

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

									2	9
--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---

**Caractérisation de la fibrinogen-like protein 2
et de l'interleukine-34 identifiées
chez les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low}
dans un modèle d'allogreffe chez le rat.**

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie – Médecine - Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Séverine BEZIE

Le 7 décembre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Eliane PIAGGIO, Directeur de Recherche, Paris

José COHEN, Professeur des Universités, Créteil

Examineur : Brigitte LE MAUFF, Professeur des Universités, Caen

Directeurs de thèse :

Lise CARON, Chargée de Recherche, Nantes

Ignacio ANEGON, Directeur de Recherche, Nantes

Sommaire

ABREVIATIONS	4
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION.....	10
I. LA TRANSPLANTATION	12
1. LES LIMITES ACTUELLES DE LA TRANSPLANTATION	12
- La pénurie d'organe	12
- L'origine du greffon	13
- Les lésions induite par l'ischémie reperfusion.....	13
- Le pronostic du rejet	14
2. LES PHASES CLINIQUES DU REJET DE GREFFE	14
A. Le rejet hyperaigu	14
B. Le rejet aigu.....	15
C. Les dysfonctions chroniques du greffon.....	17
D. Les limites de l'immunosuppression chronique	18
3. LA REPONSE A MEDIATION CELLULAIRE T.....	19
A. Les cellules dendritiques : présentatrices d'antigènes.....	20
- Les cellules dendritiques conventionnelles	20
- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes	22
- Les cellules dendritiques inflammatoires	23
B. L'activation des lymphocytes T allo-réactifs.....	23
1. Signal 1 : le signal antigénique	24
- La présentation directe des alloantigènes aux lymphocytes T	25
- La présentation indirecte des alloantigènes	26
- L'allo-présentation semi-directe.....	27
2. Signal 2 : les signaux de costimulation	29
- La voie de costimulation CD40/CD40L.....	30
- Le blocage de la voie CD40/CD40L en transplantation	33
3. Signal 3 : le signal cytokinique.....	39
C. La différenciation en lymphocytes T effecteurs du rejet.....	39
4. LA REPONSE A MEDIATION HUMORALE	42
A. L'activation des lymphocytes B	42
B. Les immunoglobulines	43
C. La cascade protéolytique du complément	44
D. La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)	45
II. LA TOLERANCE EN TRANSPLANTATION	46
1. LA TOLERANCE CENTRALE	46
A. La sélection des lymphocytes T	46
B. La sélection des lymphocytes B.....	49
2. LA TOLERANCE PERIPHERIQUE	51
A. La tolérance passive	51
1. L'ignorance d'antigènes	51
2. La délétion des lymphocytes	52
3. L'anergie des lymphocytes	53
4. La déviation phénotypique vers un profil de type Th2.....	54

B.	La tolérance active	55
1.	La suppression/régulation	55
2.	Les lymphocytes T régulateurs	55
-	Les lymphocytes T régulateurs CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	57
-	Les lymphocytes T régulateurs CD45RC ^{low}	60
➤	Le CD45	60
➤	Les lymphocytes T CD4 ⁺ CD45RC ^{low}	61
➤	Les lymphocytes T CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	62
-	Les autres populations de lymphocytes T CD8 ⁺ régulateurs	65
3.	Les lymphocytes B régulateurs	71
4.	Les cellules dendritiques tolérogènes	77
5.	Macrophages activés de façon alternative	81
6.	Application clinique en transplantation	82
7.	Le transfert de gènes en transplantation	83
III.	LA FIBRINOGEN-LIKE 2/FIBROLEUKIN (FGL2) : amie ou ennemie ?	87
1.	Caractérisation de FGL2	87
2.	FGL2 favorise le développement de l'hépatite	89
3.	FGL2 est impliquée dans des mécanismes de rejet et de tolérance au greffon	90
4.	Les récepteurs de FGL2	92
IV.	L'INTERLEUKINE 34 (IL-34) : un potentiel inexploité	95
1.	Une découverte récente	95
2.	Le M-CSF : une molécule aujourd'hui bien caractérisée	96
3.	Le CD115 : un récepteur partagé par le M-CSF et l'IL-34	98
4.	L'IL-34 : plus qu'un substitut du M-CSF	100
PROJET DE RECHERCHE	105	
RESULTATS	111	
PROJET I	113	
<i>Résultats préliminaires</i>	<i>113</i>	
<i>Article I</i>	<i>117</i>	
<i>Résultats complémentaires</i>	<i>156</i>	
<i>Discussion</i>	<i>161</i>	
PROJET II	173	
<i>Article II</i>	<i>173</i>	
<i>Discussion</i>	<i>195</i>	
CONCLUSION/PERSPECTIVES	205	
BIBLIOGRAPHIE	213	
ANNEXES	264	
ARTICLE 3	266	
ARTICLE 4	289	
PUBLICATIONS	3135	
COMMUNICATIONS ORALES	3146	
POSTERS	3146	

