

PEUT-ON PRÉDIRE UNE TOLÉRANCE AUX ALLOGREFFES ?

par

J.-P. SOULILLOU, M. GIRAL, C. BRAUD et S. BROUARD*

Malgré des progrès continus dans le résultat des allogreffes, le pronostic fonctionnel à long terme du greffon reste médiocre avec des résultats avoisinant les 55 p. 100 de greffons rénaux fonctionnels à 10 ans. L'analyse d'un tel chiffre est cependant complexe compte tenu de l'augmentation de l'âge des donneurs et des receveurs et de leurs pathologies associées. Les traitements modernes n'ont que très récemment influencé [1] la cinétique de perte des greffons après la première année. Ainsi, le devenir des greffons est à côté de paramètres strictement liés à la qualité initiale de l'organe, particulièrement conditionné par le phénomène du rejet chronique et la toxicité des immunosuppresseurs [2, 3]. Ces restrictions sont à l'origine d'un regain de recherche sur la capacité d'induire une tolérance immunitaire chez les receveurs d'allogreffe. Cependant, alors que de nombreux travaux ont montré qu'il était possible d'induire une tolérance immune chez le rongeur, ce n'est que récemment que des protocoles ont été envisagés chez le primate et encore plus récemment chez l'homme. Ces protocoles restreint à des pathologies rares n'ont pas encore abouti à des résultats plaidant pour une large application clinique [4].

Dans cette revue, nous envisageons une autre façon de tirer bénéfice de la recherche sur la tolérance à une allogreffe en clinique qui est la possibilité de *reconnaître* cet état chez des sujets porteurs d'un greffon fonctionnellement stable et traités par un régime de « maintenance » classique associant plusieurs immunosuppresseurs. D'abord observé au niveau de quelques cas sporadiques chez les receveurs de rein [5] (*Roussey et al., Am J Transplant, In press*), ce concept a été fortement renforcé par la mise en évidence du fait qu'une proportion non négligeable de receveurs de greffons hépatiques pouvait subir avec succès un sevrage des immunosuppresseurs. 20 p. 100 à 25 p. 100 des receveurs de greffe de foie pourraient en effet subir un tel sevrage [6-9]. L'incidence réelle d'un état de tolérance chez les receveurs de rein est considérée comme beaucoup plus faible sans que des études convaincantes ne soient disponibles à ce sujet.

* Service de Néphrologie et INSERM U643, Centre hospitalier universitaire Jean Monnet, Nantes.

TOLÉRANCE OPÉRATIONNELLE, ANALYSE CLINIQUE

La définition de l'état de tolérance opérationnelle est basée sur la stabilité de la fonction rénale plusieurs années après interruption du traitement immunosuppresseur. Sont habituellement aussi reconnus comme critères différents paramètres de qualité de cette fonction rénale (taux de créatinine, taux de protéinurie, etc.). Cependant, l'état de tolérance opérationnelle ne repose pas sur une définition histologique. Quelle serait d'une part l'interprétation d'altérations histologiques modérées (tel qu'un infiltrat par exemple) associées à une fonction stable à dix ans sans immunosuppresseur ? D'autre part, beaucoup d'équipes ne souhaitent pas biopsier ces patients compte tenu des risques encourus [10]. Si l'on considère la biopsie utile en cas de découverte histologique anormale, des biopsies itératives réalisées à différents jalons de temps (1 an ? 2 ans ?) devraient être réalisées, augmentant réellement les risques, sans pour autant apporter de réponse convaincante sur le plan clinique.

