

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE  
U.F.R. DE MEDECINE**

Année 2012

N°

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Mention Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Mohamad ALAWIEH**

**ETUDE DES MECANISMES DE REGULATION APRES INJECTION DE CELLULES  
DENDRITIQUES ALLOGENIQUES OX62+ ASSOCIÉES A UN ANTICORPS ANTI-CD4 NON  
DEPLETANT DANS UN MODELE DE REJET CHRONIQUE CHEZ LE RAT**

*Directeur de thèse :*

Laurent MARTIN

**INSERM UMR 1098, Faculté de Médecine, Dijon**

*Jury*

Christiane MOUSSON, Professeur

Président

Dominique HESTIN-GILLE, Professeur

Rapporteur

Christophe MARIAT, Professeur

Rapporteur

Laurent MARTIN, Professeur

Directeur

*A mes parents*

*Je tiens particulièrement à rendre hommage à mes parents, sans qui, je ne serais pas celui que je suis aujourd'hui et qui m'ont soutenu tout au long de ces études et en dépit des difficultés rencontrées. C'est avec une infinie reconnaissance et un amour absolu que je veux ici témoigner de leur bonté, de leur grande intelligence et de leur dévouement.*

*A Monika*

*Les mots pour décrire mes pensées à cet instant précis se bousculent... ta joie de vivre, ton soutien et ton écoute était pour moi un bonheur au quotidien. Aussi, pour tout ce que tu représentes à mes yeux, je te souhaite une belle vie et plein de bonheur. Cette thèse a été une aventure au cours de laquelle ta présence m'a été salutaire.*

*A mes amis je tiens à rendre hommage à mes amis qui, depuis déjà 15 ans pour certains, me supportent et me permettent d'oublier les petits tracas de la vie.*

Ce travail a été réalisé, sous la direction des Professeurs **Laurent MARTIN** et **Gérard RIFLE**

En premier lieu, je souhaite vivement remercier Monsieur le Professeur **Gérard RIFLE** pour avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire, pour m'accorder sa confiance dès le début de notre rencontre et soutenu tout au long de cette thèse. Orateur de talent et charismatique, il a su transmettre à ses étudiants sa passion pour l'immunologie et représente pour nous une véritable source de motivation. J'ai énormément appris à vos côtés, tant par votre rigueur scientifique et votre culture impressionnante que par vos qualités humaines. Ainsi, parce que vous avez su rendre ces années enrichissantes et passionnantes, je souhaite vous témoigner de ma profonde gratitude.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur **Laurent MARTIN**, Pathologiste confirmé et spécialiste de la pathologie rénale au CHU du Bocage à Dijon, pour m'avoir aidé et soutenu dans cette belle aventure. Sa rigueur et son expertise scientifique, sa disponibilité, son soutien et sa gentillesse ont été pour moi un véritable moteur au cours de ces années. Un encadrement quotidien, de la mise en place du protocole à la rédaction de l'article, s'est révélé d'une efficacité redoutable. Je dois dire que je lui en suis infiniment redevable.

Je suis heureux de compter parmi les membres de ce jury Madame le Professeur **Christiane MOUSSON**, Chef du service de néphrologie-transplantation-soins intensifs. Elle m'a fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury. Sa rigueur scientifique et son expertise médicale en font une précieuse conseillère. Qu'elle trouve ici le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur le professeur **Bernard BONNOTTE** de m'avoir accueilli dans son équipe et pour m'avoir accordé sa confiance, de m'avoir encouragée et guidée et de me laisser profiter de sa grande expérience dans le domaine.

Je remercie vivement le Docteur **Fredy GUIGNIER** pour tout le temps qu'il m'a accordé, pour sa patience et sa bonne humeur et ensuite à son remplaçant, le docteur **Guillaume DAUTIN**.

Je tiens à adresser ma profonde gratitude aux Professeurs **Christophe MARIAT** et **Dominique HESTIN-GILLE** pour avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour vos précieuses évaluations. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

**Au Docteur Olivier BOCRIE,**

C'est avec une vive émotion que je m'adresse à toi. Au-delà bien sûr de ton expertise scientifique qui n'est plus à démontrer, je voudrais ici témoigner des tes grandes qualités humaines. La patience et la pédagogie dont tu as fais preuve à mon égard sont deux qualités qu'il me faut te reconnaître. Un grand merci pour le savoir-faire que tu m'as appris, ton soutien, ta disponibilité totale, tes conseils linguistiques, scientifiques et morales, ta gentillesse.

**Aux membres de l'équipe BONNOTTE de l'équipe INSERM U866,  
Malika, Jennifer, Marion, Noona et Anne,**

Je tiens à vous remercier pour votre aide et vos compétences ainsi que la disponibilité et la gentillesse dont vous avez fait preuve.

**Aux techniciens et aux techniciennes du laboratoire de Pathologie.**

**Annie, Martine, Serge, Nicole et Laetitia ;**

Je tiens à vous remercier pour vos précieux conseils en matière d'immunohistochimie, la patience, la disponibilité et la gentillesse dont vous avez fait preuve.

**Aux techniciens et techniciennes du laboratoire d'immunogénétique de l'EFS de  
Dijon,**

**Sébastien, Martine, Jeanne-lise, Nadine, Nathalie, Sophie et Carole ;**

C'est avec une sincère gratitude que je m'adresse à l'équipe du laboratoire HLA. Leur patience à mon égard lors des cross-matches ou d'isolements ganglionnaires nauséabonds, leur compétence, leur disponibilité et leur gentillesse ont été pour moi extrêmement profitables.

**Aux secrétaires et aux infirmières du service de néphrologie,**

**Isabelle, Adeline, Claudine et Hélène**

Je voudrais remercier l'équipe au grand complet pour son aide et ses précieux conseils.

**Merci aux responsables et techniciens du laboratoire d'hématologie.**

**Merci aux responsables et au personnel de l'animalerie centrale de l'Université De  
Bourgogne.**

Je veux aussi remercier toutes celles et ceux, que je n'ai pas cité ici (anonymes ou figurants), mais qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de ce mémoire et qui m'ont accompagné durant toutes ces années... je remercie également ceux qui, par leur perfidie ou leur mépris, ont parfois contribué à me donner la force de me battre.

Ce travail a été en partie financé par une bourse de la Société Francophone de Transplantation

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	2
<b>SOMMAIRE</b>	7
<b>INTRODUCTION</b>	12
<b>RAPPELS</b>	15
<b>TRANSPLANTATION</b>	16
<b>I. HISTORIQUE</b>	16
<b>II. LES LIMITES NON IMMUNOLOGIQUES</b>	18
<b>III. LES LIMITES IMMUNOLOGIQUES</b>	19
1. Les allo-antigènes	19
2. Les voies de présentation des antigènes	21
3. Les cellules dendritiques	24
4. Cellules effectrices	25
5. Activation lymphocytaire	31
6. Types de rejet	33
<b>TOLERANCE</b>	38
<b>I. TOLERANCE CENTRALE</b>	39
1. Sélection positive	39
2. Sélection négative	39
<b>II. TOLERANCE PERIPHERIQUE</b>	40
1. Ignorance	40
2. Anergie	40
3. Délétion	41
4. Déviation phénotypique	41
5. Suppression	41
<b>III. CHIMERISME ET TOLERANCE</b>	43
<b>IV. CELLULES DENDRITIQUES ET TOLERANCE</b>	45

<b>LYMPHOCYTES ET REGULATEURS CD4+ CD25+</b>	48
<b>I. MISE EN EVIDENCE DES LYMPHOCYTES REGULATEURS</b>	48
<b>II. ONTOGENE DES LYMPHOCYTES T REGULATEURS</b>	50
<b>III. MECANISME DE SUPPRESSION</b>	51
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	53
<b>I. LE MODELE ANIMAL</b>	54
1. Hébergement	54
2. Anesthésie, euthanasie	55
<b>II. METHODES</b>	55
1. Greffes de peau	55
2. Greffes de cœur	55
3. Prélèvement sanguin	56
4. Isolements	57
a. Isolement des cellules ganglionnaires mésentériques	57
b. Congélation	57
c. Isolement des cellules dendritiques spléniques OX62+	57
d. Isolement des lymphocytes T CD4+CD25+	58
5. Etude par CMF des lymphocytes T CD4+ CD25+ sanguins	60
6. Test de compatibilité croisé ou Cross-match	60
7. Evaluation histopathologique	60
8. Culture lymphocytaire mixte	61
a. Isolement de Lymphocytes et marquage par cell trace™	61
b. Culture lymphocytaires mixtes	62
9. Dosage des cytokines	62
10. Groupes expérimentaux	62
11. Analyses statistiques	62
<b>RESULTATS</b>	63
1. L'injection de cellules dendritiques allogéniques induit la formation d'anticorps anti-donneur qu'il est possible d'inhiber en associant un anticorps anti-CD4 non déplétant	64



2. L'injection de cellules dendritiques allogéniques sous couvert d'anticorps monoclonaux anti-CD4 non déplétants augmente leur « homing » 64
3. Après greffe cutanées allogéniques, le nombre de lymphocytes T CD4+CD25+ circulants est diminué dans le groupe ayant reçu des lymphocytes Treg sensibilisés avant la greffe 69
4. L'injection de CD8 OX62+ et d'anticorps anti-CD4 ou de lymphocytes T CD4+CD25+ provenant d'animaux sensibilisés induit la tolérance de transplants allogéniques cutanées ou cardiaques et empêche la production d'anticorps anti-donneur 71

**DISCUSSION** 96

**CONCLUSION/PERSPECTIVES** 102

**BIBLIOGRAPHIE** 104

**ANNEXES** 123

## Liste des abréviations

Ac	: Anticorps
AcMo	: Anticorps monoclonal
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
AlloAc	: Alloanticorps
AlloAg	: Alloantigène
AP-1	: Activator protein 1
APC	: Allophycocyanine
BcR	: B cell receptor
BFGF	: Basic Fibroblast Growth Factor
CDs	: Cellules Dendritiques
CD <sub>1</sub>	: Cellule Dendritique 1
CD <sub>2</sub>	: Cellule Dendritique 2
CE	: Cellule Endothéliale
CMF	: Cytométrie en Flux
CMH	: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	: Cellules Présentatrices d'Antigènes
CsA	: Cyclosporine A
CSH	: Cellules souches hématopoïétiques
cTEC	: Cellules épithéliales thymiques corticales
DSA	: Donor Specific Antibodies (Anticorps anti-donneur)
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F-334	: Fischer F-344
FITC	: Isothiocyanate de Fluorescéine
GAM	: Goat anti-mouse
GVH	: Graft <i>Versus</i> Host
HLA	: Human Leucocyte Antigen
ICAM-1	: Intracellular Adhesion Molecule-1
IFN	: Interféron
IgA	: Immunoglobuline A
IgE	: Immunoglobuline E
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
IF	: Immunofluorescence
IL	: Interleukine
Lew	: Lewis
LyB	: Lymphocyte B
LyT	: Lymphocyte T
mCDs	: Cellules dendritiques myéloïdes.
MMF	: Mycophénolate mofétil
MO	: Moelle osseuse
mTEC	: Cellules épithéliales médullaires
NCA	: Néphropathie Chronique de l'Allogreffe
NFAT	: Nuclear Factor of Activated T cell
NF-κB	: Nuclear Factor-Kappa B
NK	: Natural Killer
NO	: Monoxyde d'azote
PBS	: Phosphate Buffer Saline
pCDs	: Cellules dendritiques plasmocytoides.
PCR	: Polymérase Chain Reaction
PE	: Phycoérythrine

PNE	: PolyNucléaires Eosinophiles
RA	: Rejet Aigu
RC	: Rejet Chronique
RPM	: Rotation Par Minute
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
SVF	: Sérum de Veau Foetal
sIg	: Immunoglobuline de surface
TcR	: T Cell Receptor
TGF- $\beta$	: Tumor Growth Factor- $\beta$
Th	: Lymphocyte T helper
TLR	: Toll-Like Receptor
Treg	: Lymphocyte T régulateur
TNF- $\alpha$	: Tumor Necrosis Factor $\alpha$
XM	: Cross-Match

# **INTRODUCTION**

Le dysfonctionnement chronique est la cause la plus fréquente de perte tardive des transplants vascularisés. Sa pathogénie est multifactorielle, incluant des facteurs immunologiques et non immunologiques (*Tullius et Tillney, 1995*). Parmi les facteurs immunologiques, la production d'anticorps anti-HLA spécifique du donneur (DSA) est l'un des principaux mécanismes impliqués dans la survenue des lésions qui touchent la microcirculation et les gros vaisseaux des transplants allogéniques (*Joosten et al, 2003, Yates et Nicholson 2006*). La présence de DSA, associée à ces lésions, permet de définir le rejet chronique.

La manipulation du système immunitaire avant la transplantation serait à même d'induire un état de tolérance vis à vis des allo-antigènes et d'empêcher l'apparition de DSA. Au cours de la réponse immunitaire, les cellules effectrices sont généralement inhibées par des cellules régulatrices. Les lymphocytes T régulateurs (Treg), qui comprennent les Treg naturels (nTreg) CD4+CD25+FoxP3+ d'origine thymique et les Treg inductibles (iTreg) CD4+FoxP3+ qui se développent en périphérie, sont les principales cellules régulatrices étudiées (*Shevach 2006, Josefowicz et Rudenski 2010*). Les Treg agissent à plusieurs niveaux. Ils sont capables d'inhiber directement l'activation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs CD4+ et CD8+ et de moduler les fonctions des cellules présentatrices d'antigènes (*Issa et Wood, 2010*). Ils peuvent aussi interagir avec les cellules NK, les cellules NKT, les mastocytes et les lymphocytes B qui donnent naissance aux plasmocytes producteurs d'anticorps.

Chez le rat, la combinaison Lewis/Fischer, en présence de faibles doses d'immunosuppresseurs, est le modèle de rejet chronique qui a été le plus étudié. Bien que l'étude des sous-populations lymphocytaires et des mécanismes immunologiques soient plus restreintes que chez la souris, le rat, en raison de sa taille, permet de greffer plus facilement des organes vascularisés comme le cœur. Chez le rongeur, l'injection d'antigènes du donneur en présence d'anticorps bloquant le premier ou le second signal permet d'obtenir la tolérance de transplant allogénique. Les études réalisées à ce jour ont surtout étudié la réponse lymphocytaire T. Peu de travaux ont été consacrés à la réponse humorale et la conséquence de ces protocoles sur la production de DSA.

Dans un travail antérieur effectué au Laboratoire, il a été montré que les cellules dendritiques allogéniques OX62+ provenant de rat Fischer pouvaient être détectées, après marquage *ex vivo* par un traceur fluorescent (PKH26), chez le receveur (rats Lewis). Cette injection de cellules dendritiques se traduit par une réponse humorale anti-donneur, mise en évidence grâce à des tests de compatibilité croisée ou cross matches, réalisés avec les cellules du donneur. L'injection de cellules dendritiques du donneur sous couvert d'anticorps anti-CD4 inhibe la réponse humorale anti-donneur et génère des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ spécifiques du donneur.

Dans ce travail, nous avons évalué, dans une combinaison Fischer/Lewis l'impact de ce protocole associant chez le receveur avant la transplantation, l'injection de cellules dendritiques spléniques OX62+ du donneur et d'un anticorps anti-CD4 non déplétant, sur le devenir de transplants cardiaques allogénique et la réponse humorale anti-donneur.

# RAPPELS

# TRANSPLANTATION

## I. HISTORIQUE

L'homme a inauguré par des légendes et des mythes ce qui aujourd'hui est une réalité scientifique et humaine. Le Sphinx, le Centaure et d'autres êtres composites (Horus, Anubis..) ont magnifié et sacralisé ce rêve singulier: la greffe. L'essence divine fût longtemps associée à cet acte de création. La Genèse nous apprend que Dieu fit la femme avec une côte prélevée sur l'homme, qui avait été plongé dans un profond sommeil. Le geste de Jésus, rapporté par Jean, qui recolla l'oreille tranchée d'un homme témoigne de l'idée de la greffe, mais ici il s'agit peut-être ici plus d'un «miracle» que de chirurgie.

Au fil des siècles, légendes, mythes et miracles vont perpétuer cette idée chimérique de la transplantation. L'histoire de Come et Damien va alors la faire basculer dans le possible. De multiples réticences persisteront sur les limites concevables de cette intervention, mais les expériences vont se poursuivre et participer à l'accumulation des connaissances en faveur de la greffe.

L'histoire scientifique de la greffe humaine n'apparaît véritablement qu'au début du XXème siècle, même si quelques tentatives sont rapportées entre la Renaissance et le XIXème siècle. On peut citer la première greffe de peau par Reverdin en 1869, puis la première greffe de cornée en 1914 par Elschwig à Prague et le travail important d'Alexis Carrel dès 1904 au Canada et USA notamment.

Dans le courant de la seconde guerre mondiale, un gros effort a été mené par les chirurgiens britanniques pour traiter les pilotes de la Royal Air Force accidentés, et parfois défigurés pendant la bataille d'Angleterre. Medawar, alors jeune chercheur, montre un intérêt marqué pour le problème des homogreffes qui étaient la plupart du temps rejetées rapidement. Ses premiers articles publiés entre 1944 et 1946, constituent le début de l'ère moderne de la recherche en transplantation. Il démontre, chez le lapin, que le rejet de greffes est un mécanisme actif possédant une mémoire, puisque une seconde greffe, identique à la première, déclenche un rejet accéléré encore plus violent. Plus tard, associé à Brent et Billingham, en



s'appuyant sur l'observation des jumeaux non-identiques chimériques félins, il démontre qu'il est possible de rendre un animal tolérant en lui injectant, dans sa période périnatale, des cellules allogéniques. Ils posent ainsi les fondements des mécanismes de rejet et de tolérance immunitaire.

Après le début convaincant des greffes de cornées à la fin des années 40, la transplantation d'organe restera longtemps inaccessible en raison de l'absence de traitements efficaces contre le rejet. Elle devient réalité chez l'homme d'abord en janvier 1951 avec les essais de trois équipes de chirurgiens français (Dubost et Oeconomos, Servelle et Rougeulle, Küss et Teinturier) qui mettent au point la technique chirurgicale, puis en 1952 dans l'unité de Hamburger à l'hôpital Necker avec une greffe entre une mère et son fils qui fonctionnera 21 jours. Finalement en 1954, la démonstration de l'obligatoire compatibilité est faite : la greffe réalisée par Murray aux Etats Unis entre deux vrais jumeaux est une réussite. Le greffé épouse son infirmière... La transplantation entre peu à peu dans le champ des pratiques thérapeutiques. En 1956 à Boston puis à Paris, sont effectuées des greffes entre faux jumeaux avec irradiation et corticoïdes. On perçoit bien que l'on ne peut pas rester à la greffe entre jumeaux et que l'obstacle de l'incompatibilité biologique doit être franchi. Le Professeur Jean DAUSSET montrera que l'expression génétiquement déterminée d'antigènes à la surface des cellules, régulent la réponse immunitaire. Il obtiendra pour ses travaux le prix Nobel de Médecine en 1960.

Durant les deux premières décennies, l'appariement entre donneur et receveur et une immunosuppression globale du receveur (splénectomie, irradiation partielle ou totale et corticoïdes, azathioprine puis sérums anti-lymphocytaires dans les années 60) étaient les seules armes à la disposition des cliniciens pour juguler le rejet de greffe.

En 1967, la première greffe cardiaque humaine, réalisée au Cap en Afrique du sud par le professeur Christian Barnard, va avoir un retentissement mondial tant sur le plan éthique que scientifique. Scepticisme, protestation et réalisme diviseront la communauté scientifique; optimisme ou réprobation partageront l'opinion publique. La première transplantation cardiaque en Europe date de 1968 (la 7<sup>ème</sup> au monde) à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière à Paris. Le patient vivra quelques

jours. D'autres transplantations (foie, cœur-poumons, pancréas) suivront. Mais il faudra de nombreuses années pour sortir cette pratique de la thérapeutique d'exception. Aujourd'hui c'est une chirurgie de pointe efficace, attendue par des milliers de personnes chaque année.

L'arrivée de la ciclosporine A, dans les années 80, puis d'autres molécules immunosuppressives (tacrolimus, mycophenolate mofetil...), a contribué à l'essor des transplantations. Néanmoins, la toxicité de ces molécules ainsi que leurs nombreux effets secondaires (maladies infectieuses opportunistes, cancers, ...) restent des problèmes non résolus. En outre, si des progrès importants ont été réalisés dans le contrôle des rejets aigus, le rejet chronique qui se développe à bas bruit au fil des années, reste un obstacle majeur au succès à long terme des transplantations d'organes vascularisés. Seule une tolérance durable permettrait de s'affranchir de ces barrières.

Notre travail s'inscrit dans la perspective des nombreux essais visant à induire un état de tolérance aux alloantigènes. Parmi les nombreuses approches utilisées pour l'induction de tolérance, nous avons choisi d'étudier chez le rat, les effets sur la réponse alloréactive, notamment humorale, de l'injection au receveur de cellules dendritiques (CDs) matures du donneur, associées à un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD4. Le modèle choisi est une combinaison rats Lewis/rats Fisher. Nous justifierons ce choix après avoir fait le point sur les principales connaissances actuelles concernant les mécanismes des rejets d'allogreffes et de tolérance et sur les pistes choisies pour tenter d'induire la tolérance.

## **II. LES LIMITES NON IMMUNOLOGIQUES**

Chez l'homme, l'appréhension du don d'organe dans nos sociétés et les altérations subies par les organes avant leur transplantation sont les principaux facteurs non immunologiques qui limitent le recours et/ou le succès des transplantations. Chez l'animal, en situation expérimentale, la pénurie d'organe et les altérations liées à la mort cérébrale sont des limites qui n'existent pas. Nous ne développerons donc dans ce paragraphe que les conséquences sur l'organe à transplanter du

prélèvement et de sa réimplantation chez le receveur, regroupées sous le terme de lésions d'ischémie/reperfusion (*Perico et al., 2004*).

Après son prélèvement l'organe est conservé stérilement dans des conditions anaérobies qui provoquent l'accumulation de métabolites toxiques et des lésions cellulaires. L'absence d'oxygène entraîne une glycolyse anaérobie et conduit à la production de radicaux libres, d'acide urique et d'acide lactique qui abaisse le pH intracellulaire. La diminution des stocks d'ATP se traduit par un dysfonctionnement de la pompe Na/K perturbant l'homéostasie des électrolytes et augmentant l'activité des protéases. Enfin, l'inhibition de la fixation des métaux sur leur protéine de transport (transferrine, ferritine) favorise la génération de radicaux libres et de monoxyde d'azote (NO). Le NO joue probablement un rôle important car l'inhibition *in vivo* de la NO synthase protège le rein des effets néfastes de l'ischémie (*Noiri et al., 2001*).

Après la réimplantation, le réchauffement et la ré-oxygénation de l'organe permettent le retour à un métabolisme aérobie et à la production d'ATP mais induisent aussi la production de radicaux libres qui dépasse les capacités de régulation, provoquant la mort par apoptose de nombreuses cellules et favorisant le développement d'un environnement inflammatoire.

Ces altérations activent les cellules endothéliales qui vont exprimer des molécules d'adhérence comme ICAM-1 et VCAM permettant le recrutement de leucocytes. Elles favorisent également la sécrétion d'IL-8 qui intervient dans le recrutement de polynucléaires neutrophiles et l'entretien du processus inflammatoire.

### **III. LES LIMITES IMMUNOLOGIQUES**

#### **1. Les allo-antigènes**

Les cellules du greffon expriment à leur surface des antigènes susceptibles d'activer le système immunitaire du receveur : ce sont les allo-antigènes dont les principaux sont ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les antigènes mineurs d'histocompatibilité et les antigènes de groupe sanguin peuvent également participer à la réaction de rejet.

- **Complexe majeur d'histocompatibilité**

Les différences qui existent entre les antigènes (Ag) du CMH du receveur et du donneur sont probablement les principaux facteurs qui empêchent la survie des transplants allogéniques, en l'absence de traitement immunosuppresseur.

Chez le rat le CMH ou complexe RT1 est localisé sur la partie télomérique du bras court du chromosome 20 (*Dressel et al., 2001 ; Eberhard et Lutz., 2001*). L'orientation du complexe RT1 par rapport au centromère est le même que celle du système HLA chez l'Homme. On distingue plusieurs grandes régions qui sont les régions RT1-A (région centromérique de classe I), RT1-B/D (région de classe II), la région de la classe III, et RT1-C/E/M (la région télomérique de classe I).

Les molécules de classe I sont exprimées de manière constitutive par toutes les cellules nucléées. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une chaîne  $\alpha$  polymorphe à trois domaines associée de façon non covalente à la  $\beta$ 2-microglobuline. Elles permettent la présentation à la surface de la cellule de peptides endogènes au cours d'infection virale ou de cancer, pour qu'ils soient reconnus par le système immunitaire. Les cellules dendritiques ont également la possibilité de présenter des peptides exogènes en association avec les molécules de classe I par un mécanisme de présentation croisée ou *cross priming* (*Ackerman et al., 2004*).

Les molécules de classe II ont une distribution plus restreinte. Elles sont exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CDs, macrophages, lymphocytes B) et des cellules épithéliales thymiques. Sous l'influence de cytokine comme l'IFN- $\gamma$ , les cellules endothéliales et les lymphocytes activés peuvent exprimer ces molécules. Elles sont constituées de deux chaînes polymorphes  $\alpha$  et  $\beta$  qui permettent la présentation de peptides exogènes aux LyT CD4+.

- **Complexe mineur d'histocompatibilité**

Les antigènes mineurs d'histocompatibilité peuvent correspondre à des glycoprotéines membranaires n'appartenant pas au CMH ou à des protéines

intracellulaires comme des facteurs de transcription ou la myosine (*Rotzschke et al., 1991; Walny et Rammensee, 1990*).

## **2. Les voies de présentation des antigènes**

La reconnaissance des alloAg par les cellules immunitaires du receveur peut se faire de trois manières : la présentation directe par l'intermédiaire des CDs du donneur, la présentation indirecte par l'intermédiaire des CDs du receveur et (*Gould et al., 1999*) la présentation semi-directe (*Jiang et al., 2004*). La figure 2 résume ces différentes voies de présentation.

- **Présentation directe**

La présentation directe ne s'observe qu'en situation d'allo-incompatibilité, c'est l'originalité de la réponse allo-immune. Elle fait intervenir les CDs du donneur qui présentent les alloAg HLA dans leur intégralité soit au LyT CD8+ (Ag de classe I) soit aux LyT CD4+ (Ag de classe II). Les répertoires des LyT générés par ces deux principales voies de présentation de l'Ag (directe et indirecte) sont totalement différents et non redondants. L'intensité de la réaction immunitaire liée à la voie de présentation directe est 100 fois supérieure à celle induite par la voie indirecte et son déroulement beaucoup plus rapide (*Cramer et al., 1998, Suchin et al., 2001*). Plusieurs hypothèses complémentaires peuvent être proposées pour expliquer la fréquence élevée (5 à 10%) des clones alloréactifs : la capacité des TCR à réagir avec les antigènes du CMH de l'espèce (*Jerne et al., 2004 ; Zerrahn et al., 1997*), la capacité du TCR à se lier avec une forte affinité à la molécule du CMH allogénique et enfin, l'existence à la surface des CD d'un grand nombre de complexe immunogène peptide/CMH (*Matzinger et al., 2011*).

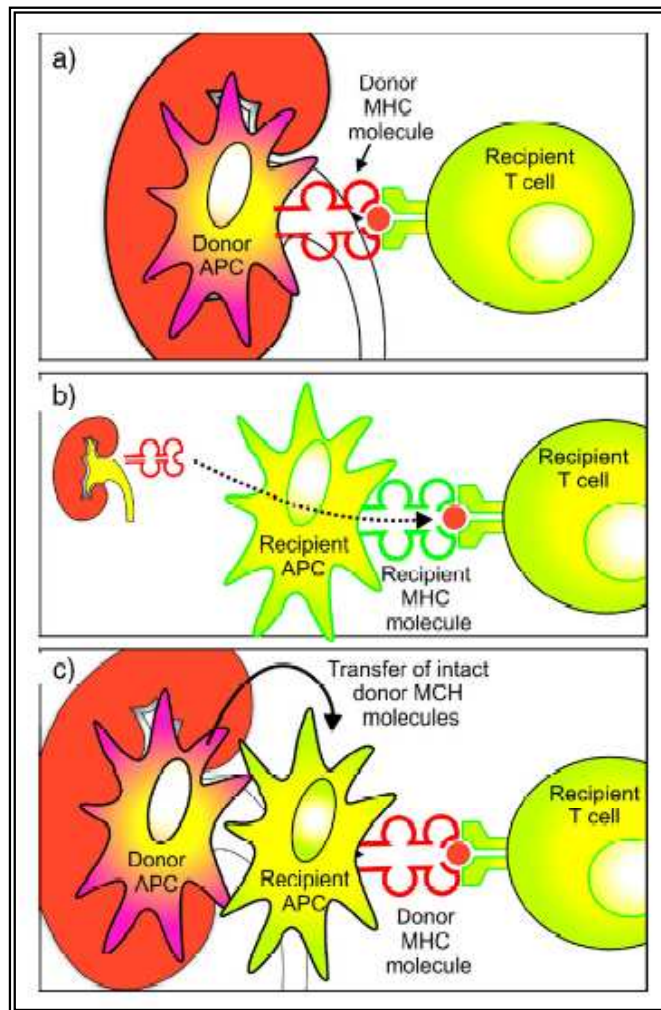
- **Présentation indirecte**

La présentation indirecte est un processus physiologique qui intervient lors de la prise en charge de peptides solubles par les CDs. C'est en mettant en évidence des molécules HLA au sein de greffon humain que Charlton et al. (*Charlton et al., 1970*) ont suggéré que ces molécules peuvent être une source de peptides immunogènes présentés par les CPA du receveur. Au début des années 1980, Lechler et al. (*Lechler et al., 1982*) ont montré que la présentation indirecte pouvait contribuer à la destruction du greffon. Ils ont en effet observé que la

transplantation de reins de rat, déplétés en «leucocytes passagers» (CPA du donneur), ne provoquait pas de RA mais une dégradation progressive et irréversible de la fonction du greffon. L'importance de la présentation indirecte dans la genèse de ces lésions du RC a été confirmée par Benichou et al. (*Benichou et al., 1992*). Après la transplantation, les alloAg de classe I ou de classe II, libérés par les cellules du greffon, sont pris en charge par les CDs du receveur puis présentés au LyT CD4+ en association avec les molécules HLA de classe II (*Sherman et al., 1993*).

- **Présentation semi-directe**

Les 2 voies de présentation décrites ci-dessus ne permettent toutefois pas de tout expliquer. Il a été montré que l'activation des LyT CD8+ liée aux CDs du donneur (voie de présentation directe) pouvait être amplifiée par les LyT CD4+ activés par les CDs du receveur (voie de présentation indirecte). De façon parallèle, les LyT régulateurs CD4+ générés par des protocoles utilisant des Acs non dépletants anti-CD4 et anti-CD8 (voie de présentation indirecte) pouvaient réguler des LyT CD8+ activés par les CDs du donneur (voie de présentation directe). Le groupe de Robert Lechler a suggéré récemment qu'une troisième voie de présentation, la voie de présentation semi-directe (figure 1), pourrait expliquer ces discordances apparentes et faire le lien entre les voies de présentation directe et indirecte. Cette troisième voie de présentation serait liée au transfert actif de molécules intactes du CMH provenant de CDs ou de cellules endothéliales (CE) vers d'autres CDs. Dans le contexte d'une transplantation allogénique, les CDs du receveur pourraient ainsi acquérir et présenter des molécules HLA de classe I intactes aux LyT CD8+ tout en conservant la possibilité de présenter les mêmes peptides allogéniques par la voie de présentation indirecte (*Herrera et al, 2004*).



**Figure 1 : Différentes voies de reconnaissance des antigènes.** Dans la voie de présentation directe (a), les LyT du receveur reconnaissent les molécules intactes du CMH du donneur à la surface des CPA du donneur. Dans la voie de présentation indirecte (b), les molécules du CMH du donneur sont internalisées et présentées aux LyT du receveur. Dans la voie semi-directe, les molécules du CMH intactes du donneur sont transférées des CPA du donneur vers les CPA du receveur puis présentées aux LyT du receveur. Les CPA du receveur peuvent donc présenter des peptides simultanément par la voie indirecte et semi-directe (D'après Caballero *et al.*, 2006).

