Le Bas-Bernardet S, Poirier N, **Tillou X**, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, Dilek, Chatelais M, Charreau B, Branchereau J, Cowan P, D'Apice A, Galli C, Cozzi E, Soullillou JP, Blancho G. *Congrès de la Société. Francophone de Transplantation (SFT), Montpellier, 2011*
2. Les anticorps anti-nonGal préformés sont hautement cytotoxiques même contre des organes porcins knockout pour la Galactosyl-transférase et transgéniques pour CD55, CD59, CD39 humains dans un modèle de transplantation rénale chez le babouin. Le Bas-Bernardet S, Poirier N, **Tillou X**, Hervouet J, Minault D, Renaudin K, Dilek N, Chatelais M, Charreau B, Branchereau J, Cowan P, D'Apice A, Galli C, Cozzi E, Soullillou JP, Blancho G. *Congrès de la Société. Francophone de Transplantation (SFT), Montpellier, 2011*
3. Les anticorps anti-nonGal préformés sont hautement cytotoxiques même contre des organes porcins knockout pour la Galactosyl-transférase et transgénique pour les CD55, CD59, CD39 humains chez le babouin sont rejetées malgré une déplétion des plasmocytes et des lymphocytes B et un blocage du complément. Le Bas-Bernardet S, Branchereau J, **Tillou X**, Hervouet J, Minault D, Dilek N, Chatelais M, Charreau B, Renaudin K, Cowan P, D'Apice A, Galli C, Cozzi E, Soullillou JP, Blancho G. *Congrès de la Société. Francophone de Transplantation (SFT), Montpellier, 2011*
4. Xénotransplantation de rein de porc chez le babouin : persistance du rejet malgré un protocole d'immunosuppression des plus poussé. Branchereau J, Le Bas Bernardet S, **Tillou X**, Karam G, Poirier N, Gilles B. *Congrès de l'Association Française d'Urologie, Paris, Novembre 2011*
5. First xenotransplantations of GAL KO CD55, CD59, CD39, HT transgenic pig kidneys in baboons. S. Le Bas-Bernardet, **Tillou X**, N. Poirier, N. Dilek, S. Leroux, M. Chatelais, J. Devallière, B. Charreau, D. Minault, J. Hervouet, P. J. Cowan, N.M.B. Nottle, S.C. Robson, A. J.F. d'Apice, C. Galli, E. Cozzi, J.P. Soullillou, G. Blancho. *Congrès de l'International Xenotransplantation Association, Miami, Aout 2011*
6. Premières xenotransplantations de reins porcins Gal-Ko et transgéniques pour le CD 55, CD 59, CD 39 et la HT humains chez le babouin. Le Bas-Bernardet S, **Tillou X**, Poirier N, Dilek N, Leroux S, Chatelais M, Devallière J, Charreau B, Minault D, Hervouet J, Cowan PJ, Nottle NMB, Robson SC, d'Apice AJF, Galli C, Cozzi E, Soullillou JP, Blancho G. *SFT Genève 2010*
7. Selective CD28 costimulation blockade synergizes with regulatory T cell activity in a CTLA-4 dependent manner. Dilek N, Poirier N, Azimzadeh A, Zhang T, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Renaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soullillou

JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *European Society of Transplantation (ESOT), Paris 2009*

8. First xenotransplantations of GAL KO CD55, CD59, CD39, HT transgenic pig kidneys in baboons. Le Bas-Bernardet S, **Tillou X**, Poirier N, Dilek N, Leroux S, Chatelais M, Devallière J, Charreau B, Minault D, Hervouet J, Cowan PJ, Nottle NMB, Robson SC, d'Apice AJF, Galli C, Cozzi E, Soulillou JP, Blancho G. *IXA, Venise, 2009*
9. CD28 antagonist monovalent antibodies induce Tregs in baboon kidney. Poirier M, Azimzadeh A, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Reneaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soulillou JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *Congress of the Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS), San-Francisco (US) 2009*
10. Induction of Tregs by monovalent non-agonist CD28 antibodies in baboon kidney allotransplantation. Poirier M, Azimzadeh A, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Renaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soulillou JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *American Transplant Congress (Sablinski, Gianello et al.), Boston (US) 2009*
11. Immunomodulation en allotransplantation rénale chez le primate non-humain induite par un antagoniste de CD28. Poirier M, Azimzadeh A, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Renaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soulillou JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *8^{ème} Congrès de la Société Francophone de Transplantation (SFT), Québec 2008*
12. Immunomodulation induced by a CD28 antagonist in kidney baboon recipient. Poirier M, Azimzadeh A, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Renaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soulillou JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *XXII^{ème} World Congress of the Transplant Society, Sydney (Australie) 2008*
13. CD28 antagonist induce immunomodulation in kidney allograft in non-human primate. Poirier M, Azimzadeh A, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, **Tillou X**, Wu G, Reneaudin K, Hervouet J, Martinet B, Coulon C, Allain-Launay E, Karam G, Soulillou JP, Pierson R, Blancho G & Vanhove. *14^{ième} N.A.T (Nantes/Actualités/Transplantation), Nantes (France) 2008*