Alors que de plus en plus d'études sont consacrées à l'analyse des paramètres biologiques, en particulier concernant le système immunitaire chez ces sujets naturellement tolérants à une allogreffe après arrêt des immunosuppresseurs (*voir infra*), de « simples » études cliniques dévolues à la recherche de paramètres influençant éventuellement l'installation de cet état manquent. Bien que plusieurs études ont rapporté qu'un pourcentage substantiel de receveurs de greffons hépatiques développe un état de tolérance après sevrage des immunosuppresseurs, la recherche de caractéristiques cliniques plus spécifiquement associées à cet état manque aussi. Récemment, nous avons pu réaliser une première étude clinique sur 10 sujets « opérationnellement tolérants » pendant de nombreuses années après l'arrêt du traitement (9,4+/-5,2 ans). La majorité de ces patients avaient interrompu leur traitement par non observance et 2 pour PTLD. Certains facteurs cliniques qui pourraient favoriser l'installation de cette tolérance sont suggérés (*Roussey et al., Am J Transplant, In press*). Premièrement, ces patients interrompent leur traitement sur une longue période, souvent de plusieurs années. Deuxièmement, les donneurs sont très jeunes : médiane 25 ans, en particulier nettement plus jeunes que les receveurs eux-mêmes, suggérant que la « qualité » du greffon jouerait un rôle peut être en générant moins d'inflammation. Les patients opérationnellement tolérants pourraient aussi avoir un profil de « non répondeur » avec un taux d'allo-anticorps post-transfusionnels faible (*Roussey et al., Am J Transplant, In press*). L'analyse clinique ne suggère pas que ces sujets présentent un état d'immunosuppression aspécifique important. Le taux d'infections en général et d'infections opportunistes en particulier n'est pas plus élevé que chez les contrôles (volontaires sains). Nous avons récemment analysé, de façon prospective, la capacité qu'avaient ces sujets tolérants à répondre à une vaccination anti-grippale et démontré que leur réponse n'est pas différente de celle de sujets normaux, alors que la réponse de sujets stables sous traitement immunosuppresseur classique était statistiquement inférieure (*Roussey et al., Am J Transplant, In press*). Enfin, certains de ces malades ont développé des anticorps (3/10) dont une immunisation anti-donneur montrant bien que le terme de tolérance opérationnelle est une définition clinique.

EXISTE-T-IL DES ALTÉRATIONS BIOLOGIQUES ASSOCIÉES AU PHÉNOMÈNE DE TOLÉRANCE OPÉRATIONNELLE ?

De nombreuses études mettent en évidence des anomalies biologiques qui permettraient d'identifier des patients tolérants, susceptibles, à terme, de rentrer dans un protocole de sevrage contrôlé de leur traitement immunosuppresseur [11, 12] (*Louis et al., Transplantation, in press et Baeten et al., JASN, in press*). Certains de ces travaux ont été bien sûr guidés par les observations faites sur l'animal de laboratoire tolérant une allogreffe, particulièrement concernant les cellules suppressives. Il faut cependant garder à l'esprit que le « modèle » de « tolérance opérationnelle humaine » est particulier, avec une première phase initiale et prolongée d'immunosuppression profonde. D'autre part les protocoles « animaux de tolérance » n'ont pas pu être appliqués avec succès chez l'homme, soulevant la pertinence même de ces « modèles ». Pour ces différentes raisons, seuls les travaux réalisés chez l'homme seront évoqués ici.