Abréviations

AAV	: adenovirus-associated virus
AAM	: macrophages activés de façon alternative
ADCC	: antibody-dependant cellular cytotoxicity
Ad	: Adenovirus
AIRE	: autoimmune regulator
BCR	: B cell receptor
Bregs	: lymphocytes B régulateurs
CD40L	: CD40 ligand
cDC	: conventionel dendritic cell
CMH	: complexe majeur d'histocompatibilité
CmH	: complexe mineur d'histocompatibilité
CPA	: cellule présentatrice d'antigène
CSF-1R	: récepteur au CSF-1 ou CD115
CTLA-4	: cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DC	: dendritic cell
FGL2	: fibrinogen-like protein 2/fibroleukin
Foxp3	: forkhead transcription factor 3
FRED	: fibrinogen-related domain
GFP	: green fluorescence protein
GvHD	: graft versus host disease
HLA	: human leucocyte antigen
HO-1	: heme oxygenase 1
IDO	: indoleamine 2,3 dioxygenase
IFN-γ	: interferon gamma
IL	: interleukine
ITIM	: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LPS	: lipopolysaccharide
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
M-CSF	: macrophage-colony stimulating factor
NFκB	: nuclear factor kappa B
NK	: natural killer
NKT	: natural killer TCR ⁺
nTregs/iTregs	: lymphocytes Tregs naturels / induits
PD-1	: programmed death-1
pDC	: plasmacytoid dendritic cell
RFc	: récepteur au fragment Fc des immunoglobulines
TCR	: T cell receptor
TGF-β	: Tumor Growth Factor beta
Th	: helper T lymphocyte
TNF-α	: tumor necrosis factor alpha

Liste des figures

Figure 1. Site d'action de différents immunosuppresseurs ciblant l'activation des lymphocytes T	19
Figure 2. Migration des DC du greffon vers les ganglions lymphatiques drainants	21
Figure 3. Les lymphocytes T nécessitent 3 signaux d'activation.	24
Figure 4. Les voies de reconnaissance directe, indirecte et semi-directe des alloantigènes par les lymphocytes T.29	
Figure 5. La différenciation des lymphocytes T en effecteurs du rejet d'allogreffe.	41
Figure 6. L'activation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires.	43
Figure 7. Développement des lymphocytes T non-autoréactifs à partir des cellules souches hématopoïétiques.	47
Figure 8. Génération de lymphocytes T régulateurs naturels dans le thymus.	49
Figure 9. Développement des lymphocytes B non autoréactifs à partir des cellules souches hématopoïétiques.	50
Figure 10. Les mécanismes de tolérance passive.....	51
Figure 11. Mécanismes de suppression par les lymphocytes T régulateurs $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$	59
Figure 12. Représentation schématique des isoformes CD45RABC et CD45RO	63
Figure 13. Expression du CD45RC durant le développement des lymphocytes T $CD4^+$ chez le rat.	61
Figure 14. Les lymphocytes Tregs $CD8^+ CD45RC^{low}$ augmentent l'expression de IDO par les cellules endothéliales du greffon via l' $IFN\gamma$	65
Figure 15. Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs	75
Figure 16. Les DC IDO^+ favorisent la génération de Tregs.	80
Figure 17. Représentation 3D de la molécule FGL2.	88
Figure 18. Mécanismes d'action de FGL2 décrits chez la souris	93
Figure 19. Expression des récepteurs $Fc\gamma R$ par les cellules immunes.....	94
Figure 20. Superposition 3D de IL-34 et M-CSF et comparaison de leur liaison au CD115	100
Figure 21. L'existence d'un second récepteur à l'IL-34 n'est pas exclue.....	101
Figure 22. Répartition des gènes différenciellement exprimés entre les Tregs naturels et induits par CD40Ig selon leur fonction biologique.....	108
Figure 23. Etat des connaissances avant ce travail de thèse.	110
Figure 24. Implication de FGL2 dans la suppression exercée par les lymphocytes Tregs $CD8^+ CD45RC^{low}$ par contact avec les lymphocytes T $CD4^+ CD25^+$	115
Figure 25. La surexpression de FGL2 in vivo prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat.	156
Figure 26. Le serum des rats traités par AAVFGL2 inhibe la prolifération des lymphocytes T $CD4^+ CD25^+$ en réponse aux pDC allogéniques vs le serum de rats naïfs, de rats traités par AdCD40Ig, ou par un AAV contrôle.157	
Figure 27. Quantification du degré de rejet chronique dans les greffons des rats traités par AAVFGL2 et transférés par des splénocytes.	158
Figure 28. Caractérisation phénotypique des splénocytes des rats traités par AAVFGL2 et transférés par les splénocytes tolérogènes.....	159
Figure 29. Les lymphocytes B sont impliqués dans la tolérance infectieuse et infiltrent le greffon chez les rats long surviveurs.....	160
Figure 30. Schéma bilan des mécanismes impliquant la protéine FGL2.....	170
Figure 31. Hypothèse des mécanismes impliquant l'IL-34.	202
Figure 32. Schéma bilan des mécanismes d'action des lymphocytes Tregs $CD8^+ CD45RC^{low}$ mis en évidence jusqu'à ce jour.	212