### 3. Les cellules dendritiques

Les CD sont les principales CPA professionnelles, capables d'activer les LyT naïfs (*Ichim et al., 2003*). Elles constituent un ensemble de cellules hétérogènes. On distingue aujourd'hui classiquement 2 principales sous populations de CD: les CD d'origine myéloïde (mCDs) et les CD dérivés de précurseurs plasmocytoïdes (pDC)

L'association des peptides immunogènes aux molécules HLA de classe I ou de classe II exprimées à la surface des CD est indispensable à la présentation de l'Ag aux LyT. On sait aujourd'hui que les cellules T alloréactives sont capables de répondre à de multiples complexes CMH-peptides (*Felix et al., 2007*). Les CD jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire, mais jouent aussi un rôle dans l'induction de tolérance (*Steinmann et al., 2002*). Les CD ont une distribution ubiquitaire et leur fonction dépend de leur état d'activation. Les CD immatures ont de forte capacité de capture des Ag mais une faible capacité d'activation des LyT naïfs. Ces cellules agissent comme des sentinelles permettant de détecter les signaux de danger (toxines, allergènes, virus, nécrose) (*Matzinger et al., 1999*). Les CD immatures capturent l'Ag par phagocytose, micropinocytose ou par endocytose grâce aux récepteurs Fc de type I ou II ou aux récepteurs de type lectine. L'Ag pris en charge par les CD va subir un apprêtement qui lui permettra d'être associé aux molécules HLA de classe I ou de classe II.

Le peptide est présenté correctement aux LyT si celui-ci est associé à un signal de maturation. Ces signaux peuvent être de différentes natures. Il peut s'agir de molécules associées aux agents pathogènes (LPS, ADN), de cytokines pro-inflammatoires (IL1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), de cellules apoptotiques ou de protéines de choc thermique (HSP). Les signaux associés aux agents pathogènes sont détectés par les récepteurs de type Toll (TLR) exprimés à la surface des CD (TLR4) ou présents dans les vacuoles d'endocytose (TLR9). L'Ag digéré est associé aux molécules de classe I ou de classe II du CMH. Les CD migrent vers les organes lymphoïdes. Au cours de cette migration, elles poursuivent leur maturation qui s'accompagne de modifications morphologiques (acquisition de dendrites) et



phénotypiques (augmentation de l'expression membranaire de molécules HLA de classe II et de molécules co-stimulatrices comme CD80 et CD86). Les CD matures peuvent alors activer les LyT naïfs selon différentes modalités qui vont être décrites dans le chapitre suivant. Le rôle des CD n'est pas univoque. Des études récentes ont montré que les pCDs et les CD matures pouvaient avoir dans certaines conditions un rôle tolérogène (*Lutz et Schuler, 2002*).

Chez le rat, différentes sous populations de CD ont été décrites, tout d'abord par le groupe de Mac Pherson, sur la base de l'expression de CD4 et SIRP $\alpha$  (CD172) (*Turnbull et al., 2000*). L'équipe de Josien et al. a récemment décrit dans la rate, les ganglions lymphatiques et le thymus des CD OX62+ qui représentent respectivement 80, 55 et 70% des CD totales. Les CD OX62- qui expriment CD4 correspondraient à des CD plasmocytoïdes. Il existe 2 populations de CD OX62+ : l'une est CD4- et l'autre CD4+. Ces CD expriment également CD5, SIRP $\alpha$  et CD90 (*Trinite et al., 2000*). Elles sont présentes en proportion à peu près égale (ratio 1:1). Les CD CD4- produisent de l'IL-12 qui induit une différenciation de type Th1 tandis que les CD CD4+ produisent peu ou pas d'IL-12 et induisent la différenciation de lymphocytes T non polarisés dite Th0 (*Voisine et al., 2002*).

#### **4. Cellules effectrices**

- **Lymphocytes T CD4+**

Les LyT CD4+ jouent un rôle essentiel dans la réaction de rejet (*Krieger et al. 1996*). Ces cellules peuvent se différencier en 3 sous types principaux caractérisés par les cytokines qu'elles produisent. Les lymphocytes T helper (Th) CD4+ de type 1 (Th1) produisent de l'interféron (IFN)- $\gamma$  et de l'IL2. Ces cytokines contribuent à l'activation des LyT cytotoxiques CD8+ et de la réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) médiée par les macrophages. L'expression de Fas-ligand (FasL) par les LyT CD4+ de type Th1 leur confère en outre une action cytotoxique directe. Les LyT CD4+ de type Th2 sécrètent IL4, IL5, IL9, IL10 et IL3. Ces cytokines activent les PNE qui peuvent à eux seuls provoquer une réaction de rejet. Contrairement aux cellules de type Th1, les LyT CD4+ de type Th2 n'expriment pas FasL et n'ont donc pas de pouvoir cytotoxique direct. Récemment, les LyT CD4+ de type Th17 qui expriment le facteur de transcription

ROR- $\gamma$ t et secrètent de l'IL17, IL21, IL22 et IL23, ont été décrits (*Accosta-Rodriguez et al., 2007, Cosmi et al., 2008*). L'IL-17 cytokine pro-inflammatoire était connue pour recruter et activer les polynucléaires neutrophiles et stimuler la granulopoïèse (*Laan et al., 1999, Forlow et al., 2001*). Les Ly Th17 pourraient participer au rejet par l'intermédiaire notamment de la sécrétion d'IL-21 qui favorise la formation de follicules lymphoïdes tertiaires et le développement d'une réponse humorale au sein du transplant (*Deteix et al., 2010*).

La différenciation des LyT CD4+ selon un mode de type Th1 Th2 ou Th17 est influencée par le type de cytokines et le phénotype des CD8 (*Moser et al., 2010*). L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  induisent une différenciation de type Th1 en agissant directement sur les précurseurs CD4+ et en inhibant la croissance des clones Th2. Chez l'homme, les CD8 peuvent être schématiquement divisées en 2 groupes : Les CD8 fortes productrices d'IL12 (CD1) et les CD8 faibles productrices d'IL12 (CD2). Ces 2 types de CD8 ont des précurseurs différents. CD1 proviennent des monocytes d'origine myéloïde alors que CD2 sont issues des CD8 plasmocytoïdes. Par ailleurs, les CD8 isolées de la rate provoquent une réaction de type Th1 alors que les CD8 isolées de l'intestin, des poumons et du foie induisent une réaction de type Th2. En outre, l'activation de LyT CD8+ par des Ag HLA de classe I prévient la formation de clone Th2. En l'absence de LyT CD8+ la réaction immunitaire est mixte associant des cellules de type Th1 et Th2. La polarisation Th17 est favorisée par la présence d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$ .

- **Lymphocytes T cytotoxiques CD8+**

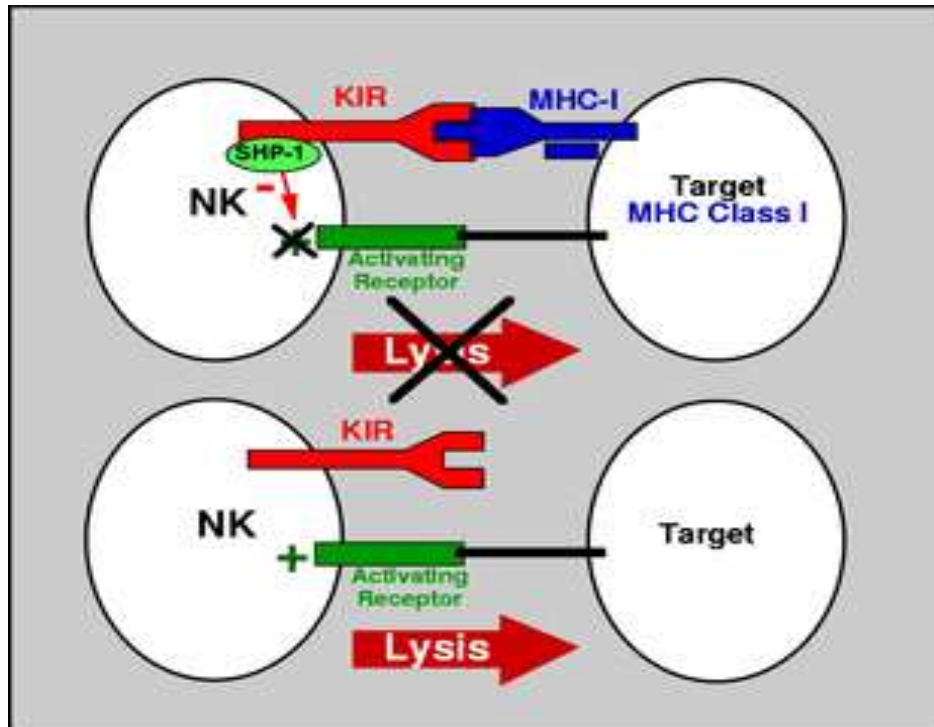
Après leur activation, les LyT CD8+ acquièrent des propriétés cytotoxiques qui leur permettent de détruire leur cible. Les deux principaux mécanismes de cytotoxicité sont le système perforine/granzyme et le système Fas/FasL (*Berke et al., 1995; Graubert et al., 1996*). Ces 2 systèmes provoquent la mort de la cellule cible par apoptose. Le système perforine/granzyme est utilisé par les LyT CD8+ et les cellules Natural Killer (NK). La synthèse de ces enzymes est liée à la production de cytokines de type Th1 notamment IL2. Ces enzymes sont stockées dans le cytoplasme des lymphocytes cytotoxiques sous la forme de granules. Lors du contact avec la cellule cible les perforines créent des pores dans la membrane cytoplasmique. Grâce à ces pores, les granzymes A et B pénètrent dans le

cytoplasme de la cellule cible pour gagner directement le noyau ou ils clivent les pro-caspases en caspase qui permettent la fragmentation de l'ADN observée au cours de l'apoptose.

Le système Fas/FasL est le principal mécanisme de cytotoxicité utilisé par les LyT CD4+. Fas qui appartient à la famille des récepteurs de mort cellulaire de type TNF est exprimé par la plupart des cellules alors que celle de FasL est inducible. Après leur activation, les LyT de type Th1 expriment rapidement FasL qui est clivé par une métalloprotéase en une molécule qui va se lier avec Fas. Cette interaction active la cascade des caspases qui aboutit à la mort par apoptose de la cellule cible (*Kagi et al., 1996 ; Peter et al., 1998*).

- **Cellules NK**

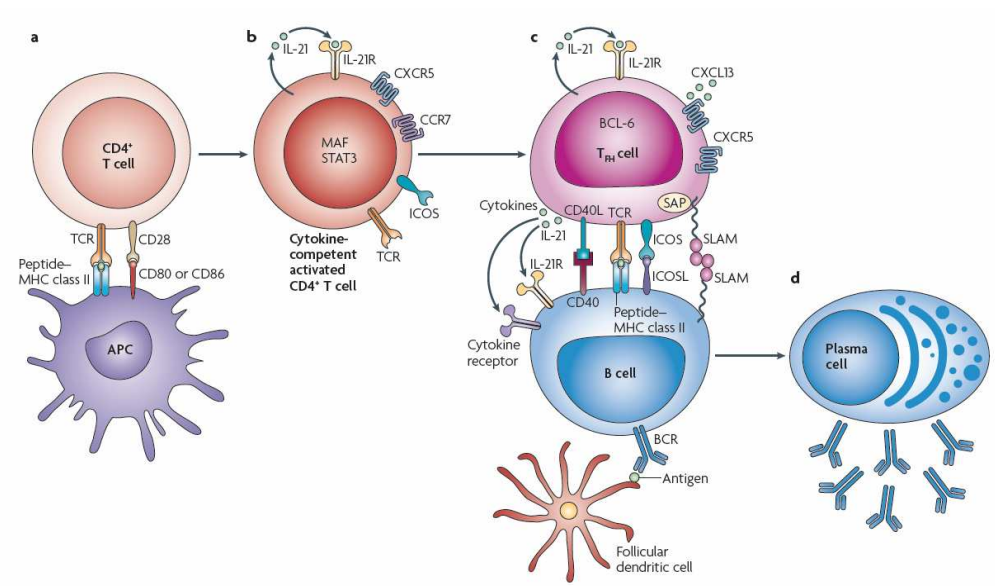
Les lymphocytes NK sont des cellules de l'immunité naturelle qui interviennent en première ligne dans la lutte contre les micro-organismes et la surveillance des tumeurs. Les cellules NK représentent 5 à 15 % des cellules mononuclées du sang périphérique chez l'homme. Elles constituent une lignée distincte de celles des LyT et des LyB. Ces cellules sont essentiellement présentes dans le sang, la rate (pulpe rouge) et la moelle osseuse. Ces cellules ont des capacités cytotoxiques et peuvent différencier les cellules allogéniques des cellules du soi. Leur rôle potentiel dans le rejet de greffe a été longtemps controversé. La découverte des récepteurs de type Toll (Toll like Receptor ou TLR) a permis de lever cette ambiguïté. En effet, ces récepteurs sont le trait d'union entre le système immunitaire inné et adaptatif (*Hoebe et al., 2004*). Les cellules NK sont capables de réguler la fonction des CD, qui peuvent à leur tour activer les LyT (*Walzer et al., 2005*). La plupart des études récentes suggèrent que les cellules NK ont un rôle actif dans l'apparition du RA et même du RC (*Uhera et al., 2005*). Chez l'homme, l'étude du transcriptome de biopsie de transplants rénaux avec rejet humoral a montré l'implication des cellules NK dans ce type de rejet. (*Hidalgo et al., 2010*)



**Figure 2. Représentation schématique de l'inhibition de la lyse cellulaire médiée par KIR.** (a) lorsqu'une cellule cible exprime des molécules de classe I du CMH, KIR recrute la phosphatase intra cellulaire SHP-1, qui inhibe KAR., (b) lorsqu'une cellule cible n'exprime pas de molécule de classe I du CMH, le récepteur KIR n'est pas activé. KAR reste actif et la cellule est lysée (D'après Campbell et al, 1998).

- **Lymphocytes B, coopération T-B et anticorps**

Avant de produire des Acs, les LyB naïfs présents dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) doivent fixer l'Ag cible grâce à leur immunoglobuline de surface (sIg) associée à des molécules comme CD19, CD21 CD22 et CD79 (*Monroe et al., 2000*). L'activation du BcR va conduire à l'activation de kinases intra-cellulaires qui aboutissent à la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Dans le contexte d'une allo-transplantation, le complexe Ag/HLA de classe I ou classe II/sIg est internalisé. Les Ag HLA sont clivés en peptides allo-réactifs qui sont ensuite exprimés à la surface du LyB en association avec les molécules HLA de classe II. Pour produire des Acs, les LyB alloréactifs doivent ensuite établir un contact avec les LyT CD4+ qui sont les seules cellules capables de reconnaître le complexe allopeptide/molécule HLA de classe II (*Pettitgrew et al., 1998*). Les LyB vont interagir avec une sous population de lymphocytes T *helper* récemment décrite : les lymphocytes T helper folliculaire (TFH) qui proviennent de précurseurs CD4+CD69+CXCR5+. Les TFH expriment chez l'homme, PD1, ICOS, le facteur de transcription Bcl-6, CXCR5 et CXCL13 et secrètent de l'IL-4 et de l'IL-21 qui activent le différenciation des LyB centro-folliculaires (*von Andrian et al., 2003 ; King, 2009*).

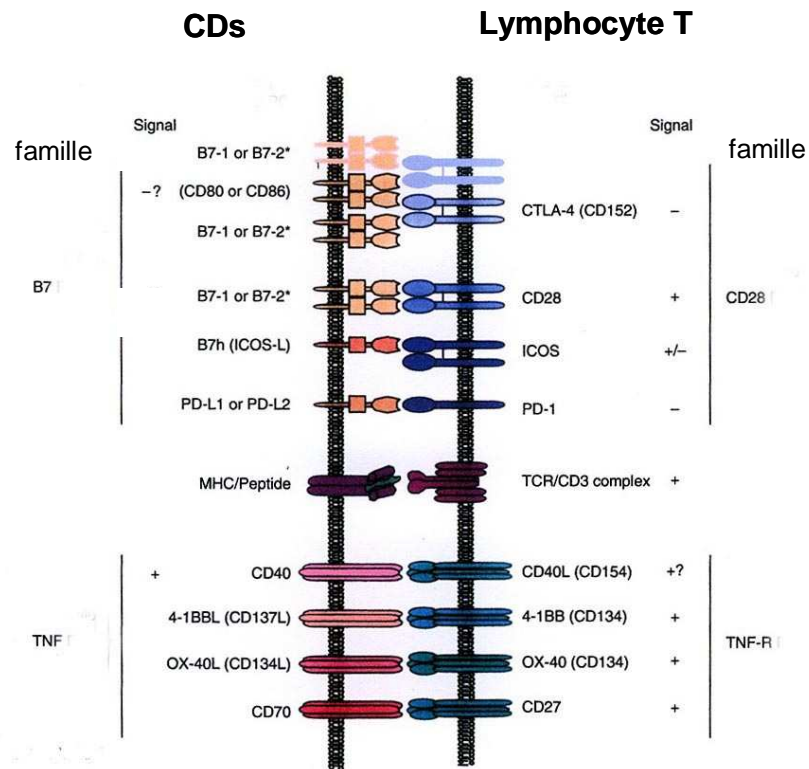


**Figure 3.** Représentation schématique de la coopération entre les lymphocytes T et les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire conduisant à la production d'anticorps (D'après King, 2009)

Ces différentes interactions vont activer différentes des voies de signalisation intra-cellulaire, qui entraînent la prolifération des LyB naïfs et leur différenciation en LyB mémoires ou en cellules sécrétant des Ac : les plasmocytes. Initialement, les LyB sécrètent des IgM dont l'affinité pour l'Ag est peu élevée. Le contact avec les LyT CD4+ permet le réarrangement des gènes codant pour les chaînes lourdes des Ig et la constitution, dans les organes lymphoïdes secondaires, des follicules lymphoïdes secondaires. Les précurseurs des plasmocytes ou plasmoblastes produisent alors des Ac ayant une grande affinité pour l'Ag (IgA et IgG).

## **5. Activation lymphocytaire**

La présentation de l'alloAg au récepteur T (TcR) par les CDs est insuffisante pour activer les cellules alloréactives. Un second signal est nécessaire pour permettre l'expansion des cellules activées (*Bretscher et Cohn, 1970*). Ce second signal est obtenu grâce à l'interaction de molécules exprimées à la surface des CDs activées avec des molécules membranaires lymphocytaires. Les molécules présentes à la surface des CDs activées appartiennent à la famille B7 (B7-1 et B7-2 correspondent respectivement à CD80 et CD86) et à la famille du TNF (CD40 et OX40 ligand). Les ligands, exprimés à la surface des lymphocytes, appartiennent quant à eux, à la famille CD28 et à la famille du récepteur du TNF (figure 4).



**Figure 4. Molécules co-stimulatrices.** Les molécules co-stimulatrices et leurs ligands appartiennent aux familles CD28/B7 et TNF/TNFR. Elles peuvent avoir une action activatrice (+) ou inhibitrice (-) sur les lymphocytes T. Leur expression est constitutive (CD28) ou inducible (ICOS/CD134) et n'est pas restreinte aux lymphocytes et aux cellules dendritiques (D'après Rothstein et Sayeg modifié, 2003).



Cette interaction active, dans les CD8 et les LyT, des voies de signalisation intracellulaires impliquant notamment NF- $\kappa$ B (figure 4). Ce facteur de transcription permet d'activer de nombreux gènes impliqués dans la réponse immunitaire notamment ceux codant pour des chimiokines, des cytokines et les molécules co-stimulatrices elles-mêmes.

Immédiatement après la transplantation, la reconnaissance des alloAg va impliquer les CD8 du donneur (voie de présentation directe), activées par l'ischémie/reperfusion. Les CD8 présentes dans le transplant vont gagner les ganglions lymphatiques locorégionaux et la rate. C'est au sein des zones T dépendantes de ces organes lymphoïdes que va se produire le contact avec les LyT. Dans le cas de la présentation indirecte, les CD8 immatures circulantes du receveur vont gagner le transplant grâce aux CE activées et aux chimiokines présentes dans le greffon. Dans le transplant, les CD8 vont capter et transformer les allo-antigènes solubles avant de re-circuler pour gagner les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques et rate) où elles initient la réaction immunitaire (*Rodgers et Lechler 2001*).

La prolifération des clones alloréactifs après leur activation (TcR et second signal) nécessite des facteurs de croissance (*T cell growth factor*) dont les principaux sont l'interleukine 2 (IL2), l'interleukine 4 (IL4) et l'interleukine 15 (IL15). Ces cytokines ont un mode d'action paracrine et autocrine. Les LyT, activés dans les ganglions lymphatiques loco-régionaux et la rate, ainsi que les monocytes et les polynucléaires éosinophiles circulants (PNE), sont guidés vers le transplant par les chimiokines libérées par les cellules du transplant (*Li et al., 1999*).

## **6. Types de rejet**

Actuellement, trois types de rejet peuvent être individualisés : le rejet hyperaigu, le rejet aigu (RA) à médiation lymphocytaire et/ou humorale et le rejet chronique (RC) à médiation cellulaire et/ou humorale.

- **Rejet hyperaigu**

Le rejet hyperaigu survenait classiquement chez des patients immunisés lors de transfusions, de transplantations, de grossesses et porteurs au moment de la transplantation d'anticorps (Acs) dirigés contre un ou plusieurs Ag portés par le

greffon. Ce type de rejet se manifestait précocement, parfois dès le déclantage vasculaire, par un dysfonctionnement immédiat du transplant (absence de diurèse par exemple pour le transplant rénal). Ce type de rejet a quasiment disparu depuis le développement de tests de compatibilité croisée ou cross-matches (XM) performants qui permettent de détecter le jour de la transplantation d'éventuels DSA dans le sérum du jour et des sérums historiques (*Crudele et al., 2011*). Ils constituent toutefois une barrière majeure au développement des xéno-transplantations.

- **Rejet aigu**

Les épisodes de RA surviennent préférentiellement durant les trois premiers mois suivant la greffe avec un pic de fréquence entre le 4<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour. Ils peuvent toutefois survenir à n'importe quel moment après la transplantation. Les progrès de l'immunosuppression ont permis de diminuer leur incidence qui ne dépasse pas actuellement 15% des transplantés. Les épisodes de rejet se traduisent habituellement par un dysfonctionnement aigu du transplant (augmentation de la créatininémie en transplantation rénale, cholestase et/ou cytolysse en transplantation hépatique par exemple). Toutefois, les manifestations cliniques et biologiques ne sont pas spécifiques et nécessitent une confirmation histologique. L'analyse des biopsies permet de classer les épisodes de rejet selon des classifications internationales validées comme la classification de BANFF pour les transplants rénaux et hépatiques (*Demetris et al., 2010 ; Racusen et al., 2010, 20103 ; Solez et al., 2007*). La détection des anticorps spécifiques du donneur DSA, dans le sérum et/ou le transplant, associée à des dépôts tissulaires de C4d sont les principaux signes permettant de suspecter un rejet humoral. La fraction C4d du complément est une fraction stable du complément qui reste liée de façon covalente aux structures tissulaires. Sa détection permet de localiser in situ les sites d'activation du complément (*Feucht et al., 2005*). Le RA humoral a d'ailleurs été ajouté à l'avant-dernière actualisation de la classification de BANFF en transplantation rénale en 2007 (*Racusen et Regele, 2010*). Dans cette classification, d'autres lésions comme la glomérulite, la capillarite des capillaires péri-tubulaires peuvent également évoquer un mécanisme humoral. Le RA médié par les LyT va se traduire par un infiltrat interstitiel au sein du transplant qui peut être associé à de l'œdème. La composition et la répartition de cet infiltrat sont

généralement variables au sein du greffon. Quel que soit l'organe transplanté, il est important de noter qu'un infiltrat inflammatoire isolé n'est pas suffisant pour affirmer le diagnostic de rejet. Il conviendra de rechercher une agression des structures tissulaires comme les tubes rénaux, les cardiomyocytes ou les canaux biliaires hépatiques par les cellules immunitaires et/ou inflammatoires. Les mécanismes cellulaires et humoraux peuvent bien sur être associés.

Les LyT CD4 jouent un rôle central dans le rejet aigu démontré chez l'animal en éliminant chez le receveur ces cellules à l'aide d'anticorps spécifique ou en utilisant des receveurs CMH II<sup>-/-</sup> (Krieger *et al.*, 1996). En l'absence de LyT CD4, le rejet peut toutefois se développer et conduire à la destruction du greffon (Haskova *et al.*, 2000). Les LyT CD4<sup>+</sup> sont activés par les CD activées du donneur qui quittent le greffon pour gagner les organes lymphoïdes locorégionaux. Ces cellules, fortes productrices d'IL-12 vont polariser la réponse immunitaire sur son versant Th1, favorisant ensuite la différenciation des LyT CD8 en cellules cytotoxiques et les LyB en plasmocytes producteurs d'Acs. La sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les lymphocytes participe à l'activation et au recrutement de macrophages qui secrètent des radicaux libres, du TNF- $\alpha$  et du monoxyde d'azote puissant vaso-dilatateur. La liaison du TNF- $\alpha$  à son récepteur active la voie des caspases et induit l'apoptose. La fixation d'anticorps sur les cellules cibles comme les cellules endothéliales peut induire leur mort par activation de la cascade du complément ou par un mécanisme de cytotoxicité dépendant du complément (ADCC) grâce aux cellules NK qui expriment à leur surface les récepteurs Fc $\gamma$ . On dispose maintenant d'arguments expérimentaux montrant que les cellules Th17 peuvent participer au rejet aigu. Un rejet accéléré avec lésions de vascularite et un infiltrat riche en polynucléaires neutrophiles producteurs d'IL-17 se développe chez les souris T-bet<sup>-/-</sup> (Yuan *et al.*, 2008). (Loong *et al.*, 2002). L'implication des Ly TH17 dans le rejet aigu chez l'homme reste toutefois à démontrer.

- **Rejet chronique**

Le rejet chronique, cause principale de la perte des greffons à long terme, va se traduire par un dysfonctionnement chronique et irréversible du greffon qui répond habituellement peu ou mal à l'intensification du traitement

immunosuppresseur. La progression des lésions va aboutir à une fibrose plus ou moins mutilante avec atrophie des tissus nobles. Cette fibrose est souvent associée à des lésions d'artériopathie oblitérante. Ces lésions d'artériopathie oblitérante sont parfois les seules lésions du rejet chronique visibles au niveau du transplant (cœur). La fibrose et l'atrophie ne sont pas spécifiques et souvent difficiles à différencier d'autres causes non immunologiques de dysfonctionnements du transplant (HTA, dyslipidémie, récurrence de la maladie initiale, ...). Toutefois, les actualisations récentes des classifications du rejet ont permis, notamment en transplantation rénale et hépatique, de proposer des lésions histopathologiques de RC à médiation humorale et/ou lymphocytaire (*Demetris et al., 2010 ; Solez et al., 2007*). Le RC humoral au niveau du transplant rénal se traduit par des lésions de glomérulite et de capillarite qui peuvent conduire à des lésions de glomérulopathie de l'allogreffe et à une fibrose mutilante avec atrophie tubulaire et raréfaction des capillaires péri-tubulaires. Ces lésions sont bien sûr associées à des dépôts tissulaires de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires et à des DSA. Le versant cellulaire du RC est moins bien défini. On peut toutefois raisonnablement inclure dans ce cadre les lésions d'artériopathie oblitérante et de cholangite persistante au niveau du transplant hépatique ou de tubulite persistante au niveau du transplant rénal (*Wong et al., 2003*).

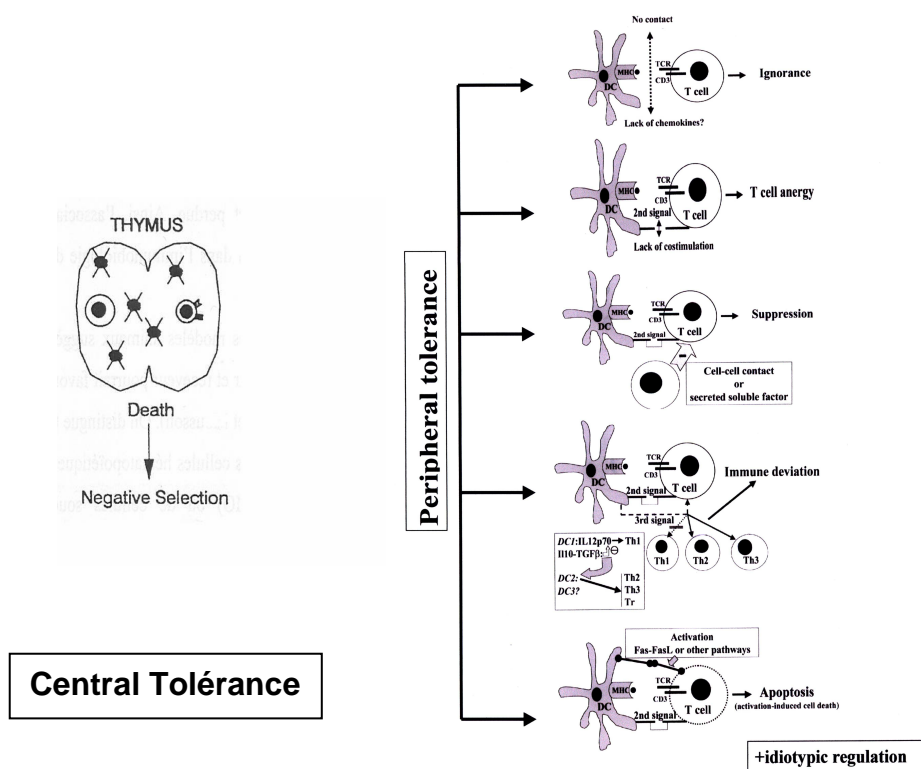
Le rejet chronique implique surtout les CD du receveur qui active les LyT par la voie de présentation indirecte ou semi-directe. Les modifications de la réponse immune précoce sous l'action des traitements immunosuppresseurs et la plus faible affinité des interactions CPA/LyT par la voie de présentation indirecte conduisent vers une différenciation Th2 (*Tilney et al., 1987*).

Le drainage lymphatique incomplet des organes transplantés favorise la concentration dans le transplant de cellules dendritiques et le développement de follicules lymphoïdes tertiaires dont la constitution est similaire à celle des follicules des organes lymphoïdes secondaires. Les travaux récents de *Thaunat et al.*, ont montré que la réponse lymphocytaire T qui se déroule dans ces structures lymphoïdes intra-tissulaires est différente de celle observée dans les ganglions lymphatiques ou la rate (*Thaunat et al., 2010a*). Elle est plus large et aléatoire, permettant la génération d'un répertoire T plus ample et la production locale d'un plus grand nombre d'anticorps spécifique du donneur. Cette activation immune

locale va, lorsqu'elle survient, enrichir la réponse qui se développe parallèlement dans les ganglions et la rate (*Thaumat et al, 2010b*).

# TOLERANCE

La tolérance est processus actif défini par l'absence de réponse immunitaire après un contact antigénique adéquat. En situation de greffe, elle permet au système immunitaire, en l'absence de traitement immunosuppresseur, de ne pas développer de réponse immunitaire vis à vis d'antigènes du receveur tout en conservant la capacité de répondre efficacement contre d'autres antigènes. Plusieurs mécanismes centraux et/ou périphériques sont impliqués dans la tolérance d'auto ou d'allo-antigène: la délétion, l'anergie, l'ignorance et la régulation (figure 5). Ces mécanismes permettent physiologiquement d'éviter que les récepteurs des LyT et des LyB générés par recombinaison génétique en réponse à l'infini diversité des antigènes ne reconnaissent des antigènes du soi et induisent une réponse immunitaire délétère.



**Figure 5.** Mécanismes de tolérance centrale et périphérique. L'ignorance, l'anergie, la régulation et la délétion sont les principaux mécanismes mis en œuvre au niveau du thymus et des organes lymphoïdes secondaires (D'après *Rifle et Mousson, 2003*).