Analyse phénotypique

Les études des phénotypes des leucocytes sanguins ont été d'abord réalisées chez des patients tolérants une allogreffe de rein ou de foie. Des sujets tolérants une greffe de foie présentent un taux de lymphocytes CD4⁺CD25⁺ significativement augmenté par rapport à celui des sujets normaux [13]. Ce profil n'a cependant pas été retrouvé chez les sujets tolérants une greffe de rein qui ont un nombre de CD4⁺CD25⁺ identique à celui des sujets normaux (*Louis et al., Transplantation, in press*). Cependant, les patients présentant un rejet chronique montraient un déficit significatif du nombre de CD4⁺CD25⁺ sans modification de leur phénotype CTLA4 Ig, CD103, GITR suggérant un nouveau mécanisme de rejet chronique (*Louis et al., Transplantation, in press*). Ces mêmes patients présentent également une diminution significative des transcrits FOXP3 au niveau de leurs populations sanguines CD4⁺ et CD8⁺ (*Louis et al., Transplantation, in press*). Ces résultats sont à rapprocher de ceux récemment obtenus par Thangamani Muthukumar et al., suggérant aussi une expression de FOXP3 dans les urines chez les receveurs présentant une mauvaise récupération fonctionnelle après un rejet aigu [14]. Les anomalies du nombre de lymphocytes T exprimant le TCR gamma delta ont été aussi notées sur des patients tolérant une greffe de foie sans que l'on puisse actuellement replacer cette observation dans un contexte physiopathologique pertinent [13]. Les sujets tolérant une greffe de foie auraient un phénotype de cellules dendritiques circulant ressemblant à celui de sujets normaux, alors que des sujets ayant présenté un rejet lors du sevrage en immunosuppresseur (c'est-à-dire non tolérant) auraient une diminution du nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes [15]. Nous avons récemment aussi étudié les lymphocytes T CD8⁺ des sujets tolérant une greffe de rein ou présentant un rejet chronique et nous avons montré une signature phénotypique caractéristique de ce rejet chronique, en particulier un taux élevé de lymphocytes CD8⁺ CD28⁻ ayant des caractéristiques de lymphocytes cytotoxiques alors que les sujets opérationnellement tolérants avaient un phénotype non différent des sujets normaux (*Baeten et al., JASN, In press*). Ces expériences méritent bien sûr d'être répétées sur des plus grandes cohortes et par différentes équipes. Elles suggèrent que les receveurs de rein opérationnellement tolérant présentent

un phénotype leucocytaire sanguin sensiblement similaire à celui de sujets normaux. Elles suggèrent aussi pour la première fois qu'un déficit de régulation pourrait être associé au phénotype rejet chronique. Cependant, seul le compartiment sanguin a été analysé et il est possible que des anomalies ne concernent que des populations particulières. Peu d'informations sont publiées sur l'histologie des reins « tolérés ». Les biopsies ont montré un infiltrat très modéré dans un cas (*Roussey et al., Am J Transplant, In press*) et sans infiltrat dans un autre.

Répertoire T

Les rejets aigu et chronique ont été associés à des altérations des variations du répertoire du récepteur des lymphocytes T dans des modèles expérimentaux et chez l'homme [5, 16]. L'étude du répertoire T est un moyen indirect d'analyse d'un état immunitaire « actif ». A ce titre l'état de tolérance opérationnelle peut peut-être être associé à un répertoire lymphocytaire T non sélectionné (répartition gaussienne des longueurs des régions CDR3, *complementary determining region 3*, zone d'interaction avec le peptide) ou présenter des altérations de longueur de CDR3 qui traduiraient des sélections clonales associées à une régulation immunitaire. Nous avons utilisé une méthode d'analyse globale des variations du répertoire du récepteur des lymphocytes T (*TcLandscape*) [5] chez ces patients présentant un rejet chronique ou un état de tolérance opérationnelle à une greffe de rein. Des premiers résultats suggéraient que les patients tolérants et les patients en rejet chronique avaient des profils différents de la distribution des longueurs du CDR3 [17]. Cette observation chez des sujets présentant une tolérance opérationnelle est importante car « paradoxale ». Ces résultats ont été confortés par une autre équipe reproduisant sensiblement les mêmes conclusions sur un petit nombre de patients tolérants et sur des sujets porteurs de greffons stables à très long terme [18]. Une étude prospective sur un nombre important de patients, actuellement en cours dans le cadre de deux projets collaboratifs internationaux (ITN/NIH et Communauté Européenne), devrait affiner ces premiers résultats.

Réponse anti-donneur et cellules régulatrices

Peu d'informations sont disponibles sur la capacité du système immunitaire des sujets opérationnellement tolérants à répondre contre des cellules ou des peptides issus du CMH incompatible du donneur. Certaines observations « anecdotiques » (c'est-à-dire concernant un faible nombre de patients) suggèrent que les lymphocytes T sanguins de ces patients sont capables de répondre normalement contre des cellules présentatrices du donneur dans un système de culture lymphocytaire mixte. Ces résultats sont trop fragmentaires pour permettre une conclusion, principalement à cause de l'absence de cellules du donneur dans la majorité des cas. Nos propres résultats utilisant la stimulation des lymphocytes T par un anticorps anti-CD3 en présence de PBMC autologues ne suggèrent ni un déficit de prolifération des cellules CD25⁻ de ces patients ni une polarisation Th2 lorsque les cytokines du surnageant de ces cultures sont analysées (*Louis et al., Transplantation, in press*). Dans des expériences plus récentes (*Braudeau et al., En préparation*), nous avons analysé si les cellules CD4⁺CD25⁺ autologues des sujets tolérants, des volontaires sains ou des patients présentant un rejet chronique supprimaient de