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Evolution des besoins et des greffes réalisées en 2000 et 2011 d'après l'agence de la Biomédecine.</i>	12
<i>Tableau 2. Résumé des présentations des antigènes du donneur par les DC aux lymphocytes T du receveur en ce qui concerne le Complexe Majeur d'Histocompatibilité.</i>	25
<i>Tableau 3. Liste non exhaustive des voies de costimulation des lymphocytes T.</i>	30
<i>Tableau 4. Expression du CD40 et du CD40L par les cellules immunitaires.</i>	31
<i>Tableau 5. Conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie CD40 sur différents types cellulaires.</i>	33
<i>Tableau 6. Stratégies de blocage de l'interaction CD40-CD40L en transplantation.</i>	38
<i>Tableau 7. Liste non exhaustive des cellules régulatrices</i>	56
<i>Tableau 8. Liste des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ régulatrices</i>	66
<i>Tableau 9. Exemples de populations de lymphocytes B régulateurs caractérisés dans des modèles de maladies autoimmunes ou de transplantation (liste non exhaustive).</i>	72
<i>Tableau 10. Caractéristiques des vecteurs viraux les plus couramment utilisés en transfert de gènes</i>	83
<i>Tableau 11. Bilan des différents modèles testés durant cette thèse</i>	209

INTRODUCTION

I. LA TRANSPLANTATION

1. LES LIMITES ACTUELLES DE LA TRANSPLANTATION

Des facteurs immunologiques, mais aussi non immunologiques, interviennent dans le devenir du greffon. Au cours des 20 dernières années, les nombreuses avancées techniques concernant la conservation des organes, la chirurgie et les suites opératoires, le développement de la prévention et du traitement des rejets de greffe et des infections ont contribué à une meilleure survie du greffon.

- La pénurie d'organe

Le nombre de patients nécessitant une greffe d'organe ne fait que croître au cours des années (x1,5 entre 2000 et 2011) et dépasse largement le nombre de greffons disponibles. En effet, pour 15 000 patients nécessitant une greffe, seulement un tiers ont reçu un organe en 2011 selon les chiffres de l'Agence de Biomédecine. Par ailleurs, seulement la moitié des donneurs potentiels sont effectivement prélevés (Tableau 1).

Prélèvement et greffe d'organes		
nombre de...	2000	2011
personnes décédées en état de mort encéphalique recensées	2 016	3 174
personnes décédées en état de mort encéphalique prélevées	1 016	1 572
malades ayant eu besoin d'une greffe d'organes	10 007	15 063
<i>inscrits en liste d'attente d'un organe au 1^{er} janvier</i>	5 928	9 528
<i>inscrits en liste d'attente d'un organe au cours de l'année</i>	4 079	5 535
greffes d'organes réalisées	3 211	4 945

Tableau 1. Evolution des besoins et des greffes réalisées en 2000 et 2011 d'après l'agence de la Biomédecine.