## I. TOLERANCE CENTRALE

Le développement thymique des LyT passe par différentes étapes qui conduisent à la maturation des thymocytes et à l'expression séquentielle de molécules de surface. Les thymocytes double négatifs (CD4-CD8-) vont d'abord, grâce à aux enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2, procédés aux réarrangements somatiques des segments V, D et J de la chaîne  $\beta$  qui va ensuite s'apparier à une pré-chaîne  $\alpha$  pour former le pré-TCR exprimé à la surface de la cellule (*von Boehmer et al., 2009*). L'engagement du pré-TCR va donner au thymocyte un signal de survie et permettre la poursuite de sa maturation. L'activation de voies de signalisation intracellulaires réprime l'expression des enzymes RAG et évite la production d'un second TCR : c'est *l'exclusion allélique* qui permet la prolifération des thymocytes, l'expression de CD4 et CD8 puis le réarrangement des segments V, D, J de la chaîne  $\alpha$  et l'expression d'un TCR fonctionnel.

### 1. Sélection positive

Une faible proportion (5 à 10 %) des TCR produits vont être capables d'identifier les molécules du soi. Les thymocytes qui ne sont pas capables de reconnaître les antigènes HLA de classe I ou de classe II exprimés par les cellules épithéliales thymiques vont mourir car ils ne sont pas capables de produire les signaux dépendants de l'engagement du TCR, nécessaire à leur survie. L'utilisation de souris transgéniques exprimant des molécules du CMH soit uniquement sur les cellules épithéliales thymiques corticales (cTEC) soit uniquement sur les cellules épithéliales médullaires (mTEC) a permis de montrer que la sélection positive s'effectuait dans le cortex thymique (*Laufer et al., 2008*).

### 2. Sélection négative

Les thymocytes doubles positifs dont le TCR est capable d'interagir avec un complexe CMH/peptide vont survivre. Les LyT auto-réactifs reconnaissant des peptides du soi vont être éliminé par délétion clonale grâce aux mTEC qui expriment AIRE (*autoimmune regulator*). Ce gène permet l'expression à la surface des mTEC de protéines spécifiques d'organes. Les clones reconnaissant avec une forte affinité ces peptides reçoivent un signal qui entraîne leur mort par apoptose.

## II. TOLERANCE PERIPHERIQUE

Malgré l'activité d'AIRE, tous les antigènes tissulaires ne sont pas exprimés dans le thymus (*Klein et Sato, 2000*) ou alors sont exprimés à un trop faible niveau pour permettre la sélection négative. Des LyT auto-réactifs potentiellement délétères peuvent donc sortir du thymus et gagner les organes lymphoïdes secondaires. Des mécanismes passifs (ignorance, anergie) liés aux caractéristiques des LyT et de mécanismes actifs impliquant des cellules régulatrices vont permettre d'inhiber en dehors du thymus ces clones auto-réactifs.

### 1. Ignorance

L'ignorance de certains antigènes pourrait être due à leur absence de transfert vers les tissus lymphoïdes ou à des cellules T possédant un TCR de faible affinité pour l'antigène entraînant une activation incomplète des lymphocytes. Chez l'adulte, certains tissus ou organe comme les yeux, le cerveau ou l'endomètre ont un statut immunologique privilégié en raison d'un accès limité (barrière hémato-encéphalique) ou d'une absence ou d'une faible expression de molécules de classe I du CMH (neurones, cellules oculaires et trophoblastiques) qui les protègent contre les LyT cytotoxiques. L'ignorance ne peut toutefois pas être considérée comme un mécanisme d'induction de tolérance car ces lymphocytes ne sont pas éliminés et demeurent au sein du répertoire T périphérique.

### 2. Anergie

L'anergie est un phénomène actif qui implique la présentation de l'antigène par la cellule présentatrice, lors de son contact initial avec le lymphocyte T. Elle se traduit par une absence de prolifération *in vitro* et une absence durable de sécrétion d'IL-2. Le défaut de second signal lié à l'absence ou à la faible expression de molécules co-stimulatrices comme B7-1 et B7-2, ICAM-1, LFA-3, ou CD40, va aboutir à l'absence d'AP-1 (*activator protein 1*) et à l'activation d'un programme transcriptionnel alternatif lié au facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T cell*). Le LyT est alors incapable de proliférer et de produire de l'IL-2 nécessaire à sa différenciation. L'anergie peut être également engendrée par des cellules présentatrices d'antigènes à un stade immature, par le



TGF- $\beta$  ou l'IL-10 ou par des anticorps monoclonaux bloquant les molécules co-stimulatrices.

### **3. Délétion**

La délétion, utilisée dans le thymus, est aussi active dans les organes lymphoïdes secondaires (*Kurts et al., 1998*). La présentation croisée d'antigène tissulaire par les CD8 active d'abord les LyT suivi de leur élimination par apoptose par l'intermédiaire du système Fas (CD95)/FasL.

### **4. Déviation phénotypique**

Dans certains tissus, la réponse immune peut être rendue inefficace ou peu agressive. Dans le modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale, induite par immunisation contre des protéines de la myéline comme la *myelin basic protein*, les manifestations pathologiques sont inhibées si la réponse immune est polarisée sur son versant TH2. Cette polarisation peut être obtenue grâce à des antigènes bactériens qui vont modifier le milieu cytokinique dans lequel les clones auto-réactifs apparaissent (*Falcone et al., 1997*). La déviation immune est souvent utilisée par les agents pathogènes infectieux et les cellules néoplasiques pour susciter à leur égard une réponse immune inadaptée (*Kullberg et al., 1992, Zitvogel et al., 2006*).

### **5. Suppression**

Le contrôle « cellulaire » de la réponse immunitaire correspond au phénomène de régulation ou de suppression. Les clones lymphocytaires activés par un antigène sont présents dans le répertoire périphérique mais l'activité de ces cellules est abolie ou diminuée par un autre type cellulaire. La mise en évidence des populations régulatrices a été démontrée grâce à des expériences de transfert (*adoptive transfert*) effectués dans des modèles animaux. Les cellules régulatrices sont habituellement prélevées chez des animaux tolérant une allogreffe puis transférées à un animal syngénique. La mise en place d'un transplant allogénique chez ces animaux permet alors d'étudier la capacité de ces cellules à inhiber la réaction de rejet. Ces cellules régulatrices joueraient un rôle important pour la tolérance à long terme d'un transplant en inhibant notamment les clones allo-réactifs issus du thymus après la transplantation (*Shortman et al. 2001; Lutz et al.,*

2002). La plupart des lymphocytes T régulateurs sont CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (*Sakaguchi et al., 2006*). Ces cellules expriment également le facteur de transcription Foxp3 (*Fontenot et al., 2007*) et d'autre antigène comme GITR ou CTLA4. Il s'agit d'un groupe hétérogène dont les principales sous population sont présentées dans le tableau 1 :

<b>Treg classiques</b>	<b>Mécanismes régulateurs</b>	<b>Facteur de transcription</b>	<b>Cellules cibles</b>	<b>Principales fonctions</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	Contact cellulaire, cytokines (IL10?) (*)	Foxp3	LyT, CPA	Suppression de l'auto-immunité Inhibition du rejet d'allogreffe
Tr1	Medié par IL10	Foxp3 (*)	LyT	Suppression de l'auto-immunité
Th3	Médié par le TGF-β	? (*)	LyT	Suppression de l'auto-immunité

<b>Treg émergents</b>	<b>Mécanismes régulateurs</b>	<b>Facteur de transcription</b>	<b>Cellules cibles</b>	<b>Principales fonctions</b>
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	Cytokines	Foxp3 (*)	LyT, LyB, CPA	Suppression de l'auto-immunité
CD8 <sup>+</sup>	Contact cellulaire, cytokines (?*)	Foxp3 (*)	LyT	Suppression de l'auto-immunité; Régulation des LyT périphériques
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	Induction ILT3/ILT4	Foxp3 (*)	CDs, CPA	Régulation de l'auto-immunité
NKTreg	IL4, IL10, TGF-β, cytotoxicité	? (*)	LyT, CPA, cellules tumorales	Elimination de tumeurs et pathogènes; Suppression de l'auto-immunité
DnIKK2	Indépendant du contact cellulaire Exprime IL10, TGF-β, IL2 et iNOS	?	LyT	Supprime la prolifération T Inhibe la réponse T <i>in vitro</i> Prolonge la survie de greffe rénale <i>in vivo</i>

(\*). ILT: immunoglobulin transcript; NKTreg: regulatory cell of natural killer T cell phenotype

**Tableau 1:** Sous-types de lymphocytes T régulateurs naturels et inductibles (D'après *Aiello et al., 2007*)

Leur activation se fait par présentation indirecte de l'antigène et cela nécessite un contact avec la cellule cible en présence des cytokines comme IL-10, TGFβ, IL-4 (*Jiang et al., 2004*). Les Treg ne bloquent pas la prolifération des lymphocytes

effecteurs mais diminue leur sécrétion d'IL-2 (*Nagato et al., 2007*). Ils agissent également sur les propriétés des CD8 en diminuant leur capacité à stimuler les lymphocytes T. Le facteur de transcription Foxp3 joue un rôle essentiel dans les fonctions de ces cellules. Toutefois, ce mode d'action ne serait pas exclusif puisque l'expression de Foxp3 a récemment été identifiée au niveau des lymphocytes effecteurs (*Morgan et al., 2005; Roncador et al., 2005*).

Les LyB peuvent également avoir des propriétés régulatrices qui dépendent d'abord de la nature de l'antigène (*Chen et al., 2007*) : les antigènes endogènes ou dérivés de la dégradation par pinocytose qui ne sont pas reconnus par le BCR, peuvent, lorsqu'ils sont présentés par les lymphocytes B favoriser la tolérance T. En outre, la présentation par les LyB naïfs d'antigène au lymphocyte T naïf, en l'absence de CD8 favorise le développement de Treg (*Reichardt et al., 2007*). Chez l'homme, une sous-population de LyB dit transitionnels a été récemment décrite chez les patients tolérants leur greffe. Cette population CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup> secrète de l'IL-10 après stimulation impliquant CD40 (*Blair et al., 2010*). Elles pourraient correspondre ou donner naissance aux lymphocytes B régulateurs et favoriser le développement de Treg (*Newell et al., 2010*). Une population comparable a également été décrite chez le rat (*Le Texier et al., 2010*).

### **III. CHIMERISME ET TOLÉRANCE**

L'établissement et le maintien d'une tolérance est un processus actif, complexe et hautement régulé. Les modèles animaux notamment murins ont permis de mieux comprendre les mécanismes du rejet d'allogreffe et d'explorer aussi les mécanismes impliqués dans la tolérance. Ces études permettent d'envisager à terme, en transplantation humaine, l'utilisation de protocoles qui aboutissent à la tolérance du greffon sans recours à des traitements immunosuppresseurs permanents. Les stratégies utilisées pour parvenir à la tolérance d'allo-antigène ont évolué grâce à la meilleure compréhension des mécanismes du rejet et de tolérance. Les CD8 matures jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire survenant après la transplantation d'un organe allogénique, en présentant les allo-antigènes aux lymphocytes T allo-réactifs. Des travaux récents ont toutefois montré que les CD8 matures pouvaient également induire un état de

tolérance dépendant des lymphocytes T CD4+ (*Shortman et al., 2001; Lutz et al., 2002*). Nous avons utilisés dans ce travail des CD<sup>OX62+</sup> isolés grâce à un anticorps monoclonal couplés à des billes magnétiques. Une étude antérieure (*Bocrie et al., 2007*), a montré que les CD allogéniques OX62+ avait la capacité de gagner les organes lymphoïdes primaire (thymus) et secondaires (rate et ganglions lymphatiques) et de créer un chimérisme lymphoïde durable.

On distingue trois types de chimérisme. Le macro-chimérisme traduit le remplacement des cellules hématopoïétiques du receveur par celles d'un donneur de moelle osseuse (MO) ou de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette situation n'est observée qu'après greffe de MO ou de CSH précédé par un conditionnement myéloablatif. Le micro-chimérisme est défini par la présence de moins de 1% de cellules du donneur chez le receveur (10<sup>4</sup> ou 10<sup>5</sup> cellules, voire moins); il est induit par la libération chez le receveur de cellules du donneur par l'organe greffé, ces cellules étant essentiellement des CD<sup>+</sup> (*Monaco et Medawar, 2003*). Entre les deux, se situe le chimérisme mixte défini par la présence permanente ou temporaire de 1 à 99% de cellules hématopoïétiques d'un donneur chez un receveur.

Le chimérisme vrai induit la tolérance. Il a en effet été montré, aussi bien dans des modèles de greffe de peau chez la souris (*Wekerle et Sykes, 2004*), que chez des patients traités pour hémopathie maligne par thérapie myéloablatif et greffe de CSH allogéniques, que l'état chimérique permet de tolérer une allogreffe provenant du même donneur sans aucune immunosuppression (*Sayegh et al., 1991*). A l'évidence, de tels protocoles ne peuvent être utilisés en pratique clinique que dans des circonstances exceptionnelles. En revanche, de véritables états de tolérance ont été obtenus après induction d'un chimérisme mixte dans plusieurs modèles expérimentaux chez la souris et même chez le singe. Depuis 1992, Starzl et collaborateurs ont suggéré qu'un microchimérisme persistant chez le receveur d'une allogreffe pourrait jouer un rôle favorable dans la survie à long terme des organes (*Starzl et al., 1991*)

#### IV. CELLULES DENDRITIQUES ET TOLERANCE

La plupart des approches visant à obtenir, chez l'animal, une tolérance grâce à des cellules du donneur utilisent du sang ou des cellules hématopoiétiques. On peut se demander s'il ne serait pas aussi efficace d'utiliser des sous groupes de cellules hématopoiétiques ou de cellules d'origine médullaire comme les cellules présentatrices d'antigène (CPA), connues pour leur capacité, dans certaines circonstances, à orienter la réponse immune vers la tolérance (*Morelli et al., 2001*). L'injection de cellules CD34+ du donneur a été utilisée en transplantation rénale chez l'homme (*De Pauw et al., 2003; Millan et al., 2002*). La survie des transplants semble être prolongée par rapport au groupe témoin, mais il ne s'agit pas d'un état de tolérance vraie, puisque le maintien d'un traitement immunosuppresseur est nécessaire. Les CD pourraient présenter un double avantage. En premier lieu, les CD immatures peuvent orienter la réponse immune vers la tolérance (*Morelli et al., 2001*). En deuxième lieu, elles représentent l'essentiel des leucocytes passagers transmis au receveur par l'organe du donneur, et responsables de la présentation directe de l'antigène, de l'activation et de la prolifération des LyT naïfs (*Bishop et al., 1996; Jones et al., 1999; Gilot et al., 2000*). Si l'on admet que le micro-chimérisme joue un rôle dans la survie des organes, cet effet passe donc obligatoirement par les CD (*Brouha et al., 2001*). Ces CD immatures migrent au moment de la transplantation vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur (*Wood, 2003*). Pendant leur migration, elles entament une série de modifications phénotypiques et fonctionnelles leur permettant de développer des capacités de présentation antigénique (*Banchereau et Steinman, 1998*). En particulier on observe une augmentation de l'expression des molécules de classe I et II du CMH et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86.

Plusieurs approches/manipulations pharmacologiques, biologiques ou de génie génétique permettent d'induire des CD tolérogènes chez les rongeurs. La combinaison des CD du donneur avec le blocage d'un signal de co-stimulation par l'AcMo anti-CD154 (CD40L) est une méthode efficace pour augmenter les capacités tolérogènes de ces cellules et ceci pourrait être lié à l'activation de l'apoptose des cellules T alloréactives (*Coates et al., 2003*). Par ailleurs, les CD

immatures (déficientes en molécules co-stimulatrices) sont connues pour leur capacité à orienter la réponse immune vers la tolérance (*Morelli et al. 2001*). Une variété de drogues inhibe la maturation des CD8 et favorise leur capacité tolérogène (*Coates et al., 2003, Lagaraine et al., 2003*). Parmi ces agents pharmacologiques, l'aspirine et la vitamine D3. L'aspirine exerce son effet par la suppression de la translocation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B, les corticostéroïdes agissent de la même manière, et induisent en plus la production de l'IL-15 et de l'IL-10 favorisant ainsi la déviation immune Th2. Le Mycophénolate mofétil (MMF) inhibe aussi la maturation et la fonction des CD8. Les anti-calciéurines paraissent ne pas avoir d'effet sur les CD8. La rapamycine inhibe la macropinocytose et l'endocytose du récepteur par les CD8, éliminant ainsi leur capacité à capturer l'Ag (*Hackstein et al., 2002*). La modification des CD8 par un transgène codant pour des molécules induisant l'apoptose, inhibiteurs de l'interaction T-CD8, des cytokines immuno-régulatrices ou orientant vers la réponse Th2 sont des approches prometteuses pour la génération de CD8 tolérogènes (*Lu et al., 2002*). Il est également possible que des sous-populations de CD8 matures puissent induire une hypo-réactivité aux alloantigènes grâce en partie à l'induction des cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices in vivo (*Rifle et Mousson, 2003*). Nous avons démontré, in vitro que les CD8 spléniques matures associées avec un AcMo anti-CD4 non déplétant induisent une diminution de l'expression de CD80 (*Simoneau-Robin et al., 2001*). L'injection de CD8 matures in vivo permet par ailleurs d'obtenir un chimérisme «lymphoïde» durable, indépendant de la dose de CD8 injectées. *O'Connell et al.* ont également montré que l'injection 7 jours avant transplantation de CD8 matures (CD8 $\alpha$ +) du donneur prolonge la survie des greffes de cœur chez la souris (*O'Connell et al., 2002*). De même, l'injection de CD8 spléniques matures du donneur associées à un AcMo anti-CD154, 14 jours avant transplantation, entraîne une survie indéfinie des greffes de cœur chez la souris (*Niimi et al., 2001*). Toutefois, il faut garder à l'esprit que les résultats obtenus dans les modèles murins ne sont pas facilement applicables aux autres espèces (*Rifle et Mousson, 2003*).

Toutes ces manipulations visant à orienter les CD8 du donneur vers une activité tolérogène passent pour une part par une orientation Th2 de la réponse immune, supposée tolérogène (*Coates et al., 2002; Morelli et al. 2001*). En effet, les

cellules Th2 secrètent des cytokines supposées tolérogènes, comme IL10, IL4, IL5, IL6 (*Lutz et Schuler, 2002*). Mais certaines de ces cytokines ont une autre particularité: IL4, IL5 et IL6 favorisent la différenciation et la maturation des cellules B. Il ne serait donc pas impossible qu'après l'effet tolérogène immédiat par inhibition de la prolifération Th1 (*Coates et al., 2002*), la production d'Acs soit favorisée à moyen et à long terme. En d'autres termes, après une phase favorable diminuant les risques de rejet aigu, cette orientation Th2 ne pourrait-elle augmenter le risque de rejet chronique induit par les Acs? Pirenne et al ont récemment développé chez le rat un modèle de tolérance utilisant des transfusions du sang du donneur. Dans ce modèle, ces auteurs ont observé la survenue, à long terme, de lésions vasculaires de rejet chronique dans le transplant cardiaque. Ces lésions sont associées à une expression massive d'IL4 à J30 au sein des greffons, à la présence de cellules B et au dépôt sur l'endothélium d'IgG1, une immunoglobuline Th2 dépendante (*Pirenne et al., 2005*). Ce modèle induit donc une déviation Th2, associée au recrutement de LyT régulateurs CD4+CD45RC+ au sein des greffons. Cette déviation Th2 semble bien capable d'entraîner une prolifération B et des dépôts d'anticorps au sein des greffons. Aucune recherche spécifique d'anticorps anti-donneur n'a malheureusement été réalisée.

L'association d'AcMo anti-CD4 non dépletants et de cellules du donneur par transfusion sanguine simple permet d'obtenir la tolérance de transplants allogéniques (*Kingsley et al., 2002; Bushell et al., 2003*). Cet effet dépend, pour une part, de l'induction de lymphocytes T régulateurs. En outre, il a été démontré au sein de notre équipe que des CDs matures (spléniques) associées avec un AcMo anti-CD4 non dépletant induit une hypo-réactivité allogénique *in vivo* chez le rat, probablement par diminution de l'expression de molécules co-stimulatrices CD80 (*Simoneau-Robin et al., 2001*). Comme nous l'avons déjà indiqué, nous savons aussi que l'injection de CDs matures non plamocytoïdes (*Voisine et al., 2002; Hubert et al., 2004*) induit la formation d'anticorps dirigés contre les lymphocytes du donneur. Cette production est inhibée par l'injection simultanée d'AcMo anti-CD4 non dépletants (*Bocrie et al, 2006*).

## LYMPHOCYTES T REGULATEURS CD4+CD25+

### I. Mise en évidence des lymphocytes régulateurs

L'existence de cellules régulatrices ou suppressives a été suspectée dès la fin des années 60 dans des modèles de thymectomies néonatales chez la souris ou le rat. Il a toutefois fallu attendre plusieurs dizaines d'années avant de disposer de marqueurs qui permettent de mieux caractériser ces cellules sur le plan phénotypique et fonctionnel. (*Daniel et al.*, 1998; *Lombardi et al.*, 1990)

C'est d'abord Sakaguchi *et al.*, en 1981, qui ont montré que les lymphocytes CD4+CD5<sup>hi</sup> permettaient de prévenir le développement d'une ovarite auto-immune chez la souris, puis que la déplétion de cette sous-population permettait d'induire chez la souris *nude* immuno-déficiente une pathologie auto-immune systémique liée à des cellules effectrices CD4+CD5<sup>-</sup>. (*Sakaguchi et al.*, 1985)

En 1990, Powrie *et al.* ont montré que l'injection de lymphocytes T CD4+CD45RB<sup>hi</sup> à des rats athymiques induisait une pathologie dysimmunitaire sévère qui pouvait être prévenue par l'association de lymphocytes T CD4+CD45RB<sup>low</sup>. Chez la souris SCID, cette sous-population effectrice est à l'origine d'une pathologie inflammatoire intestinale. Il a fallu attendre 1995 pour que Sakaguchi montre que les cellules régulatrices exprimaient de manière constitutive, le marqueur d'activation CD25 (*Powrie et Mason*, 1990).

Chez la souris et chez l'homme, les lymphocytes T CD4+CD25+ représentent environ 5 à 10% des lymphocytes CD4+ totaux. Ils permettent de prévenir le développement de pathologies auto-immunes et le développement de rejets dans des combinaisons allogéniques. En situation néonatale, les lymphocytes CD4+CD25+ apparaissent, dans les organes lymphoïdes périphériques 4 jours après la naissance. Ainsi, on comprend mieux pourquoi la thymectomie néo-natale effectuée avant cette date se traduit par l'absence de cellules régulatrices et l'apparition d'une pathologie dysimmunitaire. Il faut toutefois noter que le marqueur d'activation CD25, n'est pas totalement spécifique de cette sous-population lymphocytaire. (*Sakaguchi et al.*, 1995)



D'autres marqueurs, comme CTLA4, GITR sont exprimés par les lymphocytes T régulateurs, mais également par les lymphocytes T activés (*Read et al., 2000 ; McHugh et al., 2002*). Il a fallu attendre 2001 et la découverte que la mutation du gène codant pour le facteur de transcription FoxP3 était à l'origine du syndrome IPEX (*Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome*) responsable d'une pathologie dysimmunitaire complexe accompagnée d'un taux élevé d'IgE circulantes et d'une augmentation des polynucléaires éosinophiles suggérant une polarisation de type TH2 (*Powell et al., 1982*).

Dans le modèle murin, les souris SCURFY développent une pathologie auto-immune et un syndrome lymphoprolifératif comparable au syndrome IPEX chez l'homme (*Wilding et al., 2001; Lin et al., 2005*). Le lien entre l'anomalie du gène FOXP3 et les anomalies du répertoire des lymphocytes T a finalement été établie en 2003 (*Khattari et al., 2003 ; Fontenot et al., 2003*) Le syndrome IPEX chez l'homme et les souris SCURFY développerait une pathologie non pas liée à des anomalies des cellules effectrices, mais un défaut de génération de lymphocytes T régulateurs. Bien que le nombre de lymphocytes T CD4+ CD25<sup>high</sup> ne soit pas modifié chez les patients IPEX, les tests fonctionnels *in vitro* ont montré que ces cellules avaient perdu une grande partie de leur potentiel suppresseur. L'utilisation de souris exprimant une protéine de fusion GFP/FoxP3 a permis de montrer qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression de FoxP3 et celle de CD25. (*Baschetta et al., 2006; Le Bras et al., 2006*)

A ce jour, l'expression du facteur de transcription FoxP3 reste un marqueur clé pour identifier les lymphocytes T régulateurs chez l'homme et la souris. L'utilisation potentielle de cette sous-population à des fins thérapeutiques nécessite toutefois d'obtenir une sous-population la plus pure possible. La quête d'autres marqueurs a donc continué.

En 2006, deux groupes ont montré que les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+FoxP3+ exprimaient faiblement CD127 qui correspond à la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine 7. Les lymphocytes T activés CD25<sup>+</sup> expriment, eux fortement CD127. (*Liu et al., 2006 ; Seddiki et al., 2006*). L'utilisation de puces ADN a permis de montrer que le gène CD127 est une cible du facteur de transcription FoxP3 (*Liu et al., 2006*).

Plus récemment, le groupe de Sakaguchi a montré que les lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup> exprimaient FR4 (Folate Receptor 4) de manière constitutive. Ce nouveau marqueur permet de différencier encore plus finement les lymphocytes T régulateurs (FR4<sup>high</sup>) des lymphocytes T activés (FR4<sup>low</sup>) (*Sakaguchi et al., 2006*).

## II. Ontogénie des lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> sont issus du thymus (*Itoh et al., 1999*). Ils subissent une sélection positive au niveau du cortex thymique grâce à l'interaction de leur TCR avec les peptides exprimés en association avec les molécules de classe II du CMH exprimé par les cellules épithéliales corticales (*Bensinger et al., 2001*). Puis, ils subissent une sélection négative. Il semblerait que le développement thymique des lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> requière des interactions agonistes de haute affinité avec les complexes CMH/peptides exprimés par les cellules épithéliales. L'amplification des voies de signalisation en aval du TCR par inhibition, par exemple, de la phosphatase SHP1 augmente le compartiment régulateur, alors que l'inactivation de NF-KB limite la taille de ce compartiment (*Jordan et al., 2001 ; Carter et al., 2005*).

L'équipe de Diane Mathis a toutefois proposé que le développement intrathymique des Treg dépende du niveau d'expression du ligand (*Van Santen et al., 2004*). Lorsqu'il quitte le thymus, les Treg, gagne par l'intermédiaire de la circulation sanguine, les organes lymphoïdes secondaires où ils représentent une sous-population stable qui comporte au moins deux sous-types : l'une quiescente (CD62L<sup>high</sup>) et la seconde active (CD62L<sup>low</sup>CD69<sup>+</sup> et/ou CD44<sup>+</sup>). La prolifération des Treg n'est possible qu'en présence d'IL2 qui en se fixant sur son récepteur donne un avantage prolifératif aux Treg par rapport aux autres lymphocytes T (*Van Santen et al., 2004; Yamaguchi et al., 2007; Fontenot et al., 2003*).

D'autres cytokines participent à l'expansion ou à la modulation du compartiment régulateur, notamment l'IFN $\gamma$  qui permet, d'une part le développement d'une réponse pro-inflammatoire de type TH1 et d'autre part aux Treg de contrôler le déroulement de la réponse immunitaire (*Wood et al., 2007*). La production d'IFN $\gamma$  par les Treg crée un microenvironnement suppressif qui inhibe l'activation et la

prolifération des lymphocytes T effecteurs en induisant au sein des cellules présentatrices l'expression d'iNOS, d'HO1 ou d'IDO (*Sawitzki et al., 2005 ; Wood et Sawitski, 2006*). Le TGF- $\beta$  permet, quant à lui, la conversion en périphérie de lymphocytes T effecteurs en Treg qui ont une activité régulatrice. Toutefois, l'activité de ces Treg inductibles est instable (*Gorelik et Flavell 2000*)

### **III. Mécanismes de suppression**

Les Treg naturels CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> sont capables d'inhiber les lymphocytes T effecteurs mais également les lymphocytes B, les cellules NK et les cellules NKT (*Sakaguchi 2004*). Ils ont, également, la possibilité de moduler la maturation des cellules dendritiques. Leur activité est accrue lorsqu'ils ont été en contact avec l'antigène, en l'absence de fortes doses d'IL2 et de co-stimulation par CD28 (*Takahashi et al., 1998; Bilsborough et al., 2003*).

En co-culture, les Treg diminuent la concentration d'IL2 sans toutefois modifier la transcription du gène. Le manque d'IL2, mais aussi d'IL7 induirait l'apoptose des cellules effectrices par une voie dépendante de facteur pro-apoptotique (*Thornton et Shevach, 1998 ; von Boehmer, 2005*). L'utilisation de *transwell* a clairement démontré que le contact entre les T reg et les cellules effectrices était indispensable à leur fonction régulatrice. Les molécules CTLA4, exprimées par les Treg, peuvent interagir avec les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 exprimées à la surface des lymphocytes T effecteurs induisant un signal suppresseur pour les lymphocytes T ou l'expression d'IDO par les cellules dendritiques. En outre, les Treg pourraient avoir une action cytotoxique directe sur les cellules effectrices par l'intermédiaire de la perforine ou du système Fas/FasL (*Fallarino et al., 2003*).

Chez l'animal, il a été montré que l'activité régulatrice des Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup> dépendait de l'IL10 que ce soit pour l'inhibition de la colite ou du rejet dans un modèle allogénique. (*Sakaguchi 2004 ; von Boehmer, 2005 ; Piccirillo et al., 2002*). L'IL-10 pourrait agir en induisant des lymphocytes Tr1 ou des cellules dendritiques tolérogènes qui amplifieraient le mécanisme suppresseur (*Roncarolo et al., 2006 ; Kryczek et al., 2006*). Le TGF- $\beta$  joue également un rôle important dans l'action des Treg *in vivo*. On sait que cette

cytokine permet la maturation des cellules dendritiques, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4 et des lymphocytes B ou les fonctions des lymphocytes T CD8+ et NK (*Yamaguchi et al., 1997 ; Kehrl et al., 1986 ; Sad et Mosmann 1994*).

Le but de ce travail est d'étudier dans un modèle déjà validé de rejet chronique chez le rat (F344/Lewis), les effets et les mécanismes d'action d'un protocole associant des cellules dendritiques spléniques OX62+ du receveur et un anticorps monoclonal anti-CD4 non dépletant.

## **MATERIEL ET METHODES**

## I. LE MODELE ANIMAL



**Figure 6.** Rat F-344 mâle de 9 semaines



**Figure 7.** Rat Lewis mâle de 9 semaines

Nous avons utilisé le modèle de rejet chronique décrit l'équipe d'Adams en 1992 (Adams et al., 1992). Connu pour être fort producteur d'Acs (Gordon et al., 2002), le rat Lewis a été choisi comme receveur. Il s'agit d'un rat albinos consanguin très docile dont la maturité immunologique est atteinte vers la 10ème semaine au moment où se développe son tissu graisseux. A cet âge, les mâles pèsent environ 300 g. Le système d'histocompatibilité du rat Lewis est RT1L : A=l, E=-, B=l, D=l. Le rat mâle Fischer est utilisé comme donneur. A 10 semaines, l'animal pèse, 400 g. Le système d'histocompatibilité est RT1U : A=u, E=-, B=u, D=u. Dans cette combinaison, les allo-antigènes de classe I ne peuvent être reconnus que par les lymphocytes T CD4+ après leur internalisation et leur association aux molécules de classe II de CMH.

### 1. Hébergement

Lors de leur arrivée à l'animalerie, les animaux, alors âgés de 9 semaines, sont répartis par groupes de trois par cages avec accès libre à la nourriture et à la boisson. L'enceinte utilisée est ventilée en surpression avec un air filtré et réchauffé. La ventilation en surpression évite toute contamination des animaux par des germes extérieurs tant que ceux-ci sont maintenus dans cette enceinte. L'hygrométrie doit être constante et comprise dans une fourchette de 50 à 60% d'humidité. La température est strictement contrôlée et maintenue entre 21 °C et 23 °C en raison de la grande susceptibilité des animaux aux changements des conditions environnementales

## **2. Anesthésie, euthanasie**

Pour l'euthanasie, l'animal est placé dans une enceinte hermétiquement close riche en CO<sub>2</sub> (95%). Au bout de 5 à 10 min, il se produit un arrêt respiratoire brusque avec cyanose des extrémités, suivi d'un arrêt cardiaque.