façon plus importante la prolifération des CD4⁻CD25⁻ autologues simulés par un anticorps anti-CD3 en présence d'APC autologues. Ces expériences ne suggèrent pas que, dans ce modèle « aspécifique » (c'est-à-dire sans antigène de donneur), il y ait des cellules suppressives plus actives chez les patients tolérants. Notons cependant que dans ces expériences, les cellules CD4⁺CD25⁺ (en nombre moindre dans le sang des patients présentant un rejet chronique (*voir plus haut*)), sont capables, chez la majorité des patients, de bloquer la prolifération des CD25⁻ autologues de la même façon que les CD4⁺CD25⁺ de volontaires sains ou de patients tolérants.

Différents groupes ont conduit d'élégantes séries d'expériences sur la capacité des lymphocytes T de ces patients, d'inhiber la réponse à des antigènes vaccinaux en présence d'antigènes du CMH du donneur, suggérant l'existence de cellules suppressives induites. Bien que ces expériences n'aient été réalisées que sur un nombre restreint de patients, elles suggèrent un rôle particulier du MHC (classe I) du donneur [11]. Cependant, les preuves expérimentales manquent encore pour faire la part de mécanismes impliquant une ignorance immunitaire, une délétion de cellules alloréactives ou une régulation faisant intervenir différents types de cellules régulatrices CD4 ou CD8 ou enfin des modifications fonctionnelles des cellules dendritiques comme suggéré dans la greffe de foie [19].

« Signature » transcriptionnelle

Un certain nombre d'études ont porté sur l'analyse des cellules mononucléées sanguines par puces à ADN. L'analyse des cellules sanguines circulantes a prouvé qu'une signature transcriptionnelle particulière pouvait être observée dans le cadre du rejet chronique [20] suggérant d'intéressants développements sur la possibilité de distinguer, à partir d'une prise de sang de sujets présentant une tolérance opérationnelle ou un rejet chronique, des groupes de gènes reliés à ces deux états. Une étude exhaustive sur cinq patients présentant un état de tolérance opérationnelle plusieurs années après l'interruption du traitement immunosuppresseur et 11 patients en rejet chronique a effectivement permis de montrer un groupe de gènes capables de « classer » correctement un état de tolérance chez six nouveaux sujets tolérants. Ce groupe de gènes permet en effet ainsi d'identifier les sujets qui seraient tolérants ou présenteraient un rejet chronique si le traitement immunosuppresseur était interrompu (*Brouard et al., en préparation*). Les sujets normaux expriment une partie de ces gènes, mais la signature « de tolérance » reste individualisable. Une partie importante de ces gènes sont en relation avec la régulation du TGF- β . Par ailleurs les sujets tolérants exprimeraient moins de molécules reliées aux co-signaux immunitaires (cycle cellulaire et l'activation des lymphocytes T). Ces résultats préliminaires ont été récemment reproduits par une autre étude indépendante conduite en collaboration avec la plateforme transcriptionnelle Ouest Génopôle en utilisant cette fois-ci une puce à oligonucléotide. Il y a donc des possibilités concrètes d'obtenir un « outil » biologique susceptible de distinguer un état de tolérance/rejet chronique chez des sujets transplantés depuis plusieurs années et sous traitement immunosuppresseur classique. Cette démonstration nécessite évidemment des analyses sur de larges cohortes (200 malades) de ces receveurs stables sous traitement immunosuppresseur. Si un nombre suffisant de receveurs exprime la « signature transcriptionnelle » associée à la tolérance, une étude de sevrage contrôlé des immunosuppresseurs est concevable. Plusieurs années seront nécessaires pour aboutir à une conclusion.