La greffe permet non seulement d'améliorer significativement la durée et la qualité de vie du patient, mais est aussi préférable en terme de coût.

Pour pallier à la pénurie d'organe, la xénotransplantation et la transplantation de tissus composites se sont développées. La compréhension des mécanismes immunologiques de tolérance aux greffes de tissus composites est un objectif majeur et pourrait offrir des pistes thérapeutiques innovantes en transplantation d'organe. Par ailleurs, les objectifs sont

aujourd'hui d'augmenter le nombre de donneur de +5% par an, d'augmenter la diversité génétique des donneurs de cellules souches hématopoïétiques, et d'améliorer la survie du greffon.

- L'origine du greffon

Les organes et tissus peuvent être prélevés sur donneurs décédés en état de mort encéphalique ou après un arrêt cardiaque, sur donneurs dits « à critères élargis », soit agés (Savoie et al. 2007) ou porteurs de maladies chroniques ou de marqueurs infectieux, sur donneurs vivants pour le rein, et prélevés en chambre mortuaire pour les tissus. Les cellules souches hématopoïétiques sont, elles, issues de prélèvements de moelle osseuse, de sang périphérique, ou de placenta. Les greffons rénaux prélevés de donneurs en mort cérébrale ont une survie diminuée par rapport aux reins prélevés de donneurs vivants de même tranche d'âge (P I Terasaki et al. 1997). En effet, la mort cérébrale s'accompagne de changements systémiques et hormonaux conduisant à l'ischémie. De plus, l'immunogénicité du greffon est augmentée par la surexpression de molécules d'adhésion et de cytokines pro-inflammatoires, induisant l'infiltration de leucocytes, et corrélant avec les dysfonctions du greffon (Sánchez-Fructuoso et al. 2007).

La nature de l'organe greffé influe sur son acceptation par le receveur. En effet, en clinique chez l'homme, la tolérance semble beaucoup plus fréquente dans le cas de transplantation hépatique (J Lerut & A Sanchez-Fueyo 2006).

- Les lésions induite par l'ischémie reperfusion

L'ischémie est la diminution de l'apport sanguin dans un organe. Celle-ci entraîne une hypoxie des cellules, générant des radicaux libres et un déficit en ATP (adenosine triphosphate) nécessaire au maintien des potentiels de membrane, ce qui conduit à un œdème (Figura et al. 2009).

La reperfusion est la phase inductrice des lésions dans le greffon dues à l'ischémie. Elle se déroule durant des heures voire des jours après l'ischémie. L'ischémie augmente l'immunogénicité du greffon, par l'activation des cellules endothéliales exprimant des molécules d'adhésion. De plus, la libération de ligands de PRR (pattern recognition receptor), DAMP (damage associated molecular pattern) (P Matzinger 1994), active les cellules de l'immunité innée via les TLR4 (P. Zhao et al. 2009)) et TLR2 (Arslan et al. 2010), principalement les polynucléaires neutrophiles. Ceux-ci sécrètent des cytokines proinflammatoires dans le greffon, créent un environnement pro-coagulant, et un gradient de

chimiokines pour le recrutement d'autres leucocytes. Les lymphocytes Th1 recrutés produisent l'IL-12 et l'IFN- γ responsables des lésions d'apoptose, d'autophagie, et de nécrose dans le greffon.

L'intervalle de temps entre le prélèvement du greffon et sa retransplantation est déterminant pour la fonction et la prévalence du rejet de l'organe.

- Le pronostic du rejet

Les dysfonctions chroniques du greffon sont progressives. Leur cause est mal identifiée. En effet, l'âge du patient, le tabac, l'alcool, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, la mort cérébrale du donneur, l'ischémie/reperfusion de l'organe, sont autant de facteurs contribuant aux dysfonctions chroniques du greffon. D'autre part, leur diagnostic est trop tardif car basé sur les lésions chroniques irréversibles. **C'est pourquoi l'identification de biomarqueurs de tolérance (l'objet de cette thèse) ou de rejet permettrait de protéger le greffon par un traitement adapté.**

Lors d'une transplantation, les réponses immunes de type inné et adaptatif sont activées. L'ischémie suivie de la reperfusion de l'organe transplanté induit des lésions dans le tissu greffé, et libère des ligands activateurs des cellules de l'immunité innée. Celles-ci répondent par la production de molécules pro-inflammatoires et l'activation de cellules dendritiques. Les cellules dendritiques sont à l'interface de l'immunité innée et adaptative. A l'état mature, elles sont capables d'activer les lymphocytes T et B, effecteurs d'une réponse spécifique des alloantigènes du donneur. L'ensemble des réponses cellulaires et humorales conduisent à la destruction de l'organe greffé.