## **II. METHODES**

### **1. Greffes de peau**

On effectue l'anesthésie du rat donneur avec l'isofluorane. L'animal est allongé sur le ventre et rasé dans la zone du prélèvement. Cette zone est passée à la Bétadine pour assurer une asepsie. On prélève un carré de peau entre les omoplates de l'animal. Le greffon est placé en attendant la greffe dans une boîte de pétri contenant un mélange sérum physiologique et Bétadine. Le donneur est recousu.

L'animal receveur, étendu sur le ventre, est anesthésié avec l'isofluorane. Il est ensuite rasé dans la zone du prélèvement, cette zone est passée à la Bétadine pour assurer une asepsie. On prélève ensuite un carré de peau entre les omoplates de l'animal dont la taille est équivalente à celle du greffon prélevé chez le donneur. Le greffon est positionné dans la zone dénudée de façon à ce que les poils repoussent dans le sens opposé à la pousse naturelle, puis on suture le greffon point sur point. Le rat est sacrifié lorsque des signes de rejet sont observés (nécrose du greffon).

### **2. Greffes de cœur**

Le rat donneur (F344) anesthésié est immobilisé sur une planche, On réalise ensuite une laparotomie médiane. Les anses digestives sont dégagées pour aborder les gros vaisseaux intra abdominaux. On cathétérise la veine cave inférieure sous rénale à l'aide d'un cathlon pédiatrique 23G, puis on sectionne l'aorte et on infuse immédiatement par la veine 30 ml d'un mélange de liquide de cardioplégie (réfrigéré à 4°C) associé à de l'héparinate de sodium (25000 Unités pour 1 l de cardioplégie) pour remplacer le sang par ce mélange. On pratique ensuite une thoracotomie latérale droite et gauche ouvrant un large volet thoracique. Un cathéter introduit dans la veine cave inférieure permet de rincer le cœur avec 30 ml de mélange de cardioplégie héparinée. On sectionne et on ligature la veine cave inférieure avec un fil Vicryl 4/0. On ouvre le péricarde et on enlève le

thymus ce qui permet de dégager l'aorte qui est sectionnée au ras du tronc artériel brachio-céphalique. On sectionne ensuite l'artère pulmonaire en préservant l'oreillette droite. Les veines pulmonaires et la veine cave supérieure sont ensuite ligaturées en masse avec un fil Vicryl 4/0, puis sectionnées, ce qui permet l'ablation du greffon. Un nouveau rinçage du cœur par infusion de 20 ml de mélange de cardioplégie héparinée permet de bien vider les coronaires et d'éviter ainsi les risques de thromboses.

Le rat Lewis receveur anesthésié est immobilisé sur une planche. On pratique une laparotomie médiane. On dégage les anses digestives en incisant le méso-sigmoïde, on dégage l'aorte et la veine cave inférieure sous rénales après ouverture du péritoine postérieur. Les veines lombaires sont ensuite ligaturées avec un fil Prolène 8/0, puis sectionnées. On dégage ainsi une zone vasculaire d'implantation d'environ 10 mm sur les vaisseaux abdominaux (veine cave inférieure et aorte abdominale) qui sont clampés au niveau supérieur immédiatement sous l'artère rénale et au niveau inférieur immédiatement au dessus des vaisseaux iliaques à l'aide de fils de soie 2/0. Le greffon est positionné dans le champ opératoire puis maintenu dans la glace. Après avoir pratiqué une artériotomie sur l'aorte abdominale, on réalise une suture aorto-aortique par deux hémi-surjets avec un fil d'éthilon 9/0. L'artère pulmonaire du greffon est ensuite suturée sur la veine cave inférieure (VCI) du receveur par deux hémi-surjets avec un fil d'éthilon 9/0. Les zones d'anastomoses sont recouvertes de Pangen® compresse (Laboratoire URGO, Dijon-FRANCE). Lors du déclampage, on réchauffe le greffon puis on replace les anses digestives après vérification de l'hémostase. La fermeture musculo-aponévrotique est réalisée avec un surjet de fil Vicryl 3/0. La fermeture cutanée se fait avec un surjet de fil Vicryl rapide 3/0. L'animal est ensuite progressivement réchauffé jusqu'à son réveil complet.

### **3. Prélèvement sanguin**

Avant chaque protocole d'injection ou de prélèvement sanguin, les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane. Cette anesthésie légère permet de réaliser de façon optimale les prélèvements de sang par ponction de la veine caudale et les injections de CDs ou d'Acs par voie IV dans la veine pénienne. Les prélèvements sanguins sont effectués par ponction de la veine caudale latérale. Le sang est prélevé avec une seringue dans des tubes contenant du K3E à 15% (BD



Vacutainer Systems, UK) et une aiguille 25 G (Terumo, France). Une vasodilatation de la veine caudale, permettant une ponction plus aisée, est provoquée par une augmentation locale de la température. Une section de la pointe de la queue est pratiquée lorsque la ponction de la veine caudale s'avère difficile. Il suffit alors d'enlever la croûte sur la blessure pour les prélèvements ultérieurs. Le sang recueilli est centrifugé 10 min à 3000 rpm, ce qui permet de séparer le sérum qui est aliquoté à 50 µL dans des microtubes avant congélation à -30 °C en vue du XM.

#### **4. Isolements**

##### **a. Isolement des cellules ganglionnaires mésentériques**

Les ganglions lymphatiques mésentériques sont placés dans du RPMI 1640 (20% de SVF) et conservés à +4 °C jusqu'au moment de l'isolement. Les ganglions lymphatiques sont séparés de la graisse qui les entoure à l'aide de 2 pinces de Dumont. Ils se présentent sous la forme de petites structures arrondies et fermes par rapport au tissu adipeux adjacent (qui se laisse aisément dilacérer). Une fois les ganglions lymphatiques isolés, 1 mL de RPMI 1640 complet est doucement injecté, à l'aide d'une aiguille (25 G) montée sur une seringue. Cette opération est répétée plusieurs fois. Le ganglion gonfle sous l'effet de la pression et le liquide perfusé ressort au travers des pertuis réalisés dans la capsule ganglionnaire. Un liquide enrichi en lymphocytes est ainsi recueilli. Une appréciation de la viabilité (> 90%) est alors effectuée. La concentration cellulaire est standardisée entre 4000 et 6000 cellules/mm<sup>3</sup>, par comptage sur cellule de Malassez.

##### **b. Congélation**

Une quantité (v/v) de DMSO à 20 % en PBS est ajoutée à la suspension lymphocytaire obtenue des ganglions mésentériques. La solution ainsi obtenue est conditionnée en paillettes de 500 µL congelées à -80 °C pendant 24 heures. L'ensemble des paillettes est stocké dans l'azote liquide (-196 °C) jusqu'à l'utilisation des cellules.

##### **c. Isolement des cellules dendritiques spléniques OX62+**

La rate est prélevée puis mise dans une boîte de pétri de 6 cm de diamètre contenant du tampon (PBS + EDTA 10 mM + 2% SVF) et 5 mL de collagenase D

(2 mg.mL<sup>-1</sup> de collagenase D dans du RPMI + 1% SVF). Trois mL de collagenase D sont injectés à l'aide d'une seringue 25 G, puis réinjectés jusqu'à obtenir la décoloration de la rate. Celle-ci est ensuite coupée en petits fragments et broyée à l'aide de lames de scalpel. La suspension cellulaire est mise à incuber 20 min à 37°C avec la collagénase D puis 5 min avec 10 mM EDTA à température ambiante (RT) pour une dissociation optimale. L'ensemble est broyé dans une passoire et un piston dans une boîte de pétri. La suspension est alors filtrée avec un filtre (pores de 70 µm) et la boîte de pétri est lavée pour récupérer les cellules restantes. La suspension cellulaire est centrifugée à 200 g durant 10 min à 4°C afin d'éliminer l'EDTA. Le culot est alors repris dans 12 mL de PBS/SVF/EDTA. Le Nicodenz (14,5%, Nycomed, Oslo) est alors déposé au fond d'un tube à fond rond à l'aide d'une aiguille spinale (12 mL, v/v) puis les cellules sont séparées par centrifugation à 2800 rpm, 15 min à 4 °C sans frein. L'anneau de Nicodenz est alors soigneusement récupéré, puis lavé. Les cellules sont finalement comptées à la cellule de Malassez.

Les cellules sont alors incubées avec des billes magnétiques couplées avec l'Ac anti-OX62 (MACS) reconnaissant spécifiquement les CD<sub>s</sub>. Vingt µL de billes anti-OX62 permettent de marquer jusqu'à 10<sup>7</sup> cellules suspendues dans 100 µL. Après une incubation de 15 min, à +4 °C), les cellules sont lavées. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 500µL de PBS/SVF/EDTA, puis triées.

La colonne MS placée sur un aimant MACS est lavée une fois avec 500 µL de PBS/SVF/EDTA. Les cellules à trier sont déposées sur la colonne. Quand le liquide a fini de s'écouler, la colonne est enlevée de l'aimant, placée sur un nouveau tube et les cellules OX62<sup>+</sup> sont éluées avec 1 mL de PBS/SVF/EDTA grâce au piston fourni. Les cellules sont de nouveau comptées sur cellule de Malassez. Les cellules OX62<sup>+</sup> obtenues ont une pureté supérieure à 95%.

#### **d. Isolement des lymphocytes T CD4+CD25+**

Les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ sont isolés de la rate et des ganglions lymphatiques mésentériques de rats naïfs ou ayant reçus un transplant allogénique avec ou sans conditionnement tolérogène. Les ganglions lymphatiques et la rate sont dissociés mécaniquement. La suspension est filtrée (70 µm) pour éliminer les débris tissulaire puis lavée 2 fois (PBS 1% SVF) et re-suspendue dans le tampon à la concentration de 10<sup>8</sup>/ml. Après un marquage (15mn à 4°C) avec les anticorps

anti-CD4-APC (clone OX35, BD Pharmingen) et anti-CD25-PE (clone OX39, BD Pharmingen). La suspension cellulaire (960  $\mu$ l) est incubée 15 mn à +4°C avec 40  $\mu$ l avec les billes anti-APC (Miltenyi Biotec). Les lymphocytes T CD4+ sont isolés à l'aide de la colonne MS placée sur un aimant MACS. Les cellules d'intérêt sont suspendues dans le tampon ( $2 \times 10^7/100\mu$ l). Les billes sont enlevés grâce au *Multisort Release Reagent* (Miltenyi Biotec) au cours d'une incubation de 10 minutes à +4°C (30 $\mu$ l pour  $10^7$  cellules). Les billes résiduelles sont éliminées en passant les cellules sur la colonne. Ensuite, les cellules sont incubées avec 20 $\mu$ l d'anticorps anti-PE (15 minutes à 4°C). Après 2 lavages, un nouveau tri magnétique permet de recueillir les cellules CD4+CD25+. Les travaux préliminaires déjà réalisés ont montré qu'il était possible d'isoler en moyenne  $2.10^6$  lymphocytes T CD4+CD25+ de chaque animal étudié.

Pour les cultures, les lymphocytes T CD4+CD25+ ont été isolé avec une technique plus rapide utilisant le kit MagCelect Rat CD4+CD25+ regulatory T cell (R&D systems). Les lymphocytes CD4+ sont d'abord isolés par sélection négative, puis, CD25+ T cells were isolated by positive selection from the CD4+ T cell fraction. Isolation of CD4+ T cells by negative selection is achieved by tagging unwanted cells with the MagCelect Rat CD4+ T Cell Antibody Cocktail followed by the addition of MagCelect Goat Anti-Mouse Ferrofluid (GAM-FF). The tube with the cell suspension is then placed in the MagCelect Magnet (R&D Systems). Magnetically tagged cells will migrate toward the tube wall on the magnet side (unwanted cell fraction), leaving the untagged cells or desired cell population in suspension ready to be harvested by aspiration while the tube remains in the magnet. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells from the CD4+ T cell isolated fraction is done by positive selection in a test tube by tagging the cells of interest with anti-Rat CD25 biotinylated antibody followed by the addition of the Mag-Celect Streptavidin Ferrofluid (SAV-FF). The tube with the cell suspension is placed in the magnet, and magnetically tagged cells will migrate toward the tube wall on the magnet side, leaving the untagged cells in suspension. Unwanted cells are removed by aspiration while the tube remains in the magnet. The tube containing the magnetically trapped cells is removed from the magnet and the cells re-suspended in Mag-Celect Buffer or media.

## **5. Etude par CMF des lymphocytes T CD4+CD25+ sanguins**

On prélève 200 à 500 µl de sang dans un tube contenant de l'EDTA (MICROTAINER brand tube) et on agite pour homogénéiser. La numération des globules blancs est effectuée sur un automate (Beckman Coulter, LH 750). On dilue ensuite l'échantillon afin d'obtenir une suspension contenant 5x10<sup>6</sup> globules blancs /ml. Dans un tube, on dépose 10 µl de l'anticorps anti-CD4 couplé à la FITC, 10µl de l'anticorps anti-CD25 couplé à la phycoérythrine et 100µl de l'échantillon dilué. On agite lentement au vortex et on incube pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. On ajoute 2 ml de la solution de lyse BD diluée et on agite au vortex. On incube 10 minutes à température ambiante à l'obscurité. Ensuite on centrifuge à 300g pendant 5 minutes sans refroidir et on retire le surnageant. Puis on ajoute 2 ml de PBS et on agite au vortex lentement. On centrifuge à 300g pendant 5 minutes sans refroidir. Enfin, on retire le surnageant, on ajoute 400µl d'Isoton et on passe au cytomètre (Coulter, EPICS® XL-MCL).

## **6. Test de compatibilité croisé ou Cross-match**

Les cellules du donneur cryoconservées en paillettes (4000 cellules par paillette environ) sont décongelées dans de l'eau tiède puis la suspension cellulaire est lavée deux fois en PBS albumine 1%, pour éliminer le cryoprotecteur ou DMSO (diméthyl sulfoxide). Le culot est repris dans du PBS albumine 1%, et la concentration cellulaire est standardisée à 3000 cellules/µL par comptage sur cellule de Malassez. On dépose 100 µL de la suspension cellulaire dans un tube avec 25 µL du sérum à tester. Après une incubation de 30 min à 22 °C, les cellules sont lavées 3 fois dans 1 ml de PBS albumine froid. On ajoute ensuite 2 µL de GAM-PE que l'on incube 30 min à + 4 °C. Les tubes sont lavés de nouveau trois fois en PBS. Le culot est alors repris dans 500 µL de PBS/formol. La lecture est réalisée au cytomètre (FACSCalibur, Becton Dickinson). Chaque test est réalisé en double. Les sérums de rats n'ayant reçu que du RPMI 1640 ont été utilisés comme témoin négatif.

## **7. Evaluation histopathologique**

Les greffons cutanés et les transplants cardiaques sont recueillis lors rejet ou après un suivi de 100 jours. Une partie des prélèvements est fixée dans le formol alors

que l'autre moitié est congelée. Les prélèvements fixés sont inclus en paraffine, coupés au microtome (5µm) et colorés par l'hémalum-éosine-safran pour évaluer les lésions du greffon notamment des lésions d'artériopathie oblitérante qui sont les principales lésions de rejet chronique après transplantation cardiaque. L'évaluation de l'intensité des lésions vasculaires est réalisée selon le protocole adapté de celui décrit par Armstrong (*Armstrong et al, 1997*).

Les fragments congelés sont coupés au cryostat pour réaliser une technique immunohistochimique qui permet de quantifier les différents types de cellules infiltrant le transplant (lymphocytes, plasmocytes, macrophages, polynucléaires), témoins de l'immunité innée et de la réponse adaptative. Les immunomarquages ont été effectués sur l'automate Benchmark Ultra (Ventana, Ilkirch) qui réalise, dans des conditions techniques parfaitement maîtrisées, l'inhibition des peroxydases endogènes dans une solution d'eau oxygénée, l'incubation avec les anticorps primaire puis secondaire et enfin le dépôt d'un substrat de l'enzyme couplé à l'anticorps secondaire, la Diaminobenzidine qui donne un précipité brun visible au microscope. Une contre-coloration nucléaire avec l'hématoxyline est ensuite effectuée avant le montage avec une lamelle. Nous avons utilisé les anticorps anti-CD3 (e-Bioscience), anti-CD45RA (e-Bioscience), anti-NK (Abcam), anti-Foxp3 (e-Bioscience).

## **8. Culture lymphocytaire mixte**

### **a. Isolement de Lymphocytes et marquage par cell trace<sup>TM</sup>**

La rate prélevée stérilement est dissociée avec une pince dans une boîte de pétri. On filtre puis on centrifuge la suspension 5 min à 1500 rpm. Le surnageant est repris dans 2ml de la solution de lyse des globules rouges (incubation 5min à température ambiante). Après lavage, le culot est suspendu dans 1 ml du milieu. On aspire à l'aide d'une seringue contenant de la laine de nylon humidifiée puis on incube pendant 35 min à 37°C. On chasse les lymphocytes à travers la laine sans la toucher avec le piston. Les cellules sont comptées (cellules de Mallassez). On ajoute 1µl de *cell trace<sup>TM</sup>*-PE pour 10<sup>6</sup> cellules. On incube 20 min à 37°C dans l'obscurité. On remplit le tube avec du milieu et on incube de nouveau 5 min à température ambiante dans l'obscurité. Ensuite les cellules sont lavées.

## **b. Culture lymphocytaires mixtes**

Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Sigma) glutaminé auquel on ajoute de la pénicilline, de la streptomycine et 10% de SVF (Sigma). Les lymphocytes de rats Lewis normaux sont co-cultivés 5 jours avec des cellules dendritiques de rats Fischer en présence de LPS 5µg/ml. On incube  $10^5$  lymphocytes/puit en présence de différents rapports de CD : 1:1, 1:2 et 1:5. Un contrôle positif est réalisé en incubant les lymphocytes du receveur avec 5µg/ml de la Concanavalline A. Après 5 jours, le taux de prolifération est mesuré à l'aide d'une technique de cytométrie en flux après marquage des cellules avec de l'anti-CD3 et l'anti-CD45RA.

## **9. Dosage des cytokines.**

Le dosage des cytokines a été effectué avec le kit « Rat Cytokine Array Panel A » (R&D systems). La détection est réalisée sur membranes de nitrocellulose. Chaque test est réalisé en double. Les surnageants des cultures cellulaires sont dilués et incubés avec un cocktail d'anticorps couplés à la biotine, dirigés contre une cinquantaine cytokines. Le mélange est ensuite déposé sur la membrane. Le complexe cytokine/anticorps se lie à l'anticorps secondaire spécifique fixé à la membrane. Après un lavage, on ajoute successivement le complexe Streptavidine/HRP. L'intensité du signal est proportionnelle aux taux des cytokines.

## **10. Groupes expérimentaux**

Les CD<sub>4</sub> (2.106) allogéniques sont injectées seules ou sous couvert d'un AcMo anti-CD4 (clone W3/25, Gentaur, Bruxelles), avant la greffe cutanée (n=4 par groupe) ou la transplantation cardiaque hétérotopique (n=4 par groupe). Cette injection est d'abord réalisée la veille de la transplantation (J-1) ou 4 semaines avant la transplantation (J-28). Les groupes témoins ne recevront que les CD<sub>4</sub> (n=4) ou l'AcMo anti-CD4 (n=4).

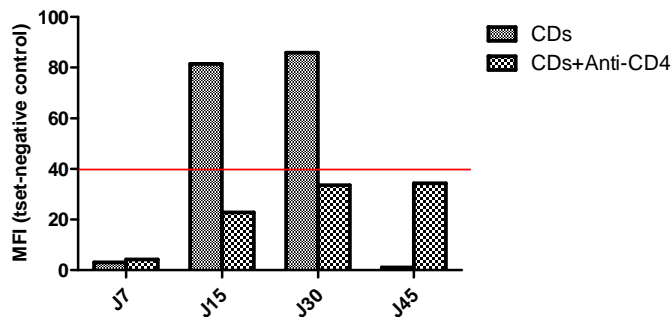
## **11. Analyses statistiques.**

Les différences observées entre les différents groupes expérimentaux seront analysées avec le test t de *Student* et le test de *Fischer*. Une valeur de  $p < 0,05$  sera considérée comme statistiquement significative.

# RESULTATS

## 1. L'injection de cellules dendritiques allogéniques induit la formation d'anticorps anti-donneur qu'il est possible d'inhiber en associant un anticorps anti-CD4 non déplétant (annexe 1)

L'injection de CD<sub>s</sub> OX62+ allogéniques par voie intraveineuse chez les rats Lewis induit la formation d'allo anticorps qu'il est possible de détecter par un test de compatibilité croisé ou Xm qui utilise une anti-globuline de rat couplée à l'allophycocyanine (APC). Les aliquots de sérum congelé à J0, J7, J15, J30 et J45 ont été utilisés. Leur analyse montre un pic d'anticorps à J15 et J30 pour une dose de  $5.10^6$  CD<sub>s</sub>. Lorsqu'on injecte conjointement un Ac anti-CD4, la production de DSA est inhibée (Figure 8)



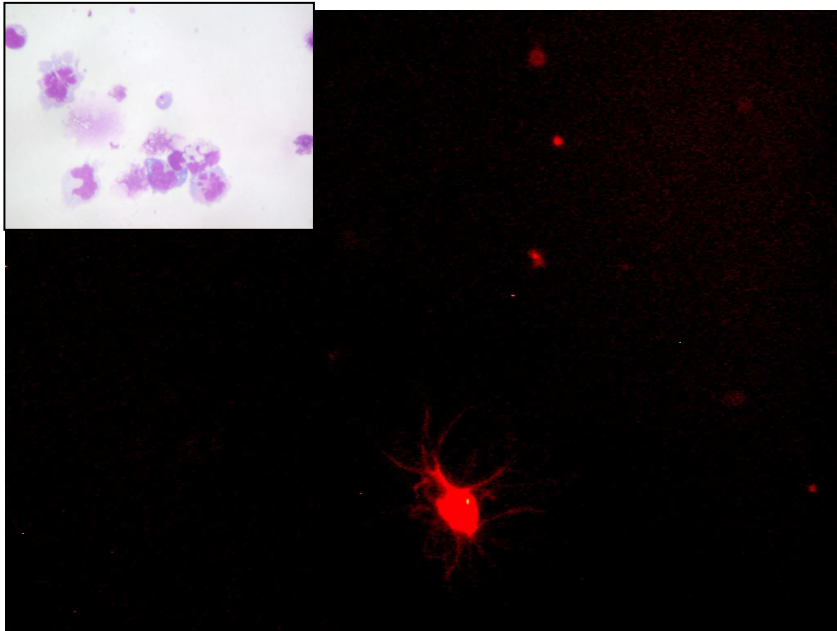
**Figure 8.** Résultats des cross match (Xm) obtenus chez les animaux traités par CD<sub>s</sub> allogéniques et CD<sub>s</sub> + anti-CD4. Le seuil de positivité du Xm a été fixé à 40. Chez les animaux recevant uniquement des CD<sub>s</sub>, le pic est obtenu à J30. Les animaux recevant CD<sub>s</sub>+ anti-CD4 n'ont pas développé d'anticorps dirigés contre les alloantigènes.

## 2. L'injection de cellules dendritiques allogéniques sous couvert d'anticorps monoclonaux anti-CD4 non dépléteurs augmente leur « homing » lymphoïde

Lors du travail antérieur réalisé dans le laboratoire, il a été montré que le chimérisme lymphoïde obtenu après injection de CD<sub>s</sub> allogénique (rate, thymus, ganglion lymphatiques) était indépendant de la dose de CD<sub>s</sub> injectées ( $2.10^6$  versus  $5.10^6$ ). Nous avons donc choisi de travailler avec une dose de  $2.10^6$  CD<sub>s</sub>. Avant d'être injectées au rat receveur, les CD<sub>s</sub> ont été marquées *ex vivo* par un fluorochrome (PKH-26). Après chaque technique d'isolement, nous avons vérifié la qualité du marquage obtenu. Une goutte de la suspension cellulaire a été déposée sur une lame puis recouverte avec une lamelle avant d'être observé au

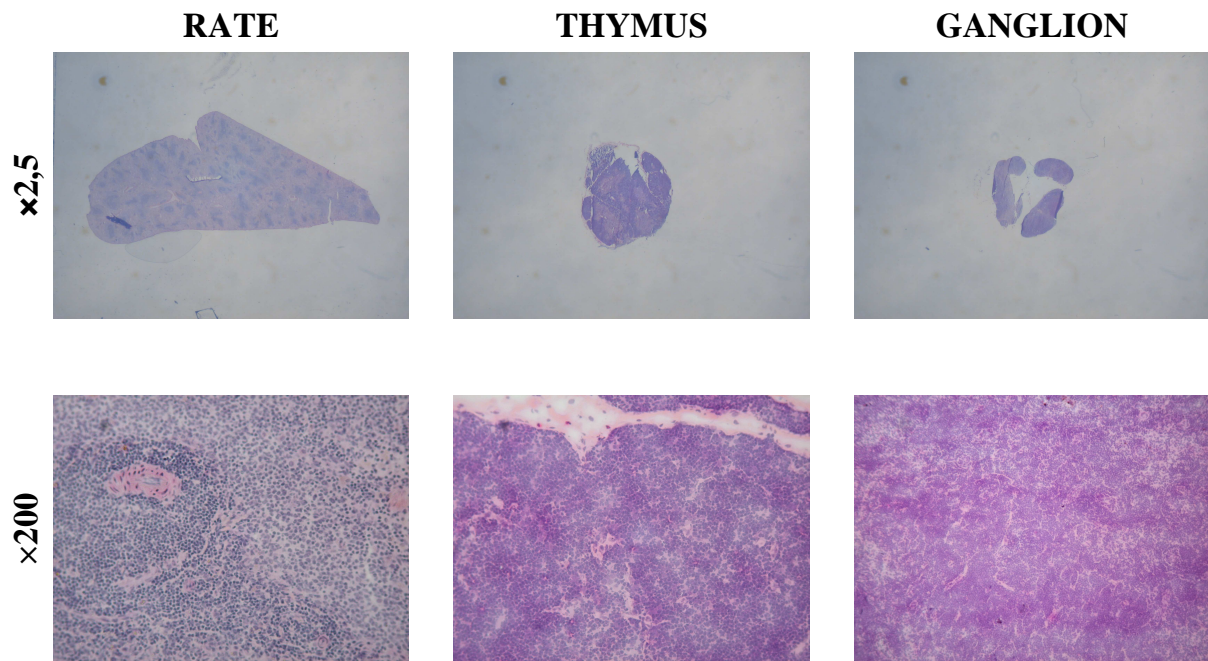


microscope à fluorescence. Dans tous les cas, le marquage des CD était de forte intensité (figure 9).



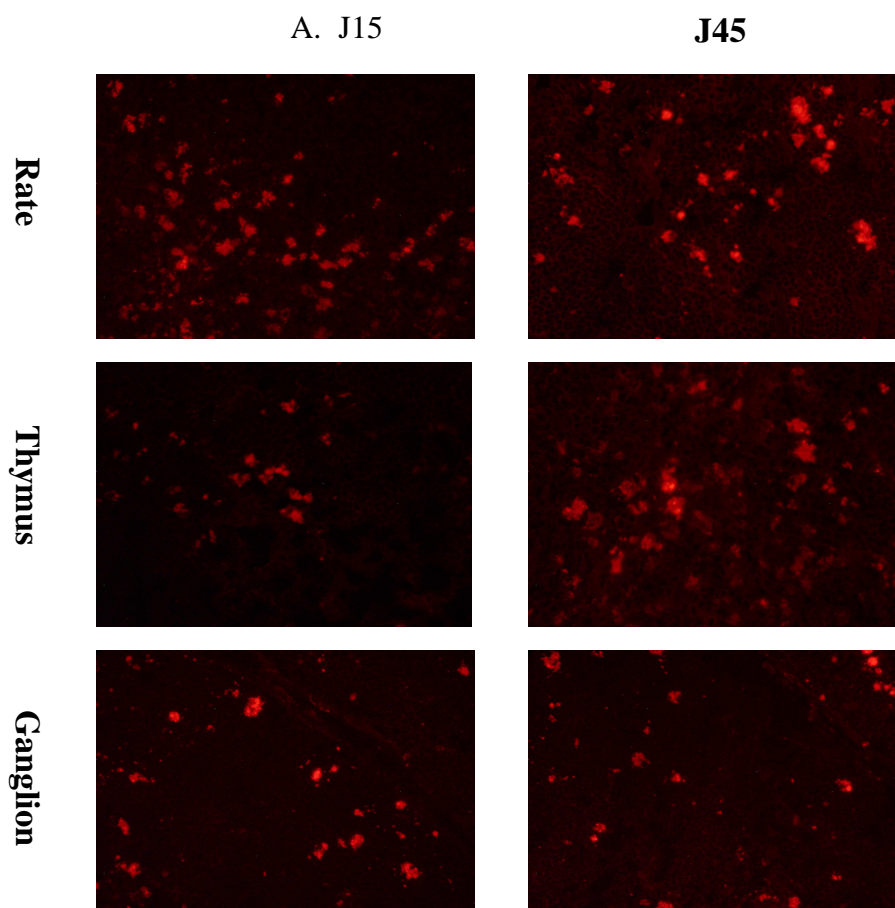
**Figure 9:** Cellules dendritiques fraîches après isolement de la rate. Ces cellules ont un cytoplasme abondant avec des ébauches de prolongements. Leur noyau a un aspect réniforme parfois double (May Grunwalg Giemsa, x400) aspect des CD marquée *ex vivo* par le fluorochrome (PKH-26). Les prolongements cytoplasmiques sont parfaitement visibles sur cette photographie

La détection des cellules PKH26+ a été réalisée 15 et 45 jours après leur injection, sur des coupes en congélation provenant de la rate, du thymus, de ganglion lymphatique mésentérique, du cœur, du rein, du foie et de la peau. Une coloration par l'hémalun-éosine-safran a permis de vérifier avant le comptage la nature des tissus prélevés (figure 10). Le marquage préalable des coupes avec un anticorps anti-CD86 couplé à la fluorescéine a permis de vérifier si les cellules PKH26+ exprimaient ce marqueur de maturation. Sur chaque coupe examinée au microscope à fluorescence, nous avons pris 5 photographies au fort grossissement (figure 11). C'est à partir de ces photos que la numération des cellules PKH26+ a été effectuée.



**Figure 10.** Aspects microscopiques des organes prélevés (J15 et J45) après injection de cellules dendritiques allogéniques sous couvert d'anticorps anti-CD4 non dépletants. La coloration par l'hémalun-éosine-safran réalisée sur une coupe en congélation a permis de vérifier que les organes prélevés correspondaient bien à ceux attendus.