Etude des mécanismes du rejet vasculaire aigu à médiation humorale et application d'immunointervention innovante dans un modèle pré clinique chez le babouin et en xénotransplantation

En transplantation rénale, la recherche de nouvelles thérapeutiques du rejet aigu humoral s'inscrit dans un contexte d'augmentation du nombre de patients immunisés. La première partie de ce travail a consisté à développer un modèle préclinique du rejet aigu à médiation humorale en allotransplantation, afin de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les animaux immunisés par deux injections consécutives de PBMC du donneur avant transplantation, développent des anticorps cytotoxiques IgG, dirigés spécifiquement contre les molécules du CMH de classe I du donneur. Une simple monothérapie avec un inhibiteur du Complément (rhC1INH) dans ce modèle de transplantation à « cross-match » positif, a permis de prévenir efficacement le rejet aigu à médiation humorale pendant le temps du traitement et jusqu'à l'apparition d'un rejet cellulaire. Le travail suivant a donc été d'explorer un modèle de xénotransplantation de reins Gal-KO multitransgéniques pour des protéines humaines de régulation du complément. Les traitements associant inhibition du complément et blocage de la lignée B par un inhibiteur du protéasome, précédés de plasmaphérèse n'ont pas permis d'obtenir des survies plus longues que dans la littérature. Nous avons montré l'existence d'une pré-immunisation avec la présence d'anticorps nonGal à un titre faible, mais hautement cytotoxique. Malgré l'efficacité du bortézomib et du rhC1-INH, les xéno greffes de porc Gal-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg ont été rejetées par une réponse immune combinant une infiltration du greffon par des monocytes / macrophages et les lymphocytes T, un dépôt de xénoanticorps et l'activation de la voie alterne du complément. L'étude de ces modèles a permis de mieux connaître les mécanismes immunologiques impliqués dans le rejet aigu à médiation humorale que ce soit en xénotransplantation mais aussi en allotransplantation.

Mots clés : transplantation, xénotransplantation, complément, inhibiteur du protéasome

Study of the mechanisms of acute humoral vascular rejection and innovative immunointervention application in a preclinical model in baboons and in xenotransplantation

In kidney transplantation, the growing number of immunized patients is a motor for the development of new therapeutic management in acute humoral rejection. Part of this work was to develop a preclinical model of humoral acute rejection in allotransplantation to test new therapeutic strategies. Baboons were immunized by two consecutive injections of donor PBMC before transplantation, and developed cytotoxic IgG antibodies specifically directed against the donor's MHC class I. A simple monotherapy with an inhibitor of complement (rhC1INH) in this model (positive "cross-match" transplantation) effectively prevented acute humoral rejection during the time of treatment and until cellular rejection occurred. The following work was therefore to explore a model of Gal-KO multitransgenic for human complement regulatory proteins, in kidney xenotransplantation. Treatments involving inhibition of complement and blocking the B cells line by a proteasome inhibitor, preceded by plasmapheresis, failed to obtain longer survival rates than in the literature. Nevertheless we showed the existence of a pre-immunization with nonGal antibodies at small but highly cytotoxic levels. Despite the efficacy of bortezomib and rhC1-INH, pig xenografts Gal-KO.hCD55.hCD59.hCD39.hHTTg were rejected by an immune response combining graft infiltration by monocytes / macrophages and T lymphocytes, xenoantibodies deposits and activation of the alternative complement pathway. The study of these models gives us a better understanding of the immunological mechanisms involved in acute humoral rejection whether in xenotransplantation or in allotransplantation.

Key words: transplantation, xenotransplantation, complement, proteasome inhibitor

TILLOU Xavier
INSERM UMR1064
30, Bd Jean Monnet
44 093 NANTES Cedex 01