CONCLUSION

Parmi les différents axes de recherche sur la tolérance aux allogreffes chez l'homme, l'analyse des rares patients ayant développé un état de tolérance « spontanée » à une allogreffe de rein de cadavre CMH incompatible est devenu plus populaire et fait l'objet de grands réseaux de collaboration internationaux (*voir ci-dessus*) qui permettront à terme de réunir des cohortes suffisantes de patients. Les résultats encore très fragmentaires suggèrent que les mécanismes ne sont pas forcément les mêmes que ceux qui ont été identifiés chez le rongeur. Si la compréhension de ces mécanismes s'avère très complexe, la possibilité de reconnaître un état de tolérance chez des receveurs stables sous traitement immunosuppresseur pourrait cependant devenir une réalité clinique dans les prochaines années.

BIBLIOGRAPHIE

1. HALLORAN P. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 2004 ; **351** : 2715-2729.
2. NANKIVELL BJ, BORROWS RJ, FUNG CL et al. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*, 2003 ; **349** : 2326-2333.
3. SOULILLOU JP, GIRAL M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation*, 2001 ; **27** : S89-S93.
4. COSIMI AB, SACHS DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation*, 2004 ; **77** : 943-946.
5. BROUARD S, DUPONT A, GIRAL M et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant*, 2005 ; **5** : 330-340.
6. MAZARIEGOS GV, REYE J, MARINO IR et al. Weaning of immunosuppression in liver transplant recipients. *Transplantation*, 1997 ; **63** : 243-249.
7. PONS JA, YELAMOS J, RAMIREZ P et al. Endothelial cell chimerism does not influence allograft tolerance in liver transplant patients after withdrawal of immunosuppression. *Transplantation*, 2003 ; **75** : 1045-1047.
8. TAKATSUKI M, UEMOTO S, INOMATA Y et al. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation*, 2001 ; **72** : 449-454.
9. TISON G, PALMIERI OG et al. Complete weaning off immunosuppression in HCV liver transplant recipients is feasible and favourably impacts on the progression of disease recurrence. *Journal of Hepatology*, 2006 ; *in press*.
10. FURNESS PN, PHILPOTT CM, CHORBADJIAN MT et al. Protocol biopsy of the stable renal transplant : a multicenter study of methods and complication rates. *Transplantation*, 2003 ; **76** : 969-973.
11. DERKS RA, BURLINGHAM W. In vitro parameters of donor-antigen-specific tolerance. *Curr Opin Immunol*, 2005 ; **17** : 560-564.
12. VANBUSKIRK AM, BURLINGHAM WJ, JANKOWSKA-GAN E et al. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest*, 2000 ; **106** : 145-155.
13. LI Y, KOSHIBA T, YOSHIZAWA A et al. Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor liver transplantation. *Am J Transplant*, 2004 ; **4** : 2118-2125.
14. MUTHUKUMAR T, DADHANIA D, DING R et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N. England J. Med*, 2005 ; **353** : 2342-2351.
15. HACKSTEIN H, RENNER FC, BOHNER A et al. Dendritic cell deficiency in the blood of kidney transplant patients on long-term immunosuppression : results of a prospective matched-cohort study. *Am J Transplant*, 2005 ; **5** : 2945-2953.

16. ALVAREZ CM, OPELZ G, GIRALDO MC et al. Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transplant*, 2005 ; **5** : 746-756.
17. BROUARD S, DUPONT A, GIRAL M et al. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T cell clonal regulation. *Am J Transplant*, 2005 ; **5** : 330-340.
18. ALVAREZ CM, PARIS SG , ARANGO L et al. Kidney transplant patients with long-term graft survival have altered expression of molecules associated with T-cell activation. *Transplantation*, 2004 ; **78** : 1541-1547.
19. MAZARIEGOS GV, ZAHORCHAK AP, REYES J et al. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant*, 2005 ; **5** : 314-322.
20. DONAUER J, RUMBERGER B, KLEIN M, Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation*, 2003 ; **76** : 539-547.