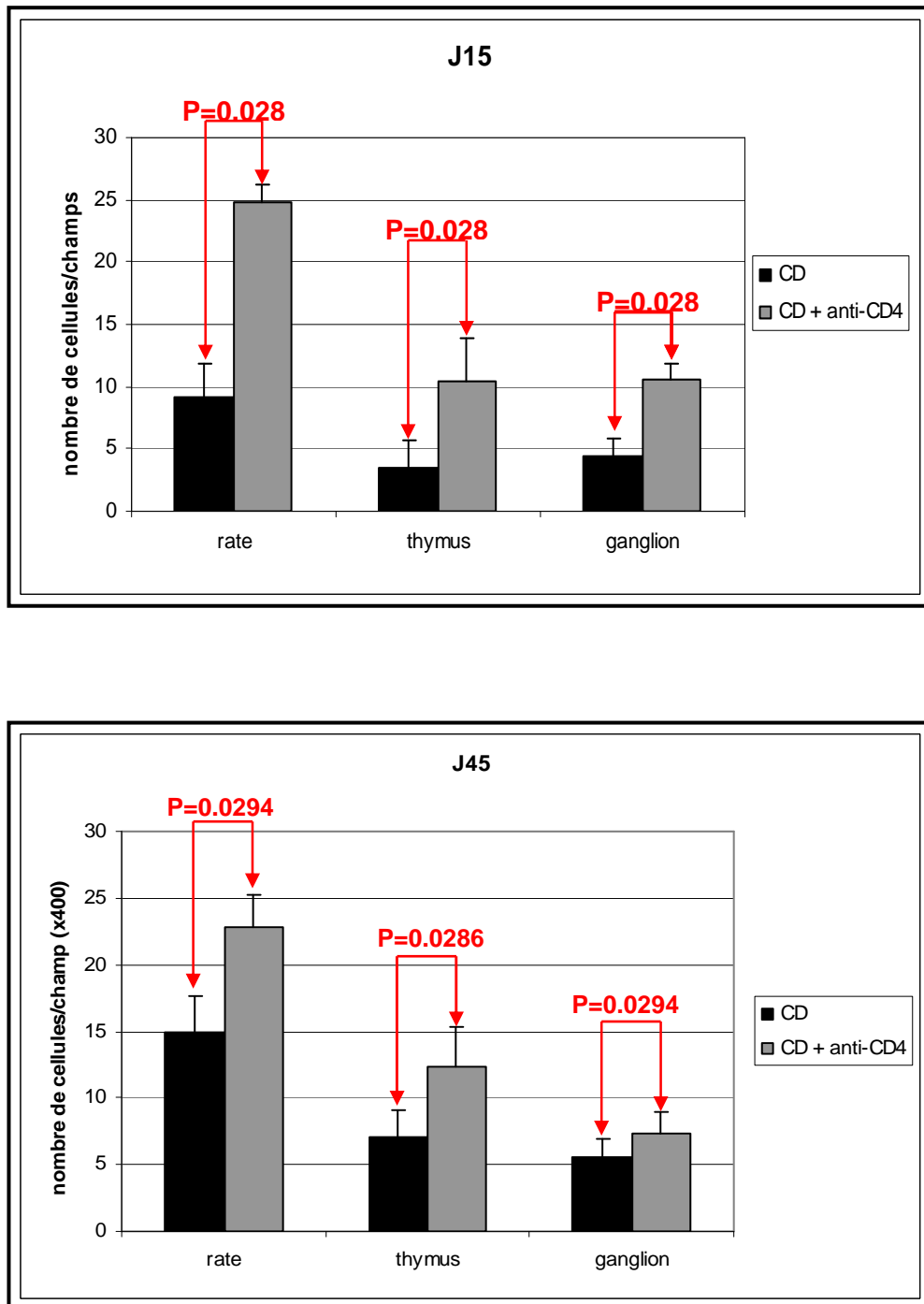
## PKH-26



**Figure 11.** Visualisation au microscope à fluorescence des cellules PKH26+ (TRITC) sur des coupes congelées de tissu splénique, thymique et ganglionnaire lymphatique. Dans certaines cellules l’empreinte du noyau est parfaitement visible.

Le marquage avec l’anticorps anti-CD86 FITC n’a pas mis en évidence de cellules PKH26+CD86+. Par contre, nous avons observé au contact d’éléments PKH26+ des cellules CD86+ (figure 11).

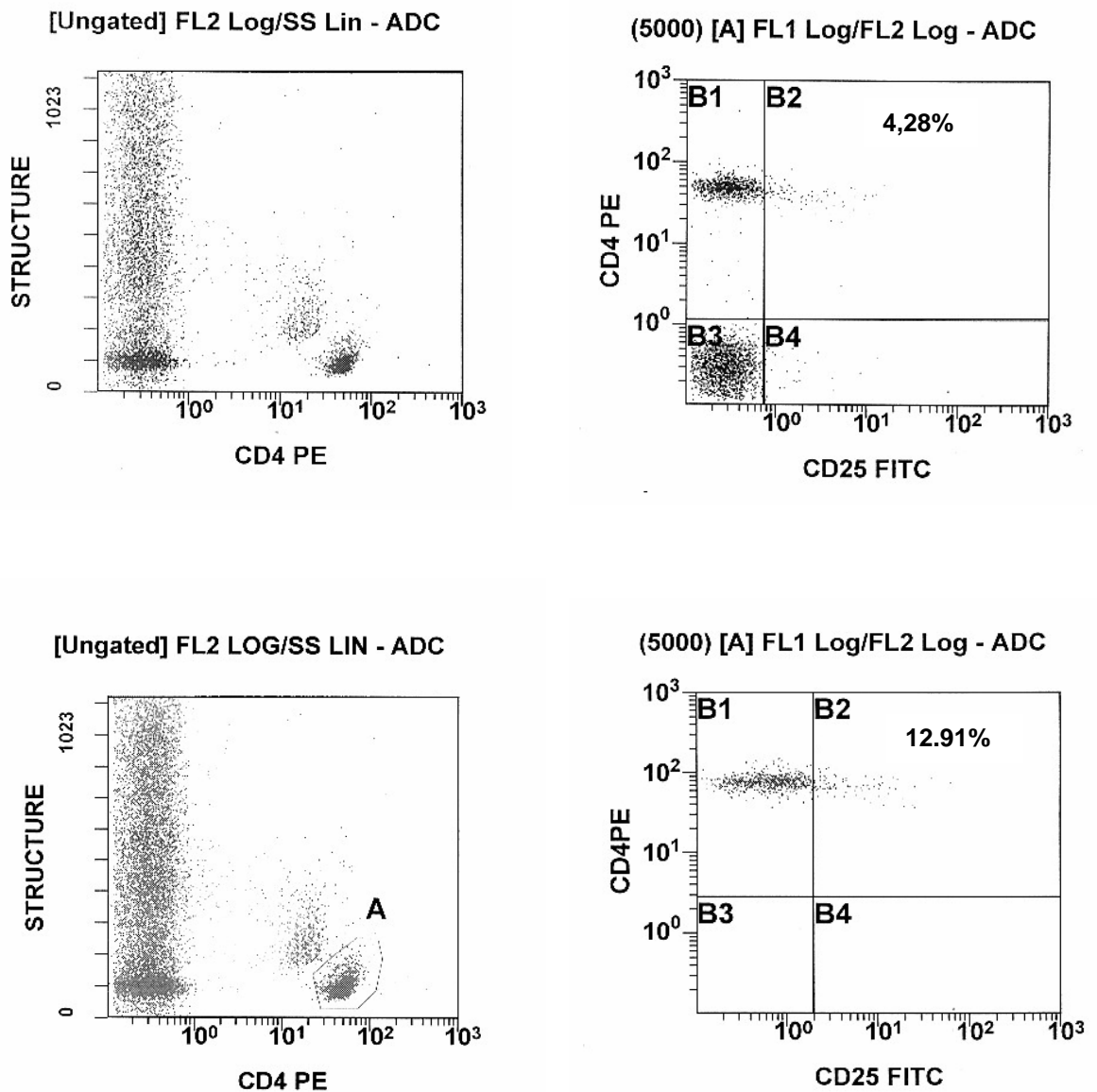
La figure 12 résume le comptage des cellules PKH26+ observés à J15 et J45 au niveau des organes lymphoïdes.



**Figure 12.** Comparaison du nombre de cellules dendritiques PKH26+ détectés dans la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques à J15 et J45, chez des animaux ayant reçus des cellules dendritiques seules ou sous couvert d'anticorps monoclonaux anti-CD4 non dépletants.

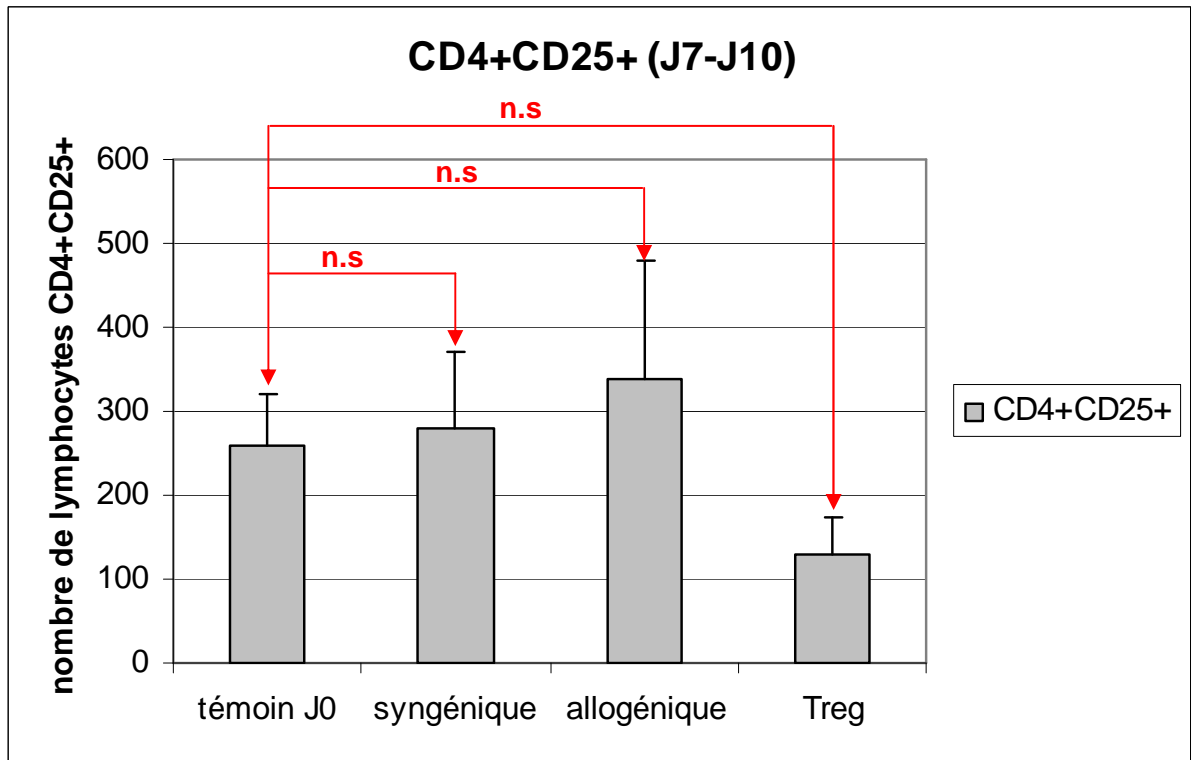
### 3. Après greffe cutanées allogéniques, le nombre de lymphocytes T CD4+CD25+ circulants est diminué dans le groupe ayant reçu des lymphocytes T régulateurs sensibilisés avant la greffe

La quantification des lymphocytes T régulateurs circulants a été réalisée par cytométrie en flux à J0 et J7-10 dans chaque groupe. Nous avons déterminé le pourcentage de lymphocytes CD4+CD25+ par rapport aux lymphocytes totaux et aux lymphocytes CD4+ (figure 13).



**Figure 13.** Histogrammes obtenus par cytométrie en flux. Initialement, la fenêtre a été placée en regard du nuage de lymphocytes. Puis, elle a été placée en regard des lymphocytes CD4+ permettant de calculer le pourcentage de lymphocytes CD4+CD25+ au sein de cette sous population lymphocytaire.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 14.



**Figure 14.** Nombre de lymphocytes T CD4+CD25+ dans le sang des différents groupes expérimentaux. La comparaison des données provenant de chaque groupe a été effectuée avec le test w non paramétrique. ns : non significatif.

#### **4. L'injection de CD<sup>4</sup>OX62<sup>+</sup> et d'anticorps anti-CD4 ou de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> provenant d'animaux sensibilisés induit la tolérance de transplants allogéniques cutanées ou cardiaques et empêche la production d'anticorps anti-donneur (annexes 2 et 3)**

Les principaux résultats expérimentaux obtenus après transplantation sont regroupés dans le manuscrit présenté ci-après. Les résultats des cultures lymphocytaires mixtes sont incomplets car nous avons eu beaucoup de difficulté à faire proliférer les splénocytes de rats. Une inhibition partielle de la prolifération des LyT a été obtenue avec les Treg naïfs. Les expériences avec les Treg sensibilisés sont en cours.

**Donor-specific inducible regulatory T cells abrogate the production of donor-specific antibodies after skin and heart transplantation in the rat**

*Alawieh M<sup>1, 2</sup>, Malapert G<sup>3</sup>, Bouchot O<sup>3</sup>, Trad M<sup>1, 2</sup>, Courcet E<sup>4</sup>, Bonnotte B<sup>1,2</sup>, Rifle G<sup>5</sup>, Mousson C<sup>5</sup>, Martin L<sup>1, 2, 4</sup>.* <sup>1</sup>INSERM, UMR1098, F-25020 Besançon cedex, France. <sup>2</sup>Université de Bourgogne, UMR1098, Faculté de Médecine, IFR100, F-21034 Dijon, France <sup>3</sup>Department of Cardiac Surgery, University Hospital; Dijon, France. <sup>4</sup>Department of Pathology, University Hospital Dijon, France. <sup>5</sup>Department of Nephrology and Transplantation, University Hospital; Dijon, France.

Address:  
Laurent MARTIN  
Pathology Department  
Plateau Technique de Biologie  
2, rue Angélique Ducoudray  
BP 30700  
21070 Dijon (France)  
Email : laurent.martin@u-bourgogne.fr

Key words: tolerance, rat, transplantation, antibodies, skin, heart, regulatory T cells, B cells



## **Introduction**

Tolerance induction is a major issue in organ transplantation. In rodents, it can be achieved by the association of donor-derived cells and monoclonal antibodies (mAbs) (1). More than 15 years ago, Saitovitch et al. (2) demonstrated that the addition of a non-depleting anti-CD4 mAbs to donor-specific transfusion (DST) induces tolerance to allogeneic transplants, provided that a critical interval is respected. This transfusion effect depends in part on the induction of CD4+CD25+ regulatory T cells (Treg) that accumulate in the spleen (3, 4). Whether the association of donor-derived cells with mAbs can strengthen the mechanisms of tolerance to enable persistence of allogeneic cells in the recipient is a matter of debate (5). Dendritic cells (DC) that express high levels of major histocompatibility complex antigens act usually as professional antigen-presenting cells. They may also have tolerogenic properties. In different rodent models, various populations of immature, mature, or manipulated donor-derived DC together with mAbs or CTLA4-Ig prolong heart allograft survival (1, 6–7). In rats, OX62 is expressed by a sub-population of splenic non-plasmacytoid DC (8). We previously demonstrated that injection of mature splenic DC together with a non-depleting anti-CD4 mAbs induces anergy, probably by decreasing the expression of co-stimulatory molecules, especially CD80 (9).

The present study evaluates the ability of the injection of allogeneic OX62+ DC and a non-depleting anti-CD4 mAbs to induce tolerance in

the Fischer-Lewis rat model (10) that differs only at MHC class I antigen, leading to a rejection process dependent on CD4+ T cells and DSA (11). We hypothesize that this protocol is capable of generating donor-specific Tregs that will probably interact not only with T cells but also with B cells and the production of donor-specific antibodies (DSA).

## **Material and Methods**

### **1. Cells isolation**

#### ***1.1. OX62+ dendritic cells***

Spleens from naïve F344 were minced and digested in 2 mg/ml collagenase D (Roche Diagnostics) in RPMI 1640/1% FCS for 15 min at 37°C. EDTA at 10 mM was added for the last 5 min, and the cell suspension was then pipetted up and down several times and filtered. Cells were separated into high-density cells (containing most of the pDC) and low-density cells (containing most of the OX62 DC) using 14.5% Nycodenz (Nycomed) gradient centrifugation. OX62+ subsets of spleen DC were isolated from low-density cells after staining with anti-OX62 MoAbs associated with magnetic beads (Miltenyi) according to the manufacturer's instructions. Purity of cells was routinely > 95%.

#### ***1.2. Splenocytes***

The spleen was removed aseptically and crushed with forceps in a Petri dish. After washing and lysis of red blood cells, cells were suspended in 1 ml of medium. The suspension was aspirated with a syringe through moistened nylon wool and incubated for 35 min at 37 ° C. Cells were recovered, washed and counted.

### **1.3. CD4+CD25+ T cells**

CD4+CD25+ T cells were harvested from the spleen of naïve Lewis or Lewis sensitized with donor-OX62+ DC and non-depleting anti-CD4 monoclonal Abs. Spleens were minced and digested as described previously for OX62<sup>+</sup>-DC isolation. For tissue culture, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated using the MagCelect Rat CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell isolation kit (R&D systems). Briefly, CD4<sup>+</sup> T cells were initially isolated by negative selection, and then, CD25<sup>+</sup> T cells were isolated by positive selection from the CD4<sup>+</sup> T cell fraction. Isolation of CD4<sup>+</sup> T cells by negative selection is achieved by tagging unwanted cells with the MagCelect Rat CD4+ T Cell Antibody Cocktail followed by the addition of MagCelect Goat Anti-Mouse Ferrofluid (GAM-FF). The tube with the cell suspension is then placed in the MagCelect Magnet (R&D Systems). Magnetically tagged cells migrate toward the tube wall on the magnet side (unwanted cell fraction), leaving the untagged cells or desired cell population in suspension ready to be harvested by aspiration while the tube remains in the magnet. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells from the CD4+ T cell isolated fraction is done by positive selection in a test tube by tagging the cells of interest with anti-Rat CD25 biotinylated antibody followed by the addition of the Mag-Celect Streptavidin Ferrofluid (SAV-FF). The tube with the cell suspension is placed in the magnet, and magnetically tagged cells will migrate toward the tube wall on the magnet side, leaving the untagged cells in suspension. Unwanted cells are removed by aspiration while the tube remains in the magnet. The tube containing the magnetically

trapped cells is removed from the magnet and the cells re-suspended in Mag-Collect Buffer or media.

For injection *in vivo*, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells were isolated with CD4 and CD25 microbeads (Miltenyi). Splenocytes ( $10^8$ /ml) were stained (15min at 4°C) anti-CD4-APC (clone OX35, BD Pharmingen) and anti-CD25-PE (clone OX39, BD Pharmingen). Then, cells (960  $\mu$ l) were incubated 15 mn at 4°C with 40  $\mu$ l anti-APC microbeads (Miltenyi Biotec). CD4<sup>+</sup> T cells were isolated through MS column surrounded by MACS magnet. Cells were re-suspended in PBS ( $2 \times 10^7$ /100 $\mu$ l). Beads were removed with Multisort Release Reagent (Miltenyi Biotec). Finally, cells were incubated with 20 $\mu$ l anti-PE (15 min at 4°C). After 2 washes, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> were sorted with magnetic beads.

## **2. Tissue culture**

A standard culture medium RPMI 1640 (SIGMA) glutamine plus 10% Fetal Calf Serum (SIGMA) and antibiotics (penicillin and streptomycin, SIGMA) was used. The suspension of splenocytes from naive Lewis rats was first incubated for 20 min at 37°C in the dark with cell trace<sup>TM</sup>-PE (1 $\mu$ l/ $10^6$  cells). Then, the tube was filled with medium and incubated for 5 min at room temperature in the dark and washed. Splenocytes ( $10^5$  cells/well) were co-cultured for 96 hours at 37.5°C in 5% CO<sub>2</sub> with different ratio (1:1, 1:2 and 1:5.) of DCs from Fischer rats in the presence of 5 $\mu$ g/ml of LPS. A positive control was performed by incubating the recipient cells with of 5 $\mu$ g/ml of Concanavallin A (SIGMA). The proliferation rate was measured using a technique of

flow cytometry after cell staining with anti-CD3 and anti-CD45RA antibodies.

### **3. Skin graft**

Fischer (F344) rats (RT1<sup>lv</sup>) were used as donors and Lewis (Lew) rats (RT1<sup>l</sup>) as recipients. Brown Norway (BN) rats were used as third party. Individual full-thickness skin grafts were prepared to fit the graft bed on the left lateral thorax of anesthetized recipients (isofluorane). The grafts were inspected regularly until they were completely destroyed, at which time the grafts were considered rejected.

### **4. Heart transplantation**

Fischer (F344) rats (RT1<sup>lv</sup>) were used as donors and Lewis rats (RT1<sup>l</sup>) as recipients. Intra-abdominal heterotopic cardiac transplantation was performed as described by Ono and Lindsey (12). Heart beats of cardiac transplants were monitored by daily palpation through the recipient's abdominal wall. Rejection was defined as the time of cessation of graft beating and confirmed by direct inspection and histological examination.

### **5. Flow cytometric cross matches**

Donor-specific antibodies were detected in recipient sera using flow cytometric cross-matches with recipient serum samples obtained at days 7, 15, 30, and 45 and donor lymphocytes. Fresh splenocytes from the donor were isolated using FICOLL gradient centrifugation, then suspended in PBS (3000 cells/ $\mu$ l). Cells (100 $\mu$ l) were incubated with

25µl of the sera of the recipients for 30 min at room temperature, washed 3 times and incubated with 2 µl of anti-rat globulins-PE (eBiosciences). Cells suspended in PBS/formalin were then analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson). Each test was done in duplicate. Sera from naive rats were used as negative controls and sera from immunized rats as positive controls. The results were compared with negative and positive controls.

## **6. Cytokines assay**

The cytokines assay was done with the Rat Cytokine Array Panel A (R&D systems). Capture and control antibodies were spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. Cell culture supernates were diluted and mixed with a cocktail of biotinylated detection antibodies. The mixture was then incubated with the Rat Cytokine Array Panel A membrane. The cytokine/detection antibody complex is bound by its cognate immobilized capture antibody on the membrane. Following a wash to remove unbound material, Streptavidin-HRP and chemoluminescent detection reagents were added sequentially. Light was produced at each spot in proportion to the amount of cytokine bound.

## **7. Histology and immunohistochemistry**

For pathological evaluation, skin grafts and heart transplants were fixed in 4% formalin and embedded in paraffin. Five micrometer sections were stained with Haematoxylin and Eosin. Slides were reviewed by an experienced pathologist blinded to the study group.

For immunohistochemistry, frozen samples from skin grafts and heart transplants were cut into 5  $\mu\text{m}$  sections in a cryostat, dried at room temperature for 2 hours and fixed in acetone for 10 min. Sections were stained with an automate (Benchmark Ultra, Ventana) using primary monoclonal Abs direct to T lymphocytes (CD3) (BD-biosciences), B lymphocytes (CD45RA) (BD-biosciences), Treg (FOXP3) (BD-biosciences), and NK cells (Abcam).

## **8. Experimental groups**

For primary transplants, recipients were conditioned before grafting with  $2 \cdot 10^6$  donor OX62+ DC and/or anti-CD4 mAbs (2mg) at d-28 and/or d-1 (n=4 per group).

For Treg groups, CD4+CD25+ lymphocytes were harvested from the spleen of naïve or sensitized Lewis rats and transferred to naïve recipient ( $2 \cdot 10^6$ ) before grafting (d-1).

Control groups included syngenic, allogenic grafts and recipients conditioned only by donor-DC or anti-CD4 mAbs prior grafting.

## **9. Statistical analysis**

Differences observed between data from each experimental group were compared using the t test and Fisher exact test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### ***1. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit in vitro the proliferation of T cells***

Before performing transplantation, we checked by MLR, that CD4+CD25+ T cells isolated from the spleen of naïve rats were able to inhibit the proliferation of allogenic T splénocytes. The percentage of inhibition was 45.5% for T cells and null for B cells (figure 1).

### ***2. Conditioned recipient accept indefinitely primary allogenic skin graft and primary allogenic heart transplants***

In the first set of experiments, recipients were sensitized before skin graft or heart transplantation, with OX62+-donor DC and/or anti-CD4 mAbs either at day-1 or day-28. Rats transplanted with syngenic and allogenic transplants were used as controls. Indefinite survival was achieved in skin and heart groups, only for recipients conditioned at d 28. Tolerant rats did not develop deleterious DSA. Interestingly, DSA were not detected in some rats conditioned at d-28 or d-1 whereas all rats receiving only anti-CD4 mAbs had Abs to donor antigens (figure 2). Grafts from tolerant animals did not show epithelial atrophy (figure 3) or obliterant arteriopathy (figure 4). They were no accumulation of B cells or FOXP3+ cells in skin grafts or heart transplant at the end of the follow up (day 100).



***3. Injection of conditioned CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells to the recipient prior grafting prolong indefinitely the survival of allogenic skin and heart transplants***

In order to check if Treg were involved in the tolerance of allogenic transplants, CD4+CD25+ were harvested from the spleen of naïve and sensitized recipients and injected the day before skin or heart transplantation to a naïve recipient. Treg harvested from naïve rats were used as control. After adoptive transfer, Treg from sensitized animals were able to induce indefinite graft survival of allogenic skin grafts and heart transplants whereas Treg from naïve animals did not. Tolerant rats did not develop deleterious DSA. Even if Treg from naïve rats prolonged the survival of allogenic grafts, they did not abrogate the production of DSA (Figure 5). Grafts from tolerant animals did not show epithelial atrophy or obliterant arteriopathy. They were no accumulation of B cells or FOXP3+ cells in tolerant skin grafts or heart transplant at the end of the follow up (day 100).

***4. CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells harvested after the injection of donor-specific DC under the cover of non-depleting anti-CD4 antibodies are inducible donor-specific Treg.***

Finally, using third party donors (BN), we demonstrated that Treg generated by the injection of donor OX62+ DC and anti-CD4 mAbs were donor specific and unable to prolong indefinitely the survival of skin grafts from a third party and inhibit the production of Abs to third party antigens. (Figures 3)

## **Discussion**

In this study, we demonstrated that inducible Treg generated after the injection of donor-OX62+ DC and anti-CD4 mAbs are capable of inducing indefinite survival of allogenic skin and heart transplants. In rodent models, CD4 blockade, using non depleting antibodies is a well known strategy for inducing tolerance sustain by Treg (13). Tolerant animals from our experimental groups did not develop vascular lesion of chronic rejection despite the presence of DSA in some recipients.

The injection of donor-OX62+ DCs prior grafting induces micro-chimerism in primary and secondary lymphoid organs as long as 45 days after injection (10). It is likely that donor-DCs immediately after the injection present directly allo-antigens to lymphocytes of the recipient. As DCs are not able of proliferation and self renewal, they will probably die, leading to the processing of allo-antigens by macrophages and/or recipient DCs and the presentation of allo-antigens by the indirect pathway (14, 15).

In rodents, micro-chimerism plus donor specific Treg generated by the direct pathway can inhibit acute rejection but not chronic rejection of allogenic grafts. Nevertheless, when micro-chimerism is associated with Treg generated by the direct and the indirect pathways, inhibition of acute and chronic rejection is achieved (16, 17). In our model, heart transplants from tolerant animals did not show any vascular lesion of

chronic rejection suggesting that our protocol generate both subsets of Treg.

Although Treg did not inhibit the proliferation of B cells in tissue culture, the absence of deleterious DSA in tolerant animals suggest that Treg interact *in vivo* with B cells and/or T helper follicular cells, for inhibiting the maturation of B cells and the production of DSA. Treg is known to regulate the T cell response but also to regulate B-cell activation by reducing IgG production and isotype switch (18). The specific recognition of allo-epitope on B cells by Treg can also result in B cell lysis (19, 20). Then, in the absence of B cells activation, antigen presented by naive B cells could also generate T cells with a regulatory phenotype (21) or expand allogenic Foxp3+CD4+ T cells (22). The existence of regulatory B cells was first suggested by experiences of adoptive transfer of naïve B cells that promote tolerance of murine skin allografts (23). In human, regulatory B cells could belong to the transitional B cell compartment that secretes larger amounts of IL10 after CD40 stimulation compared to other B cells subsets (24). A similar compartment exists in mice (25). In rats, B cells with regulatory properties have recently been described in animals treated with a desoxyspergualin analog (26). These cells accumulate into allogenic skin grafts of tolerant animals and are able to induce tolerance after adoptive transfer. Nevertheless, they did not express IL10 suggesting that they are different from regulatory B cells previously described in the literature (27, 28). In the study of Callaghan et al (17), tolerance was robust, breakable only in one case

after injection of anti-CD4 mAbs that depleted CD4+CD25+ Treg and induced DSA production.

Interestingly, in our study, one recipient conditioned before primary skin graft with OX62+ DC and anti-CD4 mAbs develop DSA without rejection. In clinical transplantation, anti-HLA Abs are associated with increased graft failure but 25% of recipients with DSA have normal appearance of their graft (29, 30). Le Texier et al (26) showed, in rats, that DSA produced by tolerant recipient with Breg accumulated in skin grafts, induce the expression of protective molecules by endothelial cells like HO-1, NOTCH-4 or CLEC-1 (31).

In our study, Treg from sensitized rats, injected at day-1 before grafting were capable of inducing tolerance to skin and heart transplants, preventing vascular lesion of chronic rejection and DSA production. Obliterant arteriopathy has mainly been studied in murine model of chronic rejection using partial MHC mismatch (32). Treg generated *in vivo* prior transplantation or expanded *ex vivo* have been shown to prevent fibro-intimal proliferation. They could act by accumulating directly in the graft (33) or by preventing the priming of effector cells in draining lymph nodes (34). In our model, the absence of Treg in the transplants is in favour of the latter. Nevertheless, as studies of the grafts were performed at the end of the follow up, a transient accumulation of these cells into the graft can not be ruled out.

We have also shown that blockade of CD4<sup>+</sup> cells, with anti-CD4 mAbs alone, was not sufficient to induce tolerance. Therefore, rat conditioned with anti-CD4 mAbs alone before grafting, had delayed rejection and produced DSA. Anti-CD4 mAbs treatment abrogates the production of IL2 and the post transcriptional transcription of IFN $\gamma$  mRNA. But, the unresponsiveness of treated CD4<sup>+</sup> T cells can be reverse by exogenous IL2 (35).

In conclusion, we demonstrated that allo-specific Treg generated after the injection of donor OX62<sup>+</sup> DC and anti-CD4 mAbs induce tolerance of skin and heart transplants and the blockade of deleterious DSA. DSA detected in primary recipients and recipients conditioned with sensitized Treg were not associated with rejection or lesion of the graft. This suggests that DSA can not be regarded only as a marker of humoral rejection, particularly in non sensitized recipients.

## References

1. Rife G, Mousson C: Donor-derived haematopoietic cells in organ transplantation: a major step toward allograft tolerance? *Transplantation* 75:S3, 2003
2. Saitovitch D, Bushell A, Mabbs D, et al: Kinetics of induction of transplantation tolerance with a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation: a critical period of time is required for development of immunological unresponsiveness. *Transplantation* 61:1642, 1996
3. Chosa E, Hara M, Watanabe A, et al: Spleen plays an important role in maintaining tolerance after removal of the vascularized heart graft. *Transplantation* 83:1226, 2007
4. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, et al: CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080, 2002
5. Monaco AP, Medawar P: Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation* 75:13S, 2003
6. Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, et al: Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation* 72:1556, 2001
7. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, et al: "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *J Immunol* 177:5868, 2006

8. Voisine C, Hubert FX, Trinité B, et al: Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284, 2002
9. Simoneau-Robin I, Mousson C, Zanetta G, et al: In vitro study of alloreactivity and microchimerism after injection of dendritic cells and anti-CD4 monoclonal antibody in a combination of Lewis-Wistar Furth rats. *Transplant Proc* 30:2857, 1998
10. Bocrine OJ, Abdelouhab K, Martin L, Mousson C, Rifle G. Study of microchimerism in the Lewis rat after injection of F-344 rat allogenic dendritic cells. *Transplant Proc* 38:2349-51, 2006
11. Morton AL, Bell EB, Bolton EM, Marshall HE, Roadknight C, McDonald M, Bradley JA. CD4+ T cell-mediated rejection of major histocompatibility complex class I-disparate grafts: a role for alloantibody. *Eur J Immunol* 1993, 23: 2078-2084
12. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57:225-229, 1969
13. Bushell A, Mazuz K, Kingsley C, Wood KJ. Pre-transplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003; 76: 449-55
14. Sánchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, Mariat C, Kenny J, Degauque N, Zheng XX, Strom TB, Turka LA, Sayegh MH Sanchez-Fueyo J Immunol 2006 Specificity of CD4+CD25+ regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol*. 2006, 176: 329-34
15. Hara M. Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory t cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J Immunol* 2001, 166: 3789-3796

16. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoni P, van Meervijk JPM. Prevention of acute and chronic rejection with CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Med* 14: 88-92, 2008
17. Callaghan CJ, Rouhani FJ, Negus MC, Curry AJ, Boloton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. Abrogation of antibody-mediated allograft rejection by regulatory CD4 T cells with indirect specificity. *J Immunol* 178: 2221-2228, 2007
18. Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gotot J, Kurts C. CD25+ Treg specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue auto-antigens. *Eur J Immunol* 39:225-33, 2009
19. Jansens W, Carlier V, Wu B, Vanderelst L, Jacquelin H, Saint Remy JM. CD4+CD25+ T cells lyse antigen presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 2003, 171: 4604-4612
20. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006, 107: 3925-3932
21. Reichardt P, Dornbach B, Rong S, Beissert S, Gueler F, Loser K, Gunzer M: Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 110:1519-1529, 2007
22. Chen X, Jensen PE: The role of B lymphocytes as antigen presenting cells. *Arch Immunol Ther Exp* 56: 77-83, 2008
23. Fuchs EJ, Matzinger P. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258: 1156-9, 1992
24. Blair PA, Norena LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, Mauri C: CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory



capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32:129-140, 2010

25. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein MR, Flavell RA, Mauri C. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol.* 186:5569-79, 2011

26. Le Texier L., Thebault P., Lavault A., Usal C., Merieau E., Quillard T., Charreau B., Souillou JP., Cuturi MC., Brouard S., Chiffolleau E. Long-Term Allograft tolerance is characterized by the accumulation of b cells exhibiting an Inhibited Profile. *Am J Transplant* 11: 429-438, 2011

27. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol.* 2007; 178:7868-78

28. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, Li M, Forner K, Birman E, Boivin MN, Young YK, Perreault C, Galipeau J. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med* 15:1038-45, 2009

29. Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, Valeri M, Torlone N, Adorno D, Casciani CU. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: post-transplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation* 71:1106-12, 2001

30. Haririan A, Kiangkitiwan B, Kuruga D et al. The impact of C4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication of renal biopsy. *Am J Transplant* 9: 27-58, 2009

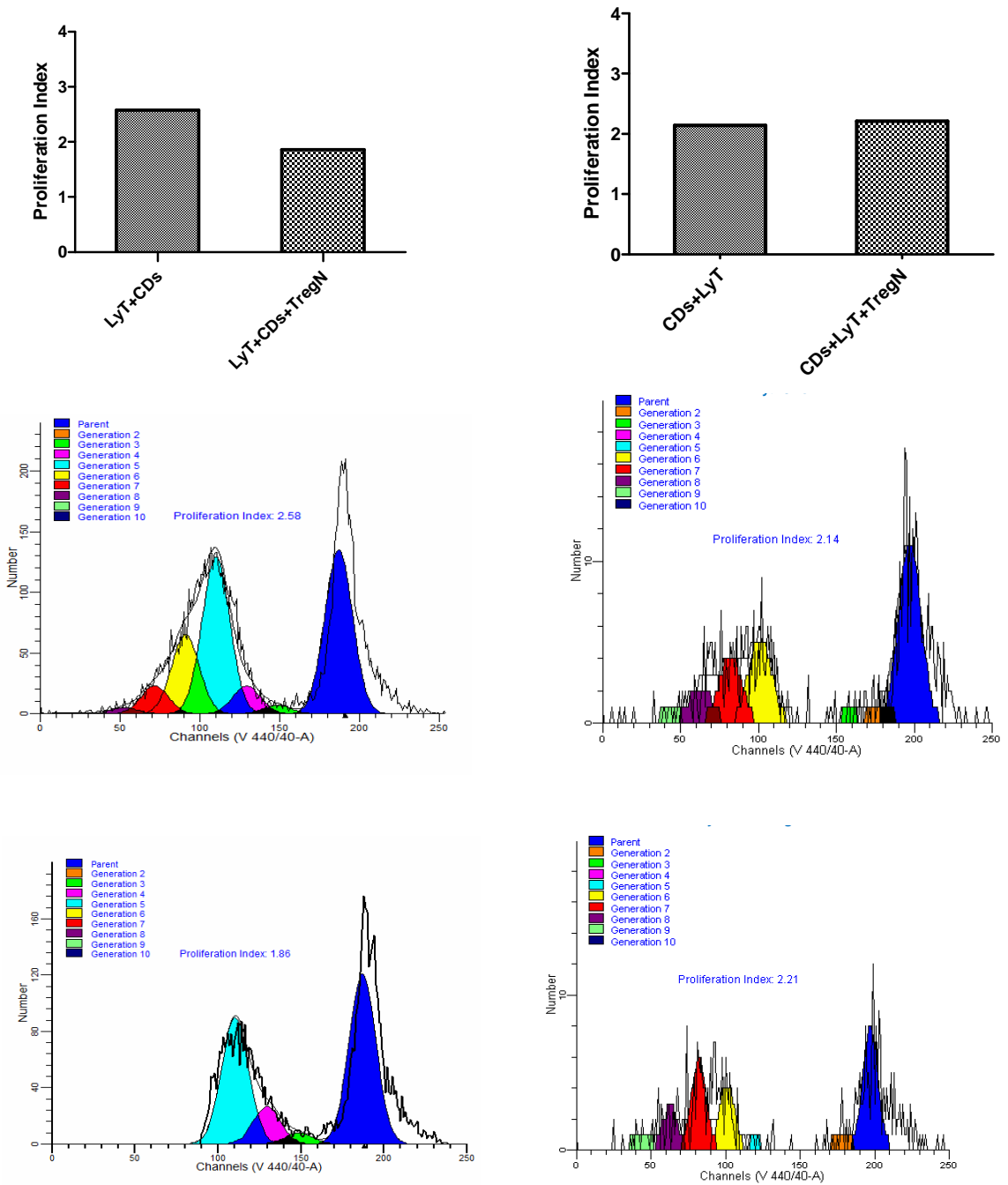
31. Zhang Q, Nakaki T, Iwami D, Niimi M, Shirasugi N. Induction of regulatory T cells and indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts by ursodeoxycholic acid in mice. *Transplantation* 88:1360-70, 2009

32. Shirwan H, Mhoyan A, Yolcu ES, Que X, Ibrahim S. Chronic cardiac allograft rejection in a rat model disparate for one single class I MHC molecule is associated with indirect recognition by CD4<sup>+</sup> T cells. *Transpl Immunol* 2003;11: 179-85.

33. Nadig SN, Wieckiewicz J, Wu DC, Warnecke G, Zhang W, Luo S, Schiopu A, Taggart DP, Wood KJ. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med* 16:809-13, 2010

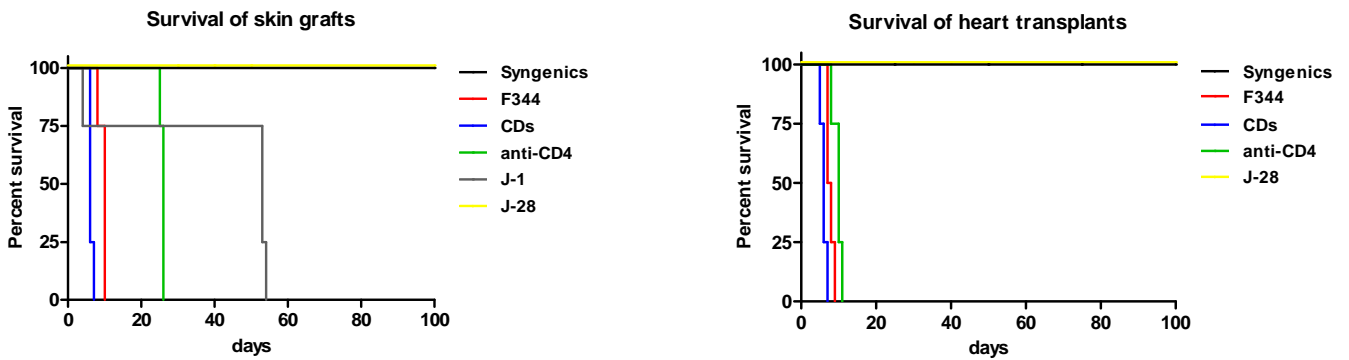
34. Carvalho-Gaspar M, Jones ND, Luo S, Martin L, Brook MO, Wood KJ. Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells. *J Immunol* 180:6640-8, 2008

Sawitzki B, Kieselbach B, Fisser M, Meisel C, Vogt K, Gaestel M, Lehmann M, Risch K, Grütz G, Volk HD. IFN-gamma regulation in anti-CD4 antibody-induced T cell unresponsiveness. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 695-703.

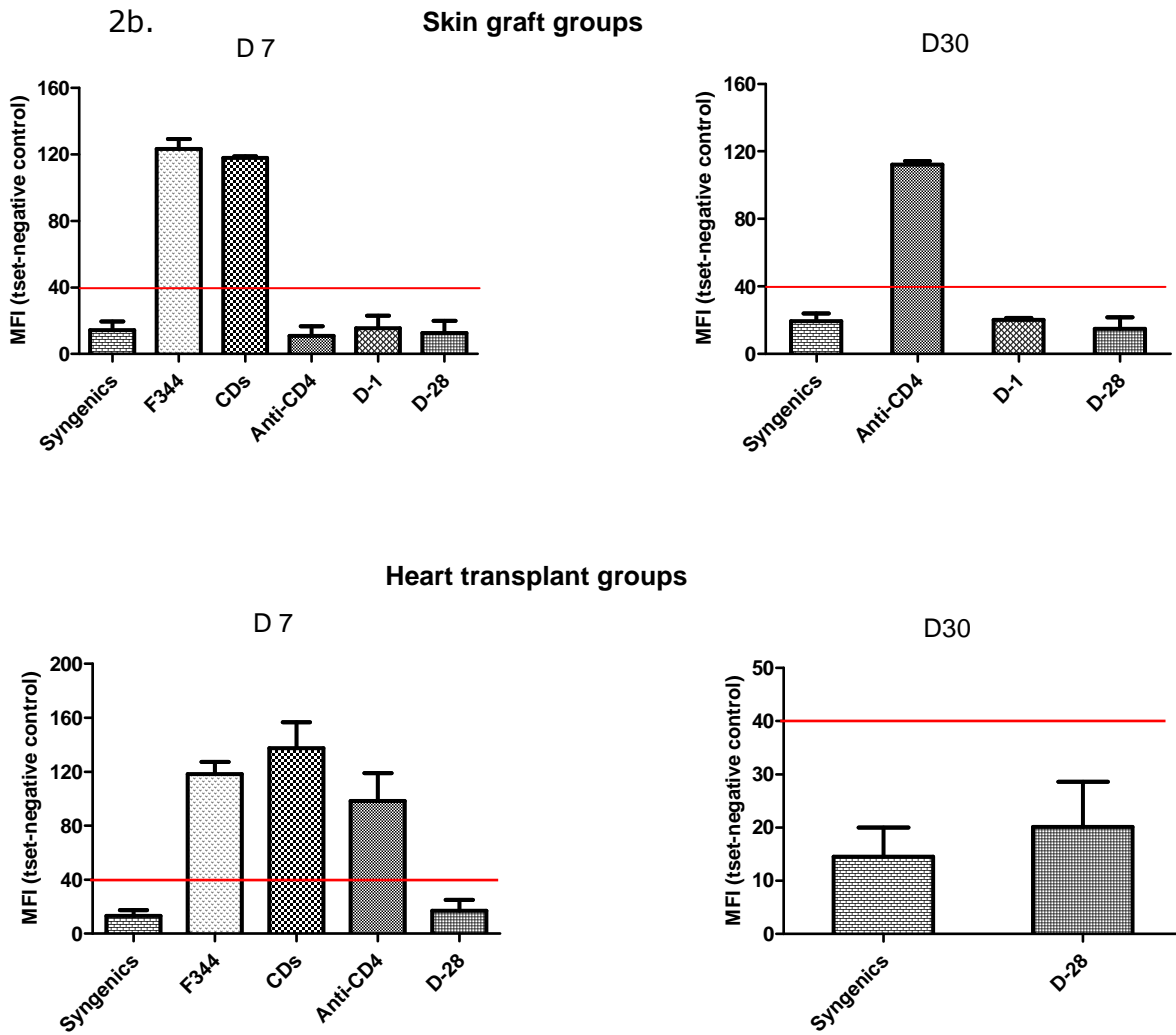


**Figure 1.** Results of mixed lymphocyte reaction using OX-62+ DCs from F344 rats as stimulators and splénocytes from Lewis rats as responders. In the presence of sensitized Treg, the proliferation of T cells is partially abrogated.

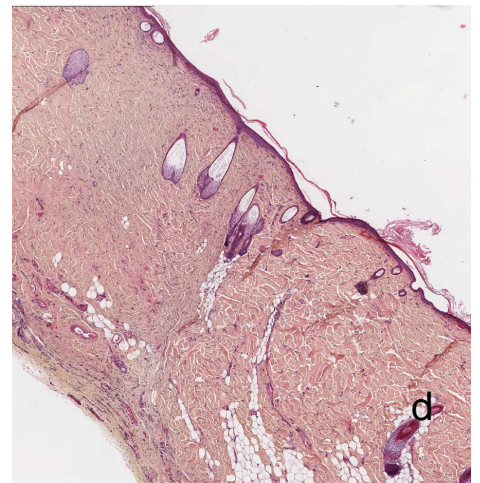
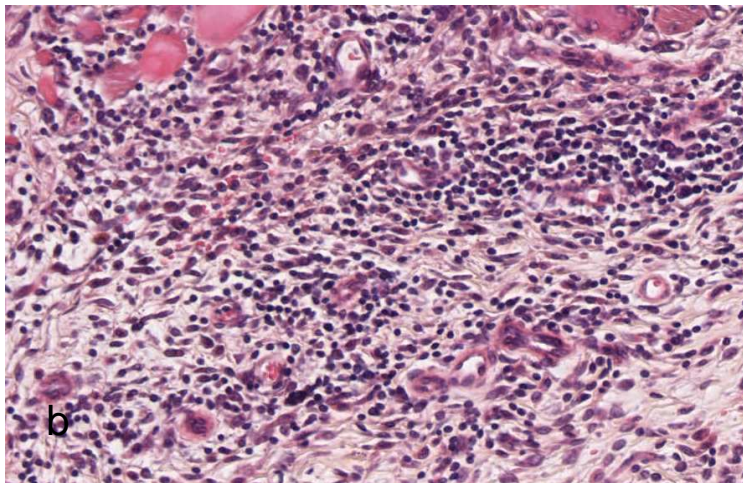
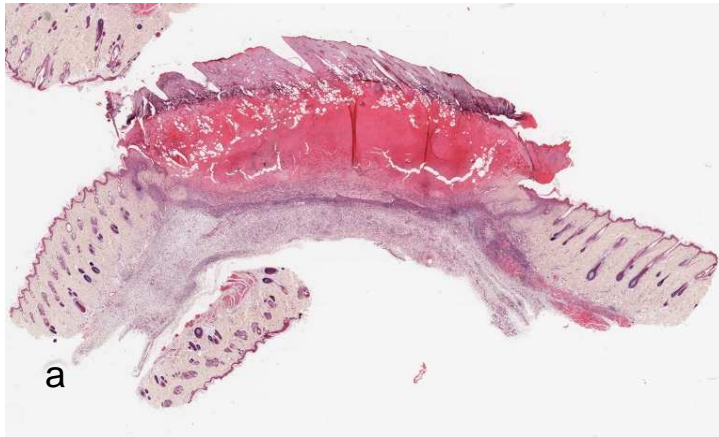
2a.



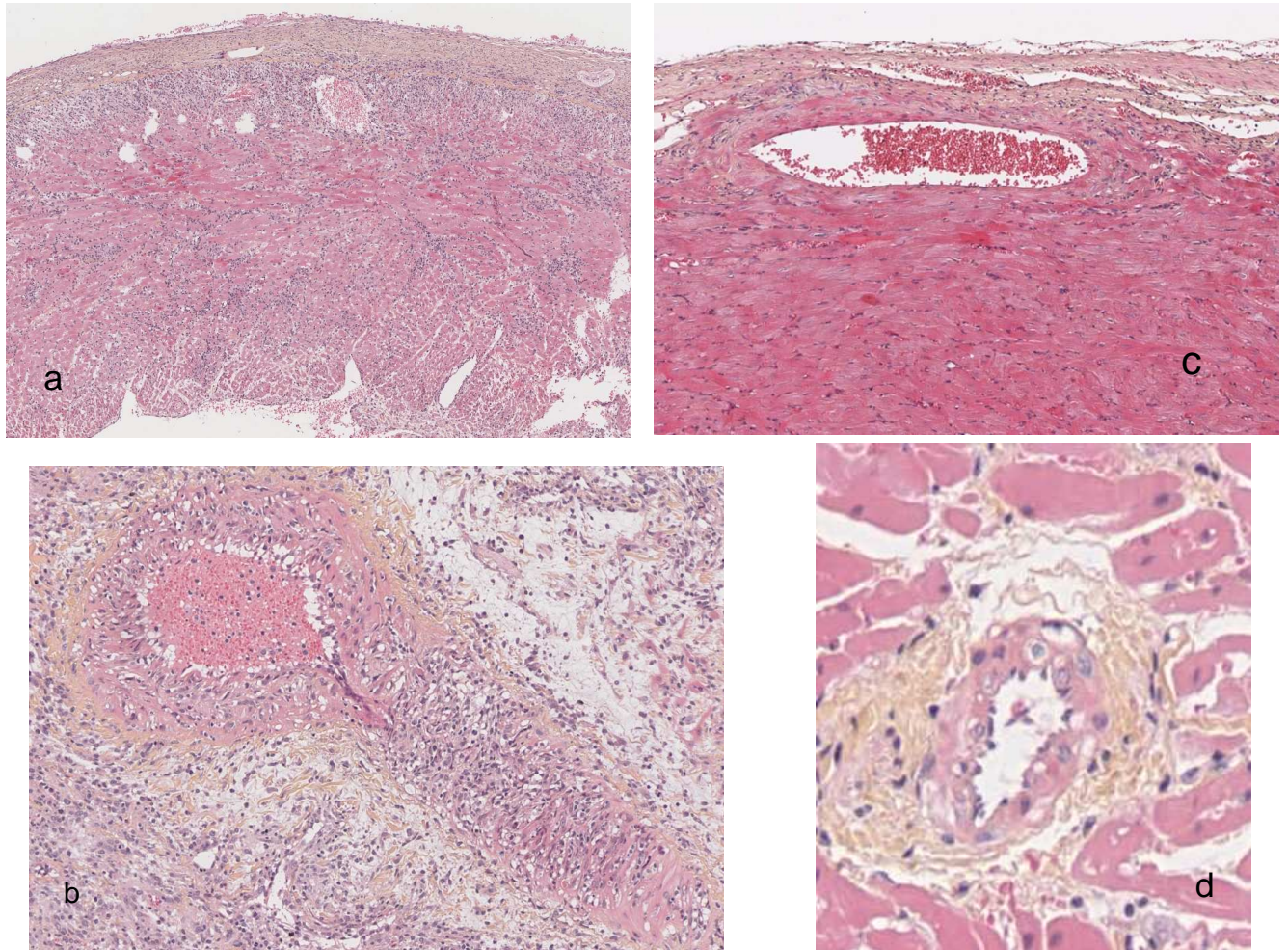
2b.



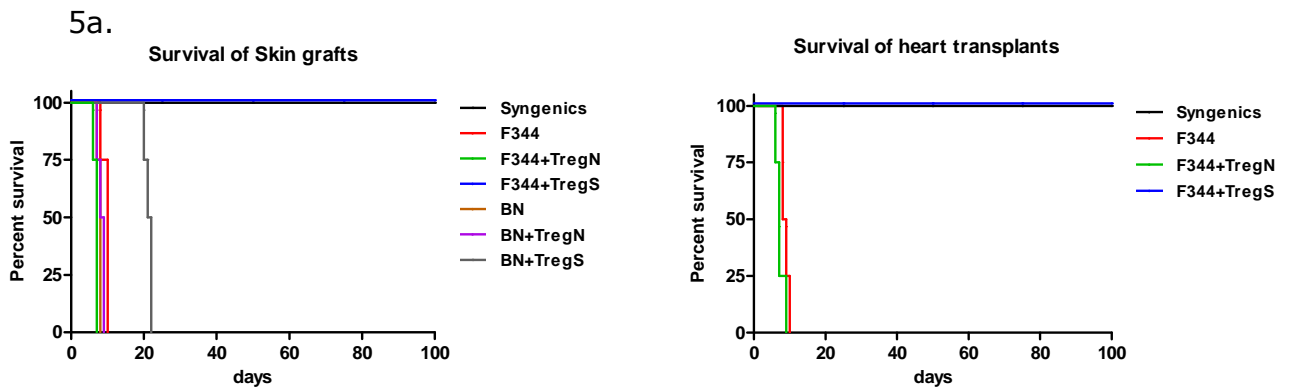
**Figure 2. a.** Recipients were conditioned before grafting with anti-CD4 mAbs with or without OX62<sup>+</sup>-allogenic DC at d-28 or d-1. Only recipients conditioned at d-28 accepted indefinitely primary allogenic skin grafts and primary allogenic heart transplants ( $p=0.01$ ). **b.** Flow cytometric cross matches were performed in each experimental group. DSA were detected in allogenic, CD and anti-CD4 groups whereas rats from d-1 and d-28 groups did not develop DSA.



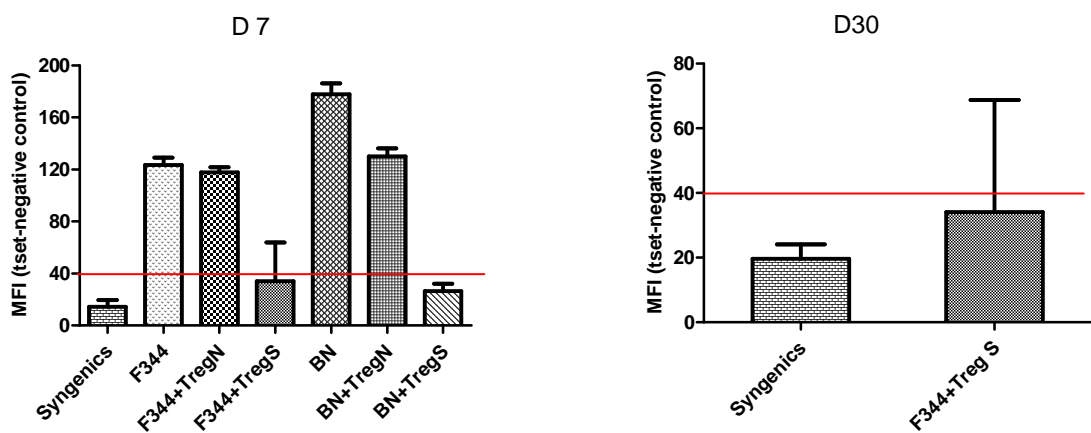
**Figure 3.** Primary skin grafts. **a and b.** Allogenic group (d7) : the graft is necrotic and ulcerated. At the interface with the tissues of the recipient, a dense and polymorphic infiltrate is seen. **c and d.** J-28 group (CD and anti-CD4 mAbs) : lack of inflammation and lesions of the epidermis and cutaneous appendages.



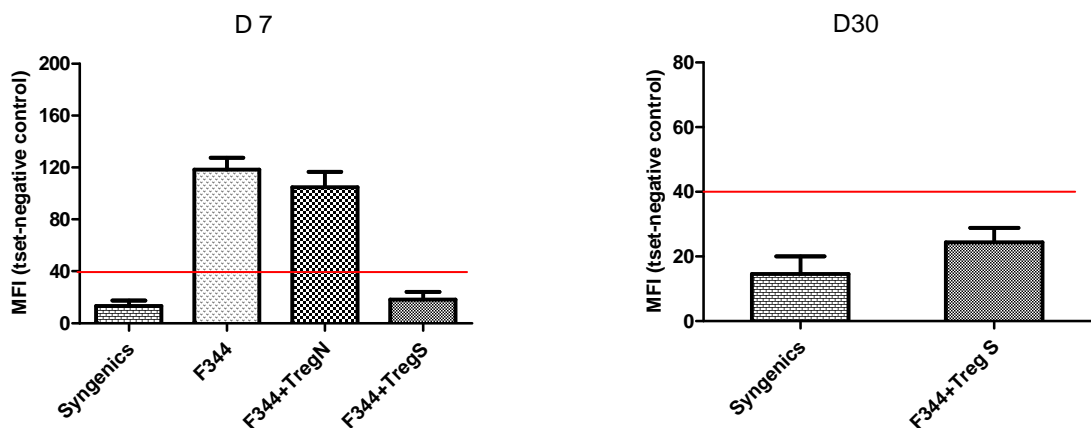
**Figure 4.** Primary cardiac transplants. **a and b.** Allogenic group (d7) : the myocardium is infiltrated by lymphocytes, neutrophils et histiocytes. Endarteritis in the wall of a large intra-cardiac artery. **C and d.** J-28 group (CD+anti-CD4 mAbs) : absence of inflammation of the myocardium and lesion of oblitérante arteriopathy.



5b. Skin graft groups



Heart transplant groups



**Figure 5. a.** Recipients received the day before grafting CD4+C25+Treg from naïve rats or conditioned animals. Only recipients receiving sensitized Treg accepted indefinitely allogenic skin grafts and allogenic heart transplants ( $p=0.009$ ). Sensitized Treg were not able to prolong the survival of skin graft from a third party donor. **b.** Flow cytometric cross matches were performed in each experimental group. DSA were detected in allogenic, groups whereas rats from d-1 and d-28 groups did not develop DSA.

## **DISCUSSION**



Ce travail a d'abord montré (Bocrie et al, 2006, annexe 1) qu'un chimérisme lymphoïde était obtenu après injection de CD<sup>s</sup> allogéniques. Le marquage *ex vivo* des CD<sup>s</sup> avec un traceur fluorescent (PKH26) a permis de les localiser chez le receveur, au niveau de la rate, du thymus et des ganglions lymphatiques mésentériques. En présence d'anticorps monoclonal anti-CD4, le nombre de cellules PKH26<sup>+</sup> est augmenté mais la différence n'est pas statistiquement significative. Les marquages effectués sur coupes montrent que les cellules PKH26<sup>+</sup> ne sont pas réactives avec l'anticorps anti-CD86. Nous n'avons cependant pas recherché d'autres antigènes exprimés habituellement par les CD<sup>s</sup> matures. Les cellules CD86<sup>+</sup> détectés sur les coupes tissulaires qui ne sont pas PKH26<sup>+</sup>, sont parfois situées au contact des cellules PKH26<sup>+</sup>. Elles peuvent correspondre à des CD<sup>s</sup> allogéniques qui ont perdu certains marqueurs de maturité. Selon l'environnement cytokinique, les CD<sup>s</sup> peuvent en effet acquérir des propriétés tolérogènes. Les CD<sup>s</sup> tolérogènes ne sécrètent pas de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  ou IL-12 (Morelli et al., 2001). Leur action se ferait par l'intermédiaire de cellules T régulatrices productrices d'IL-10 (Tr1). Il a été démontré *in vitro*, que la stimulation de CD<sup>s</sup> matures par le TNF- $\alpha$  et des prostaglandines E2 conduit à un état de tolérance en l'absence de lymphocytes CD4<sup>+</sup> (Albert et al., 2001). Le développement d'une réponse immunitaire dépend de signaux délivrés par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> aux CD<sup>s</sup> par l'intermédiaire des molécules CD40 exprimés à la surface des CD<sup>s</sup>. Dans le modèle que nous développons, le blocage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par l'anticorps monoclonal anti-CD4 W3/25 pourrait neutraliser ce signal et favoriser la tolérance aux alloantigènes. La localisation préférentielle des CD<sup>s</sup> du donneur au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires serait à même de permettre l'apparition de lymphocytes T régulateurs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> au niveau du thymus ou de favoriser l'expansion de cellules suppressives CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> spécifiques des alloantigènes (Yamazaki et al., 2007). Il est probable qu'une partie des cellules PKH26<sup>+</sup> CD86<sup>-</sup> correspondent à des CD<sup>s</sup> immature du receveur ou de phagocytes ayant ingérés des débris fluorescents provenant des CD<sup>s</sup> PKH26 initialement injectées.

Avant de réaliser des transplantations, nous avons vérifié si le protocole à évaluer était capable de modifier la réponse immunitaire induite par les CDs seules. L'injection de CDs allogéniques entraîne une réponse humorale mise en évidence par des tests de compatibilité croisée ou cross match. Dans 2 séries d'expérimentation indépendantes, nous avons vérifié que l'injection de CDs OX62+ allogéniques sous couvert d'anticorps monoclonal anti-CD4 abolissait la réponse humorale anti-donneur. Après transplantation, la recherche d'anticorps anti-donneur a donc être utilisée comme bio-marqueur de tolérance (absence) ou de rejet (présence).

Chez l'homme, le RC représente l'une des principales causes de perte tardive des transplants rénaux et cardiaques (*Nankivell et al., 2003*). Le RC se traduit habituellement par un dysfonctionnement chronique du transplant qui ne répond pas à l'intensification du traitement immunosuppresseur. Il aboutit à la perte du transplant. Les modèles de rejet chronique, développés chez la souris ou le rat, utilisent habituellement des mis-matches partiels entre les antigènes du CMH du donneur et du receveur ou des incompatibilités intéressant des antigènes mineurs d'histocompatibilité (*Russell et al, 1994 ; Yang et al, 2003*). L'utilisation de transplants vascularisés permet d'étudier l'infiltrat inflammatoire se développant au sein du transplant et de quantifier les lésions d'artériopathie oblitérante (AO) caractéristiques du RC (*Armstrong et al., 1997*). Ces lésions d'AO se traduisent par un épaissement fibro-intimal concentrique des vaisseaux intra-parenchymateux, associé des lésions d'endothélite et d'hypertrophie des cellules endothéliales. Cette hypertrophie est la traduction morphologique de l'activation des cellules endothéliales. Chez le rat, la combinaison Lewis/Fischer a été la plus utilisé pour l'étude du RC (*Russell et al, 1996*). Les investigations chez ce rongeur sont toutefois limitées par le panel restreint d'anticorps disponibles et/ou le faible nombre de rats transgéniques.

Les modèles murins, notamment ceux utilisés par le groupe de Kathryn Wood à Oxford, ont montré que la génération de lymphocytes T régulateurs CD25+CD4+, spécifiques des allo-antigènes est l'un des principaux modes de régulation se mettant en place après injection d'allo-antigènes (sang du donneur) sous couvert d'anticorps monoclonal anti-CD4 non dépletants (*Bushell et al, 2003 ; Wood et*

*al.*, 2010). L'utilisation comme receveurs d'animaux immunodéficients (souris RAG-/- ou souris « vides ») dont le système immunitaire est reconstitué la veille de la transplantation par l'injection de cellules effectrices (CD45RA ou CD4+CD25-), offre l'avantage de pouvoir préciser le ratio minimum T effecteurs/Treg permettant d'obtenir la tolérance de transplants allogéniques en l'absence de traitement immunosuppresseurs. Dans notre modèle (F334 à Lewis), nous utilisons des animaux immunocompétents. La détermination d'un tel ratio n'est donc pas possible. Nous avons montré que les rates de rats naïfs (n=4) renfermaient entre 1 et  $1,5 \cdot 10^6$  lymphocytes CD4+CD25+. Nous avons choisi arbitrairement d'injecter avant greffe,  $10^6$  lymphocytes CD4+CD25+ provenant d'animaux ayant reçu le protocole.

Dans notre modèle, le nombre de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+ circulants, mesuré par cytométrie en flux à J7, est de manière un peu surprenante diminué de près de moitié ( $p=0,015$ ) dans le groupe ayant reçu des lymphocytes CD4+CD25+ avant la greffe. Nous n'avons pas d'explication rationnelle à proposer pour expliquer cette différence. Cette diminution ne semble pas traduire un défaut de régulation puisque la survie des greffons de peau est prolongée dans ce groupe. On peut supposer que la distribution de ces cellules est différente. En l'absence d'accumulation de ces éléments au sein des greffons cutanés et des transplants cardiaques, il est probable qu'ils sont localisés dans les organes lymphoïdes loco-régionaux ou la rate. Comme nous n'avons effectué une analyse morphologique des greffons qu'à la fin du suivi, on ne peut pas exclure que les Treg aient été présents de façon transitoire dans les transplants. En l'absence de groupes intermédiaires sacrifiés par exemple 15 jours ou un mois après la greffe, cette hypothèse ne peut pas être vérifiée. Nous n'avons par ailleurs pas quantifié cette sous population dans la rate de receveurs tolérants. On peut évoquer aussi une diminution du nombre de cellules effectrices CD4+ activées. Ces 2 hypothèses n'étant bien sûr pas mutuellement exclusives.

Nous avons aussi évalué *in vivo* la cinétique d'apparition des mécanismes de régulation. L'injection combinée de CDs et d'AcMo anti-CD4 la veille de la greffe cutanée (J -1, n=4) ne permet qu'une prolongation de la survie des greffes ( $53.5 \pm 0.6$  jours) alors que leur injection à J-28 (n=4) entraîne une survie

probablement indéfinie (>100 jours,  $p=0,01$ ). Les données histopathologiques confirment les constatations macroscopiques. Les greffons rejetés sont totalement nécrosés alors que l'aspect des greffes syngéniques ( $n=4$ ) est proche de celui de la peau du receveur autour du transplant. Les résultats des cross match en cytométrie en flux indiquent que la production d'anticorps anti-donneur est en grande partie inhibée (J-28). Ces résultats montrent clairement que la mise en place des phénomènes de régulation avant la greffe est un processus actif.

Après l'injection de lymphocytes T CD4+CD25+ provenant de rats "sensibilisés", les receveurs Lewis acceptent indéfiniment (>100 jours), un greffon cutané ou un transplant cardiaque provenant de rats Fischer alors que les greffons provenant de rats Brown Norway (*third party*) sont rejetés ( $21,2\pm 0,9$  jours). Des anticorps anti-donneurs n'ont été détectés à J7, J15 et J30 que chez un seul receveur ayant reçu des lymphocytes Treg avant la greffe. Les lymphocytes T CD4+CD25+ générés par notre protocole semblent spécifiques des allo-antigènes du donneurs. Toutefois, la prolongation de la survie des greffons provenant d'une tierce partie indique qu'il existe aussi une régulation non spécifique. L'abrogation partielle (1 rat sur 4) d'Ac anti-donneur suggère en effet qu'il existe une interaction entre les Treg naïfs et les lymphocytes B avant leur différenciation en plasmocytes.

De manière intéressante, nous avons observé que l'inhibition de la réponse humorale dans les groupes d'animaux tolérants était partielle. Nous n'avons pas vérifié, chez ces animaux, l'éventuelle activation du système du complément, en recherchant par exemple des dépôts tissulaires de C4d au niveau de la micro-circulation. Chez l'homme, l'apparition de DSA est habituellement associée à une moins bonne survie du transplant, notamment rénal. Les DSA paraissent donc être un bio-marqueur intéressant mais leur détection est difficile dans le sang car il se fixe massivement sur le transplant (*Martin et al*, 2003). D'autre part, dans 25% des cas, les DSA ne sont pas associés à un dysfonctionnement ou à des lésions du transplant (*Haririan et al*, 2009). Selon leur concentration, leur affinité, leur isotype ou le degré de fucosylation, les DSA peuvent avoir un rôle protecteur ou délétère pour les cellules endothéliales (*Chang et Platt*, 2009 ; *Zhang et Reed*, 2009). L'atteinte endothéliale peut être liée à l'activation du système du complément ou à l'activation de signaux pro-inflammatoires ou favorisant la

prolifération de ces cellules (Wehner *et al*, 2007 ; Coupel *et al*, 2004). Le Texier *et al* ont montré que les DSA présents chez les animaux tolérants avaient un rôle protecteur : ils n'entraînent pas d'activation endothéliales mais augmentent l'expression de gènes protecteurs comme HO-1, NOTCH4 et CLEC-1 (Brouard *et al*, 2000 ; Quillard *et al*, 2008). Ces DSA qui n'active pas le complément et les cellules endothéliales sont associés à l'accumulation dans le sang et les transplants, de lymphocytes B qui montrent une faible expression des transcrits des chaînes lourdes  $\gamma$  (IgG) et de CD27, marqueur d'activation et de lymphocytes B mémoires et une forte expression des transcrits de BCMA (B cell maturation antigen) et des chaînes lourdes  $\mu$  (IgM). Ces lymphocytes B au profil inhibiteur pourraient correspondre à des lymphocytes B régulateurs (Breg) qui ont été décrits récemment chez l'homme et la souris (Redfield *et al*, 2010). Les Breg seraient issus d'une sous population dite transitionnelle de lymphocytes B (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup>) capable de produire de l'IL10 après stimulation impliquant notamment CD40 (Blair *et al*, 2010). L'effet tolérogène de ces cellules serait dû à leur faible capacité de présentation de l'antigène et de co-stimulation (Chung *et al*, 2003). Ces éléments ne seraient toutefois pas anergiques. Ils conservent la capacité de maturation *in vitro* après stimulation par les TLR (*Toll Like Receptor*) mais produiraient des DSA de faible affinité (Berek *et al*, 1991).

## **CONCLUSION/PERSPECTIVES**

Ce travail a montré que l'injection chez le receveur avant transplantation de cellules dendritiques spléniques ou OX62+ sous couvert d'anticorps monoclonal anti-CD4, permet d'induire la survie de greffons cutanés et de transplants cardiaques allogéniques en induisant une inhibition importante mais incomplète de la production de DSA. Cet effet est en partie lié à la génération et à l'expansion de Treg CD4+CD25+ spécifiques du donneur. Le transfert de ces cellules sensibilisées avant la transplantation induit également la tolérance de transplants allogéniques et inhibe partiellement la production de DSA. La persistance de DSA chez les animaux tolérants suggère qu'ils peuvent avoir un effet protecteur. Il est probable que les Treg puissent interagir avec les lymphocytes B naïfs et favoriser le développement de lymphocytes B régulateurs.

Dans la suite de ce travail, nous envisageons de vérifier si les lymphocytes B isolés de la rate d'animaux conditionnés par notre protocole ou tolérant un transplant allogénique sont capables d'induire seul ou en association avec des Treg la tolérance de transplant allogénique. Les effets de cette association sur la production de DSA seront aussi évalués.

## **BIBLIOGRAPHIE**



Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol.* 2004,5:678-84.

Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007, 8:639-46.

Adams D., Tilney N.L., Collins J.J., Karnovsky M.J. Experimental graft arteriosclerosis. I. The Lewis-to-F-344 allograft model. *Transplantation* 1992, 53: 1115-9

Aiello S, Cassis P, Cassis L, Tomasoni S, Benigni A, Pezzotta A, Cavinato R.A, Cugini D, Azzollini N, Mister M, Longaretti L, Thomson A.W, Remuzzi G, Noris M. DnIKK2-transfected dendritic cells induce a novel population of inducible nitric oxide synthase-expressing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> cells with tolerogenic properties. *Transplantation* 2007, 83:474-84

Albert ML, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2001, 2: 1010-7

Armstrong AT, Strauch AR, Starling RC, Sedmak DD, Orosz CG. Morphometric analysis of neo-intimal formation in murine cardiac grafts: III. Dissociation of interstitial fibrosis from neointimal formation. *Transplantation.* 1997, 64: 1198-202

Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A, Azzari C, Ziegler SF, Levings MK, and Roncarolo MG. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 2006, 116:1713-22.

Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392:245-52

Berke Z, Wen T, Jin S, Klein G, Dalianis T. Polyomavirus persists in CD4/8 double-knockout, but not in CD4 or CD8 single-knockout mice. *Virology.* 1995, 212:268-71.

Bilsborough, J., George T. C., Norment A., and Viney J. L. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 2003, 108:481-92.

Bishop G, Sun J, DeCruz DJ, Rokahr KL, Sedgwick JD, Sheil. AG, Gallagher ND, McCaughan GW. Tolerance to rat liver allografts III. Donor cell migration and tolerance associated cytokine production in peripheral lymphoid tissues. *J Immunol* 1996, 156:4925-31.

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

Bensinger SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 2001, 194:427-38.

Blair PA, Norena PY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Erhenstein MR, Mauri C. CD19<sup>+</sup>CD24<sup>hi</sup>CD38<sup>hi</sup> B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but re functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010, 32: 129-140

Bretscher PA, Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination: paralysis and induction involve the recognition of one and two determinants on an antigen, respectively. *Science* 1970, 169:1042-9

Brouha P, Ildstad S. Mixed allogeneic chimerism: Past, present and prospects for the future. *Transplantation* 2001, 72:S36-42.

Bocrie OJ, Abdelouhab K, Martin L, Mousson C, Rifle G. Study of microchimerism in the Lewis rat after injection of F-344 rat allogenic dendritic cells. *Transplant Proc* 2006, 38:2349-51.

Bocrie OJ, Identification et localisation des anticorps anti-CMH du donneur au cours du rejet chronique d'allogreffe rénale chez l'homme et après injection de cellules dendritiques du donneur chez le rat. *Thèse d'Université, Dijon* 2007.

Bushell A, Mazuz K, Kingsley C, Wood KJ. Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 2003, 76:449-55

Caballero A, Fernandez N, Lavado R., Bravo M.J, Miranda J.M, Alonso A. Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transpl Immunol* 2006, 17:3-6

Callaghan CJ, Rouhani FJ, Negus MC, Curry AJ, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ: Abrogation of antibody-mediated allograft rejection by regulatory CD4 T cells with indirect allospecificity. *J Immunol* 178:2221, 2007

Campbell K.S, Cella M, Carratero M, Lopez-Botet M, Colonna M. Signalling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex. *Eur J Immunol* 1998, 28:599-609

Carter J. D, Calabrese GM, Naganuma M, Lorenz U. Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005, 174:6627-38.

Charlton RK, Zmijewski CM. Soluble HL-A7 antigen: localization in the beta-lipoprotein fraction of human serum. *Science* 1970, 170:636-7

Chen X, Jensen PE. Cutting edge : primary B lymphocytes preferentially expand allogeneic Foxp3+CD4+ T cells. *J Immunol* 2007, 179: 2046-2050

Coates PT, Colvin BL, Hackstein H, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells as an approach to improved outcomes in transplantation. *Expert Rev Mol Med.* 2002, 4:1-21.

Coates PTH, Colvin BL, Kaneko K, Taner T, Thomson AW. Pharmacologic, biologic, and genetic engineering approaches to potentiation of donor-derived dendritic cell tolerogenicity. *Transplantation* 2003, 75:32-6S.

Cosmi L, De Palma R, Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Rodolico G, Querci V, Abbate G, Angeli R, Berrino L, Fambrini M, Caproni M, Tonelli F, Lazzeri E, Parronchi P, Liotta F, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human

interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med.* 2008, 205:1903-16.

Cramer DV, Shirwan H. The importance of humoral immune responses in chronic rejection. *Transplantation Rev* 1998, 12:166-76

Crudele V, Picascia A, Infante T, Grimaldi V, Maiello C, Napoli C. Repeated immune and non immune insults to the graft after heart transplantation. *Immunol Lett.* 2011, 141:18-27.

Daniel C, Horvath S, and Allen PM. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 1998, 8:543-52.

De Pauw L, Toungouz M, Goldman M. Infusion of donor-derived hematopoietic stem cells in organ transplantation: clinical data. *Transplantation.* 2003, 75:46-9.

Demetris A, Adams D, Bellamy C, Blakolmer K, Clouston A, Dhillon AP, Fung J, Gouw A, Gustafsson B, Haga H, Harrison D, Hart J, Hubscher S, Jaffe R, Khettry U, Lassman C, Lewin K, Martinez O, Nakazawa Y, Neil D, Pappo O, Parizhskaya M, Randhawa P, Rasoul-Rockenschaub S, Reinholt F, Reynes M, Robert M, Tsamandas A, Wanless I, Wiesner R, Wernerson A, Wrba F, Wyatt J, Yamabe H. Update of the International Banff Schema for Liver Allograft Rejection: working recommendations for the histopathologic staging and reporting of chronic rejection. *An International Panel. Hepatology* 2000, 31:792-9

Deteix C, Attuil-Audenis V, Duthey A, Patey N, McGregor B, Dubois V, Caligiuri G, Graff-Dubois S, Morelon E, Thaunat O. Intragraft Th17 infiltrate promotes lymphoid neogenesis and hastens clinical chronic rejection. *J Immunol.* 2010, 184:5344-51.

Dressel R, Walter L, Günther E. Genomic and functional aspects of the rat MHC, the RT1 complex. *Immunol Rev.* 2001, 184: 82-95.

Eberhard G, Lutz W. The major histocompatibility complex of the rat (*Rattus norvegicus*). *Immunogenetics* 2001, 53:520-42

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunol* 2003, 4:1206-12.

Falcone M, Bloom BR. A T helper cell 2 (Th2) immune response against non-self antigens modifies the cytokine profile of autoimmune T cells and protects against experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997, 185: 901-7.

Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, Walters JJ, Gross MJ, Suri A, Allen PM. Alloreactive T cell respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. *Nature Immunol* 2007, 8:388-97

Feucht HE, Felbert E, Gokel MJ Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, Held E, Riethmüller G, Land W, Albert E.. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991, 86:464-70

Feucht HE, Mihatsch MJ. Diagnostic value of C4d in renal biopsies. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005, 14:592-8

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, 4:330-6.

Forlow SB, Schurr JR, Kolls JK, Bagby GJ, Schwarzenberger PO, Ley K. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood* 2001, 98: 3309-14.

Gilot BJ, Hara M, Jones ND, Van Maurik A, Niimi M, Hadjianastassiou V, Morris PJ, Wood KJ. Visualization of the in-vivo generation of donor antigen-specific effector CD8+ T cells during mouse cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000, 69:639-48.

Gordon D.W., Jin Y.S., Salazar R., Dai W.D., Barteneva N., Barr M.L., Barsky L.W., Starnes V.A., Cramer D.V. Vascular Endothelial Cell Apoptosis Induced by Anti-donor non-MHC Antibodies: A Possible Injury Pathway Contributing to Chronic Allograft Rejection. *Transplant Immunol* 2002, 21: 1174-87

Graubert TA, Ley TJ. How do lymphocytes kill tumor cells? *Clin Cancer Res* 1996, 2:785-9

Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGF-beta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 2000, 12:171-81

Gould DS, Auchincloss H Jr. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 1999, 17:77-82

Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol.* 2009, 9:353-63.

Hackstein H, Taner T, Logar AJ, Thomson AW. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells. *Blood* 2002, 100:1084-7.

Haririan A, Kiangkitiwan B, Kuruga D Cooper M, Hurley H, Drachenberg C, Klassen D. The impact of C4d pattern and donor-specific antibody on graft survival in recipients requiring indication of renal biopsy. *Am J Transplant* 2009, 9: 27-58

Hasegawa T, Visovatti SH, Hyman MC, Hayasaki T, Pinsky DJ. Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy. *Nat Proc* 2007, 2: 471-480

Haskova Z, Usiu N, Pepose JS, Ferguson TA, Stuart PM. CD4+ T cells are critical for corneal, but not skin, allograft rejection. *Transplantation.* 2000, 69:483-7.

Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 2004, 173: 4828-4837

Hidalgo LG, Sis B, Sellares J, Campbell PM, Mengel M, Einecke G, Chang J, Halloran PF. NK cell transcripts and NK cells in kidney biopsies from patients with donor-specific antibodies: evidence for NK cell involvement in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant* 2010, 10:1812-22.

Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004, 5:532-8

Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> OX62<sup>-</sup> and Type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 2004, 172:7485-98.

Ichim TE, Zhong R, Min WP. Prevention of allograft rejection by in vitro generated tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003, 11:295-306

Issa F, Wood KJ. CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010, 15: 757-764

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999, 162:5317-26.

Jerne NK. The somatic generation of immune recognition. *Eur J Immunol.* 2004, 34:1234-42.

Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol* 2004, 16:550-7

Jones N, Van Maurik A, Hara M, Gilot B.J, Morris PJ, Wood KJ. T cell activation, proliferation and memory after cardiac transplantation in-vivo. *Ann Surg* 1999, 229:570-8.

Joosten SA, van Kooten C, Paul LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transplant Int* 2003, 16: 137-145

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature Immunol* 2001, 2:301-6.

Kagi D, Ledermann B, Burki K, Zinkernagel RM, Hengartner HM. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:207-32

Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986, 163:1037-50.

Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunol* 2003, 4:337-42.

King C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. *Nat. Immunol.* 2009, 9:757-66

Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and IL-10 dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002, 168:1080-6

Klein J, Sato A. The HLA system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000, 343:782-6

Krieger NR, Yin DP, Fathman CG. CD4+ but not CD8+ cells are essential for allograft rejection. *J Exp Med* 1996, 196: 2013-8

Kryczek I, Wei S, Zou L, Zhu G, Mottram P, Xu H, Chen L, Zou W. Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* 2006, 177:40-4.

Kullberg, MC, Pearce EJ, Hieny SE, Sher A, Berzofsky J. A. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J Immunol* 1992, 148:3264-70.

Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 1998, 188:409-14.



Laan M, Cui ZH, Hoshino H, Lötval J, Sjöstrand M, Gruenert DC, Skoogh BE, Lindén A. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol*. 1999, 162:2347-52.

Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation*. 2003, 75:37S-42S.

Laufer TM. Tolerance to self: which cells kill? *PLoS Biol*. 2008, 6:e241.

Le Bras S, Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006, 116:1473-1475.

Lechler RI, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982, 156:1835-41

Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant*. 2001;1: 97-102

Le Texier L., Thebault P., Lavault A., Usal C., Merieau E., Quillard T., Charreau B., Souillou JP., Cuturi MC., Brouard S., Chiffolleau E. Long-Term Allograft Tolerance Is Characterized by the Accumulation of B Cells Exhibiting an Inhibited Profile. *Am J Transplant* 2011, 11: 429–438

Li XC, Zheng XX, Storm TB. T-cell growth factors in allograft rejection and tolerance. *Transplant Proc* 1999, 31:342-3

Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams C B, Wang J, Martin MG, and Chatila TA. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allerg Clin Immunol* 2005, 116:1106-15.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA, CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006, 203:1701-11.

Lombardi G, Sidhu S, Daly M, Batchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol* 1990, 2:9-13.

Loong CC, Hsieh HG, Lui WY, Chen A, Lin CY. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *J Pathol* 2002, 197:322-32.

Lu L, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 2002, 73:S19-S22.

Lutz M, Schuler G. Immature, semi-immature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunol* 2002, 23:445-9.

Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifle G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2003, 76: 395-400

Matzinger P. Graft tolerance: a dual of two signals. *Nat Med* 1999, 5: 616-7.

Matzinger P, Kamala T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat Rev Immunol* 2011, 11:221-30.

McHugh R, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002, 16:311-23.

Millan MT, Shizuru JA, Hoffmann P, Dejbakhsh-Jones S, Scandling JD, Grumet FC, Tan JC, Salvatierra O, Hoppe RT, Strober S. Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation. *Transplantation*. 2002, 73:1386-91.

Monaco AP, Medawar P. Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation* 2003, 75:13-6.

Monroe JG. B-cell antigen receptor signaling in immature-stage B cells: integrating intrinsic and extrinsic signals. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000, 245:1-29

Morelli AE, Hackstein H, Thomson AW. Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation. *Semin Immunol.* 2001, 13:323-35.

Morgan BP, Marchbank KJ, Longhi MP, Harris C.L, Gallimore A.M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptative responses. *Immunol Letters* 2005, 97:171-9

Moser JM, Sassano ER, Leistriz del C, Eatrises JM, Phogat S, Koff W, Drake DR 3rd. Optimization of a dendritic cell-based assay for the in vitro priming of naïve human CD4+ T cells. *J Immunol Methods.* 2010, 353:8-19.

Nagato T, Kobayashi H, Yanai M, Sato K, Aoki N, Oikawa K, Kimura S, Abe Y, Celis E, Harabuchi Y, Tateno M. Functional analysis of birch pollen allergen Bet v 1-specific regulatory T cells. *J Immunol* 2007 178:1189-98.

Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003, 349: 2326–2333

Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, Burlingham WJ, Marks WH, Sanz I, Lechler RI, Hernandez-Fuentes MP, Turka LA, Seyfert-Margolis VL. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest* 2010 120: 1836-47

Niimi M, Shirasugi N, Ikeda Y, Kan S, Takami H, Hamano K. Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation.* 2001, 72:1556-62.

Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001, 281:F948-57

O'Connell PJ, Li W, Wang Z, Specht SM, Logar AJ, Thomson AW. Immature and mature CD8alpha+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 2002, 168:143-54.

Peter M.E, Krammer PH. Mechanisms of CD98 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1998 10:545-51

Pettigrew GJ, Lovegrove E, Bradley JA, Maclean J, Bolton EM. Indirect T cell allorecognition and alloantibody-mediated rejection of MHC class I-disparate heart grafts. *J Immunol* 1998, 161:1292-8

Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004, 36:1814-27.

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002, 196:237-46.

Pirenne J, Kitade H, Kawai M, Koshiba T, Van Damme B, Mathieu C, Waer M. Regulatory cells, TH1/TH2 unbalance, and antibody-induced chronic rejection in operational tolerance induced by donor-specific blood transfusion. *Transplantation* 2005, 79:S25-7.

Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediat* 1982, 100:731-7.

Powrie F, Mason D. OX-22<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22<sup>low</sup> subset. *J Exp Med* 1990, 172:1701-1708.

Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsicker L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K.. Antibody-mediated rejection criteria- an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003, 3:708-714.

Racusen LC, Regele H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int.* 2010, 119:S27-32.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000, 192:295-302.

Regele H, Böhmig GA, Habicht A. Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in glomerular and peritubular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002, 13:2371-2380

Reichardt P, Dornbach D, Rong S, Beissert S, Gueler F, Loser K, Gunzer M. Naïve B cells generate regulatory T cells in the presence of mature immunological synapse. *Blood* 2007, 110: 1519-1529

Rifle G, Mousson C. Donor-derived hematopoietic cells in organ transplantation: a major step toward allograft tolerance? *Transplantation* 2003, 7:3-7

Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martínez-Torrecuadrada JL, Ling KL, Pratap S, Toms C, Fox BC, Cerundolo V, Powrie F, Banham AH. Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol*. 2005;35:1681-1691

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006, 212:28-50.

Rothstein DM., Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Immunol Rev* 2003, 196:85-108

Rötzschke O, Falk K. Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway. *Immunol Today*. 1991,12:447-55.

Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. I. Time course and immunogenetic and immunopathological considerations. *Am J Pathol*. 1994, 144: 260-74

Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol*. 1994, 152: 5135-41

Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol* 1994, 153:3514-22.

Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural selftolerance, deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 1985, 161:72-87.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995, 155:1151-64.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T Foxp3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006, 212:8-27

Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004, 22:531-62.

Sawitzki B, Kingsley CI, Oliveira V, Karim M, Herber M, Wood KJ. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J Exp Med* 2005, 201:1925-35.

Sayegh MH, Fine NA, Smith JL, Rennke HG, Milford EL, Tilney NL. Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplantation from the same donor. *Ann Intern Med* 1991, 114:954-5.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL- 7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006, 203:1693-1700.

Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006, 25: 195-201

Sherman LA, Chottopadhyay S. Molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993, 11:385-402

Shortman K, Heath WR. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2001, 2:988-9

Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet* 1992, 339:1579-82.

Simoneau-Robin I, Mousson C, Wijdenes J, Rifle G. Diminution of the in vitro and in vivo alloreactive response by association of mature dendritic cells and anti-CD4 monoclonal antibodies in the rat. *J Soc Biol* 2001, 195:431-5.

Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. Banff '05 Meeting Report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007, 7:518-26

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 2002, 99:351-8

Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol*. 2001, 166:973-81.

Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998, 10:1969-80.

Tilney NL, Strom TB, Kupiec-Weglinski JW. Humoral and cellular mechanisms in acute allograft injury. *J Pediatr.* 1987,111:1000-3

Thaunat O, Graff-Dubois S, Brouard S, Gautreau C, Varthaman A, Fabien N, Field AC, Louedec L, Dai J, Joly E, Morelon E, Souillou JP, Michel JB, Nicoletti A. Immune responses elicited in tertiary lymphoid tissues display distinctive features. *PLoS One.* 2010a, 5:11398.

Thaunat O, Patey N, Caligiuri G, Gautreau C, Mamani-Matsuda M, Mekki Y, Dieu-Nosjean MC, Eberl G, Ecochard R, Michel JB, Graff-Dubois S, Nicoletti A. Chronic rejection triggers the development of an aggressive intra-graft immune response through recapitulation of lymphoid organogenesis. *J Immunol.* 2010b, 185:717-28.

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

Trinite B, Voisine C, Yagita H, Josien R. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* 2000, 165: 4202-8

Tullius SG, Tillney NL. Both alloantigen-dependant and independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995, 59: 313-318

Turnbull E, MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev* 2001, 184:58-68

Uehara S, Chase CM, Kitchen WXH. NK cells can trigger allograft vasculopathy: the role of hybrid resistance in solid organ allografts. *J Immunol* 2005, 175:3424-30

Van Santen HM, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 2004, 200:1221-30.



Voisine C, Hubert FX, Trinité B, Heslan M, Josien R. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 2002, 169:2284-91

von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:867-78

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunol* 2005, 6:338-44

von Boehmer H. Central tolerance: essential for preventing autoimmune disease? *Eur J Immunol*. 2009, 39:2313-6.

Wallny HJ. and Rammensee HG. Identification of classical minor histocompatibility antigen as cell derived peptide. *Nature* 1990, 343:275-78.

Walzer T, Dalod M, Robbins SH. Natural killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005, 106:2252-8

Wekerle T, Sykes M. Induction of tolerance. *Surgery* 2004, 135:359-64.

Wilding RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Gen* 2001, 27:18-20.

Wong WK, Robertson H, Carroll HP, Ali S, Kirby JA. Tubulitis in renal allograft rejection: role of transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-15 in development and maintenance of CD103+ intraepithelial T cells. *Transplantation* 2003, 75:505-14

Wood KJ. Passenger leucocytes and microchimerism: what role in tolerance induction. *Transplantation* 2003, 79:17-20.

Wood KJ, and Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 2006, 27:183-7.

Wood KJ, Feng G, Wei B, Sawitzki B, Bushell AR. Interferon gamma: friend or foe? *Transplantation* 2007, 84:S4-5.

Wood KJ, Bushell A, Jones ND. The discovery of immunological tolerance: now more than just a laboratory solution. *J Immunol* 2010 184: 3-4

Yamaguchi Y, Tsumura H, Miwa M, Inaba K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 1997, 15:144-153.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 2007, 27:145-59.

Yates PJ, Nicholson ML. The aetiology and pathogenesis of chronic allograftnephropathy. *Transplant Immunol* 2006, 16: 148-157

Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, Habicht A, Clarkson MR, Iacomini J, Glimcher LH, Sayegh MH, Ansari MJ. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *J Exp Med.* 2008, 205:3133-44.

Zerrahn J, Held W, Raulet DH. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* 1997, 88:627-36.

Zitvogel, L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Rev* 2006, 6:715-27.

# ANNEXES

# ANNEXE 1



## Chimerism in Lymphoid Tissues and Donor-Specific Antibody Response After Injection of Allogenic Splenic Dendritic Cells From Fischer Rats to Lewis Recipients

O. Bocrie, K. Abdelouhab, L. Martin, F. Guignier, C. Mousson, and G. Riffle

### ABSTRACT

The aim of this work was to study cellular chimerism achieved in lymphoid tissues and production of antidonor lymphocyte antibodies after injection of splenic dendritic cells (DCs) from Fischer F344 rats to Lewis recipients, a model of chronic rejection. DCs isolated from the spleen expressed OX62 (95%), CD80 (70%), and CD86 (80%). Two doses of these nonplasmacytoid splenic DCs from Fischer rats ( $2 \times 10^6$  and  $5 \times 10^6$ ), which had been labeled *ex vivo* with a TRITC fluorochrome (PKH26), were injected to Lewis recipients. Using fluorescence microscopy TRITC positive cells were localized at day 15 and day 45 in frozen sections from spleen, thymus, mesenteric lymph nodes, heart, liver, kidney, and skin ( $n = 5$  per group). Donor-specific antibodies were sought with flow cytometric crossmatches in serum samples taken at 7, 15, 30, and 45 days. TRITC-positive DCs were essentially localized in the spleen, the thymus, and lymph nodes of Lewis recipients. The majority of DCs were detected in the spleen ( $14.9 \pm 3.3$  and  $14.3 \pm 0.9$  DCs per high power field respectively at day 45). A significant number of DCs was also detected in the thymus and mesenteric lymph nodes at both times. Only some scattered TRITC-positive cells were observed in other organs. The number of DCs was stable over time and did not depend on the injected dose. A positive flow cytometric cross-match was observed at day 30 in all recipients independent of the injected dose. These data showed that  $2 \times 10^6$  mature, nonplasmacytoid DCs from F344 rats injected to Lewis recipients induced stable chimerism in primary and secondary lymphoid organs and a humoral response to donor antigens.

**TOLERANCE INDUCTION** is a major topic of research in organ transplantation. Among the many pathways to achieve this ultimate goal, one uses donor-derived cells, including donor dendritic cells (DCs).<sup>1,2</sup> In a previous report, we have used a fully allogenic model (Wistar Furth to Lewis recipient) to show that injection of donor-derived mature DCs, together with a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody, specifically decreased alloreactivity as assessed by unidirectional mixed splenocyte cultures.<sup>3</sup> Before testing such a procedure in a well-known model of chronic heart rejection (Fischer to Lewis recipient), we studied cellular chimerism achieved *in vivo* in lymphoid tissues after injection of donor splenic DCs into the recipient and production of antidonor antibodies induced by infusion of DCs.

### MATERIALS AND METHODS

Lewis rats were used as recipients and Fischer (F-344) rats as donors (Charles Rivers Laboratory, L'Arbreles, France). Splenic

DCs were isolated with an enzymatic method according to a previously described protocol.<sup>4</sup> Flow cytometric analysis showed that DCs isolated from the spleen expressed OX62 (95%), CD80 (70%), and CD86 (80%). Before injection, Fischer's DCs were stained *ex vivo* with PKH26, a noncytotoxic TRITC fluorochrome (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Recipients were treated by the intravenous route with either  $5 \times 10^6$  (group 1,  $n = 5$ ) or  $2 \times 10^6$  (group 2,  $n = 5$ ) DCs. Animals that received vehicle only (RPMI) were used as controls (group 3,  $n = 5$ ). Finally, recipients were killed at day 15 or at day 45 to locate TRITC+ cells in lymphoid (mesenteric lymph nodes, thymus, and spleen) and nonlymphoid organs (liver, heart, kidney, and skin). Additionally, staining with anti-CD86-TRITC antibody was performed on frozen sections to examine the expression of this molecule by TRITC-positive cells.

From UPRES EA 263, Faculty of Medicine, Dijon, France. Address reprint requests to Laurent Martin, MD, PhD, Service d'Anatomie Pathologique, Faculté de Médecine, 7, boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon Cedex, France. E-mail: gla.riffle@wanadoo.fr

0041-1345/06/\$-see front matter  
doi:10.1016/j.transproceed.2006.06.128

© 2006 by Elsevier Inc. All rights reserved.  
300 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Transplantation Proceedings, 38, 2349-2351 (2006)

2349

2350

TRITC+ DCs were detected with fluorescence microscopy and counted on at least five high power fields ( $\times 400$ ). Serum samples taken at 7, 15, 30, and 45 days were used to detect antibodies to donor antigens using flow cytometric crossmatches with frozen donor lymphocytes isolated from mesenteric lymph nodes from the animals used for DC isolation. The crossmatch was considered positive when a deviation of 40 channels was detected by comparison with a negative control.

### RESULTS

TRITC-positive DCs were detected in the thymus, the spleen, and mesenteric lymph nodes of Lewis recipients at 15 and 45 days. The average number of DCs per section ( $\times 400$ ) did not depend on the dose. They were not significantly different at 15 and 45 days (Fig 1). Most TRITC-positive DCs were stained with anti-CD86 antibody. Only some scattered TRITC-positive cells were observed in sections from the liver, heart, kidney, and skin. Circulating DSA, which appeared between D7 and D15, were finally identified in all recipients at day 30 among rats receiving either  $5 \times 10^6$  or  $2 \times 10^6$  DCs.

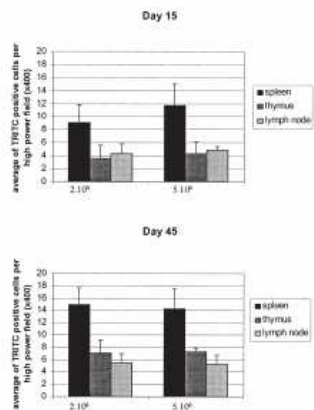


Fig 1. Average number of TRITC-positive DCs (PKH-26) per high power field ( $\times 400$ ) at days 15 and 45 in the spleen, the thymus, and mesenteric lymph nodes of recipients (Lewis) that received either  $2.10^6$  or  $5.10^6$  DC ( $n = 5$  per group). No TRITC-positive cell was detected in the control group ( $n = 5$ ) that received vehicle only (RPMI).

BOCRIE, ABDELOUHAB, MARTIN ET AL

### DISCUSSION

In rats, splenic DCs include several subsets (CD4+CD11b+, CD4-CD11b- plasmacytoid DCs) exhibiting different immunologic properties.<sup>5,6</sup> Plasmacytoid DCs do not express the rat-DC specific integrin  $\alpha E\beta 7$  (CD103) recognized by the OX62 monoclonal antibody.<sup>5</sup> We infused essentially OX62+ DCs; consequently, this model did not include, or only had a small amount, of plasmacytoid DCs. Furthermore, the DC functions also depended on their maturation state: mature DCs induce immune responses, whereas immature DCs induce T-cell tolerance and prolong allograft survival due to T-cell anergy, immune deviation from Th1 to Th2 response, or generation of regulatory T cells specific to donor antigens.<sup>7,8</sup> Hence, targeting DC maturation by pharmacologic, biologic, or genetic manipulations has been shown to promote transplant tolerance in experimental models.<sup>9</sup> However, it has also been suggested that certain subsets of mature DCs in mice including CD8 $\alpha$ + or splenic DCs, together with costimulation blockade, may induce indefinite heart graft survival.<sup>10,11</sup> In our model, costimulation molecules CD80 and CD86 were expressed strongly on the DCs (70% and 80%, respectively), suggesting that a majority of these cells are mature DCs.

A single intravenous injection of splenic allogenic DCs engendered a persistent lymphoid chimerism in the recipient without any immunosuppression. These results agree with our previous data in a Lewis/Wistar Furth combination.<sup>3</sup> Interestingly, DCs were located in primary (thymus) and secondary (spleen and mesenteric nodes) lymphoid organs. The largest group of DCs was detected in the spleen. Counting of labeled cells indicated that the average number of DCs did not depend on the dose of infused DCs, and remained stable to 45 days. Thus, a dose of  $2 \times 10^6$  allogenic DCs prior to transplantation seemed to be a relevant protocol for tolerance induction in this model. The humoral immune response specific to donor antigens detected in this combination was of particular interest. Indeed, DSA may serve as a means to evaluate the efficiency of a protocol of tolerance induction using DCs of donor origin together with a nondepleting anti-CD4 antibody or costimulation blockade before transplantation.

In conclusion, intravenous injection of donor-derived mature nonplasmacytoid splenic DCs from Fischer to Lewis rats without immunosuppression induced long-lasting chimerism in primary and secondary lymphoid organs. This model may be used to study the effects on allograft survival and chronic rejection of lymphoid-induced chimerism of mature donor-derived DCs and their immunomanipulation.

### REFERENCES

1. Billé G, Mousson C: Donor-derived hematopoietic cells in organ transplantation: A major step toward allograft tolerance? *Transplantation* 75:33, 2003
2. Haimoudi G, Thomson AW: Dendritic cells, tolerance and therapy of organ allograft rejection. *Comb Nephrol* 14:115, 2005
3. Simonneau-Robin L, Mousson C, Zanetti G, et al: *In vitro* study of alloreactivity and microchimerism after injection of

CHIMERISM IN LYMPHOID TISSUES AND DONOR RESPONSE

2351

dendritic cells and anti-CD4 monoclonal antibody in a combination of Lewis-Wistar Furth rats. *Transplant Proc* 30:2857, 1998

4. Chaux P, Hammann A, Martin F, et al: Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells/CD8 expression by a cell subpopulation. *Eur J Immunol* 23:2517, 1993
5. Voisine C, Hubert FX, Trinié JL, et al: Two phenotypically distinct subsets of splenic dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284, 2002
6. Hubert FX, Voisine C, Louvet C, et al: Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+ CD11b- OX62- and Type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172:7485, 2004

7. Lutz MB, Schuler G: Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23:445, 2002
8. Scitman R, Hawiger D, Nussenzweig MC: Tolerogenic dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 21:685, 2003
9. Czaus PTH, Colvin RL, Kankko K, et al: Pharmacologic, biologic, and genetic engineering approaches to potentiation of donor-derived dendritic cell tolerogenicity. *Transplantation* 75:325, 2003
10. Nimi M, Shiranagi N, Ikeda Y, et al: Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation* 72:1556, 2001
11. O'Connell PJ, Li W, Wang Z, et al: Immature and mature CD8 $\alpha$ + dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 168:143, 2002

# ANNEXE 2



## Injection of Donor-Derived OX62+ Splenic Dendritic Cells With Anti-CD4 Monoclonal Antibody Generates CD4+CD25+ FOXP3+ Regulatory T Cells That Prolong Allograft Skin Survival Indefinitely and Abrogate Production of Donor-Specific Antibodies in a Rat Model

M. Alawieh, G. Riffe, O. Bouchot, G. Malapert, C. Mousson, and L. Martin

### ABSTRACT

**Objective.** To examine in a rat model the ability of donor dendritic cells and anti-CD4 monoclonal antibody (mAb) to generate donor-specific CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) and to evaluate the capacity of these Tregs to prolong skin allograft survival and abrogate the production of donor-specific antibodies after skin grafting.

**Materials and Methods.** OX62+ (nonplasmacytoid) splenic dendritic cells were isolated from Fischer rats using magnetic beads and injected ( $2 \times 10^7$ ) into Lewis rat recipients with or without treatment with a nondepleting anti-CD4 (W3/25) mAb. After 4 weeks, splenic CD4+CD25+FOXP3+ T cells were harvested using magnetic beads from conditioned animals and injected ( $1 \times 10^6$ ) into naive Lewis recipients (day 1) before they received a skin graft from a Fischer (n = 4) or a third-party (Norway; n = 4) donor rat. Donor-specific antibodies were detected in recipient blood using flow cytometric cross-matches with donor lymphocytes from day 0 to day 30 after grafting.

**Results.** After injection of conditioned CD4+CD25+FOXP3+ T cells, Lewis recipients accepted skin grafts from Fischer donors indefinitely (>100 days) but rejected third-party skin grafts. Donor-specific antibodies were detected at low levels in only 1 recipient receiving conditioned Tregs before grafting. Naive Tregs did not prolong skin graft survival.

**Conclusion.** These preliminary data suggest that splenic dendritic cells in combination with an anti-CD4 mAb induce donor-specific Tregs that indefinitely prolong allogeneic skin graft survival and inhibit donor-specific antibody production. Experiments are under way to determine whether this protocol can inhibit chronic lesions after heart transplantation in this model.

**T**OLERANCE INDUCTION is a major issue in organ transplantation. The association of various donor-derived cells and monoclonal antibodies (mAbs) induces tolerance in rodents.<sup>1</sup> More than 10 years ago, Saitovich et al<sup>2</sup> demonstrated that addition of a nondepleting anti-CD4 mAb to transfused-donor blood induces tolerance to allogeneic transplants in rodents, provided that a critical interval is respected. This transfusion effect depends in part on induction of CD4+CD25+ regulatory T cells (Tregs) that accumulate in the spleen.<sup>3-6</sup> Whether the association of donor-derived cells with these mAbs can strengthen the mechanisms of tolerance to induction of allogeneic cells in the recipient is a matter of debate.<sup>7</sup>

Blood transfusion is not the only source of donor antigens. Dendritic cells express high levels of major histocompatibility

complex antigens and act as professional antigen-presenting cells; however, they may have tolerogenic properties. In different rodent models, various populations of immature, mature, or manipulated donor-derived dendritic cells together with anti-CD154 mAb or CTLA-4-prolong heart allograft survival.<sup>8-10</sup> In the rat, OX62 is expressed by a subpopulation of splenic nonplasmacytoid dendritic cells.<sup>11</sup> We previously demonstrated that injection of mature splenic dendritic cells

From Institut Fédératif de Recherche "Santé-STIC" (IFR 100), University of Burgundy, Dijon, France.  
Address reprint requests to Laurent Martin, MD, PhD, Service d'Anatomie Pathologique, Plateau Technique de Biologie, 2 Rue Angélique Duoudroy, 21070 Dijon CEDEX, France. E-mail: laurent.martin@chu-dijon.fr

0041-1345/09/\$-see front matter  
doi:10.1016/j.transproceed.2009.08.038

© 2009 by Elsevier Inc. All rights reserved.  
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Transplantation Proceedings, 41, 3363-3366 (2009)

3363

OX62+ SPLENIC DENDRITIC CELLS

3365

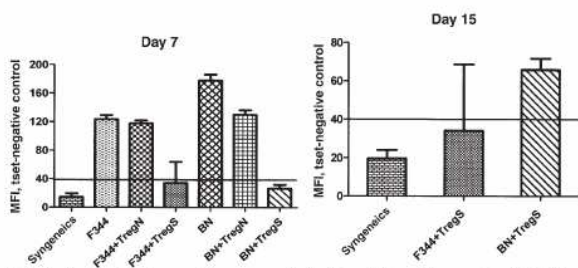


Fig. 2. Results of flow cytometric cross-matches are expressed as the difference in the mean fluorescence intensity (MFI) between the test and the negative control. Data represent the mean of the data of the 4 recipients at different times (days 7 and 15) for each group. F344 = allogeneic; F344+TregN = allogeneic and naive Treg; F344+TregS = allogeneic and conditioned Treg; BN = third-party donor; BN+TregN = third-party and naive Treg; BN+TregS = third-party and conditioned Treg.

### DISCUSSION

Donor-derived splenocytes plus nondepleting anti-CD4 mAbs do not prolong survival of allogeneic skin grafts in a rat model, whereas skin grafted simultaneously with a kidney, but not a heart, is accepted indefinitely.<sup>12</sup> However, stimulation of CD4+ T cells with allogeneic splenocytes in mice induces Tregs able to inhibit proliferation of naive T cells in vitro, and these cells can prevent rejection of 80% of allogeneic skin grafts.<sup>13</sup> In addition, recent data suggest that bone marrow-derived alloantigen dendritic cells are more effective than bulk spleen cells or monocyte-derived dendritic cells in expanding alloantigen-specific Tregs in both mice and macaques.<sup>14,15</sup> These data, together with those of previous studies,<sup>2,4-8</sup> justify simultaneous use of allogeneic dendritic cells and nondepleting anti-CD4 mAb in attempts to induce allograft tolerance.

In the present study, CD4+CD25+FOXP3+ T cells generated after intravenous infusion of donor-derived OX62+ splenic dendritic cells along with nondepleting anti-CD4 mAb induced indefinitely (>100 days) skin graft survival. In contrast, naive CD4+CD25+FOXP3+ T cells did not prolong survival of these grafts. The absence of indefinitely survival of third-party grafts suggests that these inducible Tregs are alloantigen-specific. Tregs involved in transplant tolerance are considered inducible and alloantigen-specific because they seem more likely than natural Tregs, which would have been in contact with alloantigens during their thymic development. Development of alloantigen-induced Tregs in thymocompetent recipients depleted of CD25+ lymphocytes occurs in the same way.<sup>16</sup>

In our model, allogeneic recognition of class I antigens by CD4+ T cells can be achieved only by indirect presen-

tation.<sup>17</sup> Because contact between B cells and CD4+ lymphocytes is mandatory for antibody production by B cells, the presence of donor-specific antigen may be taken as testimony of the activation of CD4+ T lymphocytes by way of this presentation. The absence or weak concentration of donor-specific antibody in recipients that received conditioned Tregs in our model suggests that these cells are able to prevent activation of B lymphocytes in vivo by inducing anergy, apoptosis, or lysis.<sup>18-21</sup>

In conclusion, our preliminary results suggest that, in this model, simultaneous injection of donor nonplasmacytoid splenic dendritic cells and nondepleting anti-CD4 mAb generates inducible donor-specific Tregs. These cells are able to prolong survival of skin grafts indefinitely and inhibit production of donor-specific antibodies. In future experiments, we plan to study the mechanisms of tolerance induction and to test whether this protocol induces indefinite survival of heart transplants and prevents development of lesions of chronic rejection.

### REFERENCES

- Riffe G, Mousson C: Donor-derived haematopoietic cells in organ transplantation: a major step toward allograft tolerance? *Transplantation* 75:53, 2003
- Saitovich D, Bushell A, Mahbi D, et al: Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation: a critical period of time is required for development of immunological unresponsiveness. *Transplantation* 61:1642, 1996
- Chosa E, Hara M, Watanabe A, et al: Spleen plays an important role in maintaining tolerance after removal of the vascularized heart graft. *Transplantation* 83:1226, 2007

3364

ALAWIEH, RIFLE, BOUCHOT ET AL

together with a nondepleting anti-CD4 mAb induces anergy in rats, probably by decreasing expression of costimulatory molecules, especially CD80.<sup>22</sup> In the present model, injection of allogeneic OX62+ dendritic cells alone generated antibodies directed toward donor lymphocytes and shortened skin allograft survival. This production was inhibited when a nondepleting anti-CD4 mAb was added to the dendritic cell treatment.

Taking these data into account, the objective of this preliminary study was to examine the ability of a protocol using OX62+ splenic donor-derived dendritic cells together with a nondepleting anti-CD4 mAb in the Fischer-Lewis rat model to generate in vivo donor-specific Tregs and to examine the ability of such Tregs to prolong survival of allogeneic skin grafts and to abrogate production of donor-specific antibodies.

### MATERIALS AND METHODS

We used a validated model of chronic rejection in the rat. Lewis rats (RT11) are strong producers of antibodies when used as recipients with Fischer 344 rats (RT11u) as donors.

Dendritic cells were isolated from donor spleens using anti-OX62 antibodies coupled to magnetic beads, as previously described,<sup>11</sup> and injected ( $2 \times 10^7$ ) into Lewis recipients. The dendritic cells were or were not associated with a nondepleting anti-CD4 mAb (W3/25, 2 mg per rat). At day 28, CD4+CD25+ cells were isolated from the spleens of treated animals (Fischer rats) after staining with anti-CD4 allophycocyanin (donor OX35; BD Pharmingen, Le Pont de Clay, France) and anti-CD25 phycoerythrin (donor OX39; BD Pharmingen) antibodies. The CD4+ cells were then positively selected using magnetic cell separation columns after labeling with anti-allophycocyanin multimeric antibodies (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Expression of FOXP3 by CD4+CD25+ cells was determined using flow cytometry (data not shown) using anti-FOXP3 mAb (eBioscience, Inc,

San Diego, California). The CD4+CD25+FOXP3+ cells were injected ( $1 \times 10^6$ ) into naive Lewis recipients the day before they received a Fischer skin graft (n = 4). To determine whether the Tregs were donor-specific, skin grafts from third-party rats (Norway rats) were transplanted (n = 4) into recipients injected with CD4+CD25+ lymphocytes sensitized to Fischer antigens. Control groups included syngeneic grafts, allogeneic grafts, and allogeneic grafts injected with naive CD4+CD25+ T cells (n = 4 each).

Donor-specific antibodies were detected in recipient blood using flow cytometric cross-matches with recipient serum samples obtained at days 7, 15, 30, and 45 and donor lymphocytes. Each test was performed twice, and the results were compared with negative and positive controls.

Differences observed between data from each experimental group were compared using the t test and Fisher exact test. P < .05 was considered statistically significant.

### RESULTS

In this first series of experiments, rats that received CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes from animals conditioned by injection of splenic OX62+ dendritic cells and anti-CD4 mAb before transplantation accepted indefinitely skin grafts from the same donor (Fig. 1). To determine whether tolerance in conditioned CD4+CD25+FOXP3+ lymphocytes was alloantigen-specific, we performed the same experiments using third-party rats (Norway) as donors. Survival of skin grafts from third-party donors was only slightly longer (Fig. 1).

Most skin graft recipients who received CD4+CD25+FOXP3+ T cells before transplantation did not develop donor-specific antibodies after skin grafting. Antibodies with weak affinity were detected in only 1 animal at days 7, 15, and 30. However, all recipients in the control groups (allogeneic, third-party, allogeneic and Treg naive rats) developed high levels of donor-specific antibodies (Fig. 2).

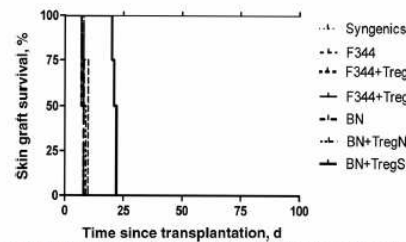


Fig. 1. Allogeneic skin grafts from Fischer rats (F344) and allogeneic skin grafts transplanted in recipients that received naive CD4+CD25+ lymphocytes (TregN) were rejected, whereas recipients that received CD4+CD25+ lymphocytes sensitized to donor antigens (TregS) before transplantation accepted a skin graft indefinitely (P = .01). Skin grafts from Norway donor rats (BN) transplanted in recipients injected before transplantation with naive or sensitized CD4+CD25+ lymphocytes were rejected (P = .009).

3366

ALAWIEH, RIFLE, BOUCHOT ET AL

- Kingsley CJ, Karim M, Bushell AR, et al: CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4 and CD28-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 165:1980, 2002
- Monaco AP, Medawar F: Chimerism in organ transplantation: conditioning experiments and clinical observations. *Transplantation* 75:138, 2003
- Nishi M, Shiraiwa N, Ikeda Y, et al: Operational tolerance induced by pretransmitting with donor dendritic cells under blockade of CD80 pathway. *Transplantation* 72:1556, 2001
- O'Connell FJ, Li W, Wang Z, et al: Immature and mature CD136+ dendritic cells prolong the survival of vascularized heart allografts. *J Immunol* 168:453, 2002
- Ian Y-Y, Wang Z, Raimondi G, et al: "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+ CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA-4. *J Immunol* 177:2606, 2006
- Voinne C, Huber FX, Trinite B, et al: Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284, 2002
- Sivaraman-Robin I, Mousson C, Zanetta G, et al: In vitro study of alloreactivity and microchimerism after injection of dendritic cells and anti-CD4 monoclonal antibody in a combination of Lewis-Wistar Fourth rats. *Transplant Proc* 32:2857, 1998
- Horiez DJ, Abdulhadi K, Martin J, et al: Chimerism in lymphoid tissues and donor-specific response after injection of allogeneic splenic dendritic cells in Fischer rats to Lewis recipients. *Transplant Proc* 38:349, 2006
- Margenthaler JA, Yu S, Osromo N, et al: Donor-specific renal, but not cardiac, allograft tolerance promotes upregulation of the normally rejected rat skin graft. *Transp Int* 16:713, 2003
- Oliveira V, Sawitzki B, Chapman S, et al: Anti-CD4-mediated selection of Treg in vitro-in vitro suppression does not predict in vivo capacity to prevent graft rejection. *Eur J Immunol* 38:1677, 2008
- Yamauchi S, Patel M, Harper A, et al: Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2758, 2006
- Moroneu A, Chiffoleau E, Beriou G, et al: Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the mouse. *Transplantation* 85:335, 2008
- Karim M, Kingsley CJ, Bushell AR, et al: Alloantigen-induced CD25+ CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25- CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 172:323, 2004
- Callaghan CJ, Rouhani FJ, Nagas MC, et al: Abrogation of antibody-mediated allograft rejection by regulatory CD4+ T cells with indirect allo-specificity. *J Immunol* 178:221, 2007
- Elddahl F, Dikderov S, Demanglars J, et al: CD4+CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune responses to exogenous antigens. *J Immunol* 166:55, 2006
- Janssens W, Carlier V, Wu B, et al: CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 171:3604, 2003
- Zhao DM, Thornton AM, Di Paolo RI, et al: Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925, 2006

# ANNEXE 3



## Injection of Donor-Derived Splenic Dendritic Cells Plus a Nondepleting Anti-CD4 Monoclonal Antibody to Prolong Primary Skin Graft Survival Indefinitely and Abrogate the Production of Donor-Specific Antibodies in the Fischer-to-Lewis Rat Combination

M. Alawieh, G. Malaper, O. Bouchot, G. Riffe, C. Mousson, and L. Martin

### ABSTRACT

We have previously shown that injection of donor-derived Fischer rat OX62+ dendritic cells plus an anti-CD4 monoclonal antibody generates donor-specific CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in Lewis rat recipients. The regulatory T cells indefinitely prolonged the survival of skin graft from Fischer rat and abrogated the antidonor antibody response. We have now shown that an injection of  $2 \times 10^6$  donor-derived OX62+ dendritic cells plus 2 mg nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (W325) at 28 days before grafting induced indefinite skin graft survival in this combination, whereas an injection on day -1 prolonged it only to 50 days. This effect is donor specific. In both cases, we suppressed the antidonor antibody response. It is likely that the efficacy of this protocol is, at least in part, dependent on induction of donor-specific regulatory T cells, as suggested by previous data. The 28 days necessary to obtain tolerance of allogeneic skin grafts may be due to the time required for the host to induce proliferation of donor-specific regulatory T cells.

**I**njection of various donor-derived cells in association with monoclonal antibodies, especially directed against the second signal of T-cell activation induces allograft tolerance in rodents.<sup>1</sup> We have previously shown that the combination of allogeneic OX62+ dendritic cells (nonplasmacytoid DC7) from Fischer rats and nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (MoAb) induces generation of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells (Treg) in Lewis rat recipients. These donor-specific Treg alone indefinitely prolonged Fischer skin allograft survival in Lewis rats as well as inhibited the production of donor-specific antibodies (DSA).<sup>2,3</sup> In the present study, we evaluated whether this protocol was able to prolong the survival of allogeneic skin grafts in primary hosts.

### MATERIALS AND METHODS

#### Skin Grafts

Fischer (F344) rats (RT1<sup>l</sup>) were used as donors and Lewis rats (RT1<sup>i</sup>) as recipients (Charles River, I'Arbresle, France). Individual full-thickness skin grafts were prepared to fit a bed on the left lateral thorax of isoflurane anesthetized recipients. The grafts were inspected regularly until they were completely destroyed, at which time they were considered to have undergone rejection.

© 2010 by Elsevier Inc. All rights reserved.  
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

Transplantation Proceedings, 42, 4347-4349 (2010)

#### Isolation of OX62+ Splenic Dendritic Cells

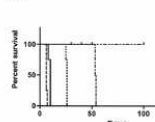
Mixed F344 splens were digested in 2 mg/ml collagenase D (Sigma, St Quentin Fallavier, France) in RPMI 1640/10% fetal calf serum for 15 minutes at 37°C. EDTA (10 mmol/L) was added during the last 5 minutes with pipetting of the cell suspension several times and filtration. The suspension was separated into high-density cells (containing most of the plasmacytoid dendritic cells) and low-density cells (containing most of the OX62+ dendritic cells) by using gradient centrifugation in 14.5% Nycodenz (Nycomed, Oslo, Norway). The OX62+ subset of splenic DCs were isolated from low-density cells after staining with anti-OX62 MoAb associated with magnetic beads (Miltenyi-Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cell purity was routinely >95%. OX62+ dendritic cells with or without the anti-CD4 MoAb were then injected into Lewis rats.

From the Institut Fédératif de Recherche Santé STIC (M.A., G.M., O.B., G.R., C.M., L.M.), Department of Cardiac Surgery (G.M., O.B.), Department of Nephrology and Transplantation (G.R., C.M.), and the Department of Pathology (L.M.), University of Burgundy, Dijon, France.  
Address reprint requests to L. Martin, MD, PhD, Department of Pathology, Plateau technique de Biologie, 2 rue Angeleique Drouot, 21070 Dijon cedex, France. E-mail: laurent.martin@univ-bourgogne.fr

0041-1345/10/\$30.00  
doi:10.1016/j.transproceed.2010.09.128

4347

4348



**Fig 1.** Survival curves of skin grafts of recipients receiving donor-derived DCs and anti-CD4 MoAb before grafting. Only recipients conditioned 28 days before grafting indefinitely accepted allogeneic skin grafts (4 rats/group).

#### Protocol

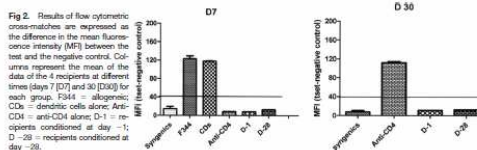
We used a validated model of chronic rejection in the rat. As recipients of F344 rat donor grafts, Lewis rats are strong producers of antibodies. Splenic F344 OX62+ DC ( $2 \times 10^6$ ) were injected with or without anti-CD4 MoAb (2 mg, W325, Gorbau, France) into Lewis recipients either 28 days or 1 day before transplantation. The control groups included syngeneic grafts or allogeneic grafts from Fischer rats ( $n = 4$  each). In addition, skin grafts from third party Brown Norway rats were performed in the conditioned Lewis rats.

#### Flow Cytometric Cross-Matches

Donor-specific antibodies in recipient blood were detected using flow cytometric cross-matches with donor lymphocytes exposed to recipient serum samples which had been obtained at days 7, 15, 30, and 60. Fresh donor splenocytes isolated by using FICOLL gradient centrifugation were suspended in phosphate-buffered saline solution (0.0001 mol/L). Cells ( $10^6$  cells) incubated with 25  $\mu$ L recipient serum for 30 minutes at room temperature were washed three times before incubation with 2  $\mu$ L anti-rat globulin-phycoerythrin. Cells suspended in PBS/formalin were then analyzed on a FACSCalibur apparatus (Becton Dickinson). Each test was performed in duplicate. The negative control samples were sera from naive rats, and positive were sera from immunized rats. Each test was performed twice with the results compared with negative and positive controls.

#### Histopathologic Evaluation

At the end of the follow-up, harvested skin grafts were fixed in formalin to evaluate their lesions.



**Fig 2.** Results of flow cytometric cross-matches are expressed as the difference in the mean fluorescence intensity (MFI) between the test and the negative control. Columns represent the mean of the data of the 4 recipients at different times (days 7 [D7] and 30 [D30]) for each group. F344 = allogeneic; DC = dendritic cells alone; Anti-CD4 = anti-CD4 alone; D-1 = recipients conditioned at day -1; D-28 = recipients conditioned at day -28.

ALAWIEH, MALAPER, BOUCHOT ET AL

#### Statistical Analysis

Observed differences between experimental groups were evaluated using Student *t* test and the Fisher exact test.  $P < .05$  was considered to be statistically significant.

#### RESULTS

Rats conditioned by injection of splenic OX62+ DCs and anti-CD4 MoAb at 28 days before grafting indefinitely accepted skin grafts from the same donor whereas those conditioned the day before or receiving anti-CD4 MoAb alone showed only delayed rejection of donor skin grafts (Fig 1). Skin grafts from a third party were rejected within 6 days (data not shown). At days 5 and 7 the rejected skin grafts showed infiltration by neutrophils in association with macrophages, edema, and a few lymphocytes.

Most skin graft recipients who received donor-derived DCs and anti-CD4 MoAb before transplantation did not develop DSA after skin grafting. However, all recipients in the control groups developed high levels of DSA (Fig 2).

#### DISCUSSION

In the present study, we observed that recipients conditioned at day -28 with donor-derived OX62+ splenic DCs along with a nondepleting anti-CD4 MoAb accepted allogeneic skin grafts indefinitely (>100 days). In contrast, recipients conditioned at day -1 or receiving only anti-CD4 MoAb showed delayed rejection. Interestingly, the rejected, but not the tolerated or delayed rejection skin grafts showed predominantly neutrophil infiltrates. In this experimental setting characterized by a short controlled ischemia (<30 minutes), it is unlikely that neutrophils are linked to a preservation injury. On the contrary, they could represent cellular vectors of rejection and/or of the healing process.<sup>4</sup> Their recruitment could depend in part on activation of T<sub>H</sub>17 subsets. Indeed, interleukin-17 produced locally has been shown to induce neutrophilic inflammation by several mechanisms including the expression of chemokine (C-C motif) ligand (CCL5) (RANTES) and CCL11 (Eotaxin 1).

Furthermore, recipients of DCs plus anti-CD4 MoAb did not develop DSA, even those who rejected their grafts. The absence of DSA among our conditioned recipients sug-

SPLenic DENDRITIC CELLS AND SKIN GRAFT SURVIVAL

4349

gested that the prevention of B-cell activation may be achieved in primary graft recipients possibly by inducing anergy, apoptosis, or lysis.<sup>5-8</sup> As previously reported,<sup>2</sup> the inhibition of DSA production by our protocol is in part associated with the generation of adaptive donor specific CD4+CD25+FoxP3+ Treg. Antigen-specific Treg may also act by inhibiting T<sub>H</sub>17 activation which is known to favor humoral responses.<sup>9</sup> The absence of DSA in recipients conditioned at day -1 is interesting in the context of clinical transplantation. It suggests that inhibition of DSA may be achieved by conditioning recipients just before grafting.

In conclusion, our results suggested that simultaneous injection of donor-derived nonplasmacytoid splenic DC and a nondepleting anti-CD4 MoAb was able to prolong the survival of primary skin grafts indefinitely and to inhibit production of donor-specific antibodies. In future experiments, we plan to study the mechanisms of tolerance induction and to test whether this protocol induces indefinite survival of heart transplants preventing development of chronic rejection lesions.

#### REFERENCES

1. Riffe G, Mousson C: Donor-derived haematopoietic cells in organ transplantation: a major step toward allograft tolerance? *Transplantation* 75:53, 2003

2. Voisine C, Hubert FX, Trinité B, et al: Two phenotypically distinct subsets of splenic dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169:2284, 2002

3. Bocoré OJ, Abdelhachib K, Martin L, et al: Chimerism in lymphoid tissues and donor-specific response after injection of allogeneic splenic dendritic cells from Fischer rats to Lewis recipients. *Transplant Proc* 38:2498, 2006

4. Alawieh M, Riffe G, Bouchot O, et al: Injection of donor-derived OX62+ splenic dendritic cells with anti-CD4 monoclonal antibody generates CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells that prolong allograft skin survival indefinitely and abrogate production of donor-specific antibodies in a rat model. *Transplant Proc* 41:3363, 2009

5. Alegre MI, Flouquin S, Goldman M: Cellular mechanisms underlying graft rejection: time for a reassessment. *Curr Opin Immunol* 19:563, 2007

6. Eddahri F, Oldenhove S, Denanot J, et al: CD4+CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune response to exogenous antigens. *J Immunol* 165:2006, 2006

7. Janssens W, Carlier V, Wu H, et al: CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner. *J Immunol* 171:4604, 2003

8. Zhao DM, Thornton AM, Di Paolo RL, et al: Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925, 2006

9. Jaffer Z, Ferrini ME, Gritman TA, Roberts K: Antigen-specific Treg regulate T<sub>H</sub>17-mediated lung neutrophilic inflammation. B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. *Eur J Immunol* 39:3107, 2007

## Résumé

La manipulation du système immunitaire du receveur avant la transplantation pourrait permettre d'obtenir la tolérance de transplants allogéniques vascularisés en évitant la réaction de rejet à médiation lymphocytaire et humorale et l'utilisation permanente de traitement immunosuppresseur. Chez l'animal, l'injection au receveur, avant la transplantation, de cellules du donneur sous couvert d'anticorps bloquant le premier ou le second signal permet l'expansion périphérique d'une sous population de lymphocytes T CD4+CD25+FOXP3+, à activité suppressive (Treg).

Dans ce travail de thèse, j'ai montré, dans un modèle murin utilisant des rats Fischer F344 comme donneur et des rats Lewis comme receveur, que l'injection au receveur avant la transplantation de cellules dendritiques spléniques OX62+ du donneur sous couvert d'anticorps monoclonal anti-CD4 W3/25 non dépletant permet d'obtenir la tolérance de transplants allogéniques cutanés et cardiaques à condition que ce protocole soit appliqué 28 jours avant la transplantation. La tolérance est due en partie à l'expansion de Treg inductibles spécifiques des alloantigènes. Elle n'est associée à aucune lésion d'artériopathie oblitérante observé au cours du rejet chronique de transplants vascularisés. Ces Treg ont aussi la capacité d'induire la tolérance de transplants allogéniques lorsqu'ils sont injectés au receveur la veille de la transplantation. Le blocage partiel de la production d'anticorps spécifiques du donneur chez les animaux tolérants suggère que les Treg interagissent avec les lymphocytes B en empêchant, soit la maturation des lymphocytes B en plasmocytes soit en favorisant l'expansion de lymphocytes B régulateurs. Ces résultats confirment que les Treg inductibles sont capables de prévenir les lésions vasculaires du rejet chronique. Ils soulignent également que les anticorps spécifiques du donneur apparaissant après la transplantation n'ont pas toujours un effet délétère.

Mots clés : tolérance, rat, transplantation, anticorps, peau, cœur, lymphocytes T régulateurs, lymphocytes B