2. LES PHASES CLINIQUES DU REJET DE GREFFE

A. *Le rejet hyperaigu*

Ce rejet survient quelques minutes à quelques heures après la reperfusion de l'organe et ne concerne que les organes vascularisés. Il est déclenché par les anticorps préformés chez le receveur, majoritairement innés et dirigés contre les molécules A et B des groupes sanguins présents à la surface des globules rouges du greffon (PORTER 1965)(Kissmeyer-Nielsen et al. 1966), ou par des anticorps acquis lors de précédentes transfusions sanguines (Mohanakumar et al. 1981), transplantation ou grossesse, et dirigés contre les molécules du

complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées par les cellules endothéliales du greffon (G. M. Williams et al. 1968).

Ces anticorps infiltrent le greffon et activent la cascade du complément. Celui-ci induit la libération de médiateurs inflammatoires, le recrutement de neutrophiles et monocytes, et détruit les cellules cibles (S. Nakashima et al. 2002). L'augmentation de la perméabilité des vaisseaux par rétraction des cellules endothéliales, l'adhésion et l'aggrégation des plaquettes par le facteur de von Willebrand, conduisent à une hémorragie, une thrombose intravasculaire, suivi par une ischémie et la nécrose rapide du greffon.

Ce type de rejet est aujourd'hui maîtrisé, par des tests de « cross-match » vérifiant la présence d'allo-anticorps contre les cellules du donneur, et par la détermination du groupe sanguin et des molécules de HLA (human leucocyte antigen) -A, -B, et -DR particulièrement immunogènes. D'autre part, les patients hyper-immunisés bénéficient de priorité dans l'attribution des greffons, et de traitements de désensibilisation (Antoine 2008). Par la suite, le taux d'anticorps anti-HLA est suivi chez les patients transplantés.

Le rejet hyperaigu est toujours très étudié car il joue un rôle majeur en xénotransplantation.

B. Le rejet aigu

Ce rejet est diagnostiqué par biopsie de l'organe greffé et les lésions observées sont classées selon la classification internationale de Banff. **La prévention du rejet aigu est assurée par les immunosuppresseurs, et survient dans moins de 15% des transplantations chez les patients non immunisés** (Brian J Nankivell & D. R. J. Kuypers 2011).

- Le rejet aigu à médiation cellulaire

Ce rejet survient dans la première semaine suivant l'allogreffe ou durant les premiers mois en absence ou en présence d'immunosuppresseurs (respectivement). Il est induit par les lymphocytes T CD4⁺ Th1 (helper T cell) (Obata et al. 2005) et les lymphocytes T cytotoxiques, activés dans les organes lymphoïdes secondaires contre les antigènes du donneur présentés de manière directe ou indirecte (Pietra et al. 2000)(Popov et al. 1995)(Benham et al. 1995).

Dans un premier temps, les cellules présentatrices d'antigène (CPA) du donneur présents dans le greffon migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (C P Larsen et al. 1990)(Lakkis et al. 2000) et présentent les allo-antigènes aux lymphocytes T du receveur par voie directe. Cependant, les CPA du donneur apportées lors de la greffe ne sont pas renouvelées et

s'épuisent, ce sont donc les CPA du receveur qui infiltrent le greffon pour internaliser et apprêter un allo-antigène et le présenter par voie indirecte aux lymphocytes T (Auchincloss et al. 1993). L'activation des lymphocytes T CD8⁺ par présentation directe est toujours possible par les cellules endothéliales du greffon exprimant les molécules du CMH de classe I (Kreisel et al. 2002). Après leur activation, les lymphocytes T prolifèrent et migrent vers le greffon, selon un gradient de chimiokines produites dans ce contexte proinflammatoire au niveau des cellules endothéliales du greffon (T. Collins et al. 1984; Pober & Cotran 1990). Les lymphocytes Th1 agissent par un mécanisme effecteur non spécifique de type DTH (delayed type hyper sensitivity) en sécrétant des chimiokines pour le recrutement de macrophages et de granulocytes. Les macrophages, activés par l'interferon gamma (IFN- γ) sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ et les signaux de danger (DAMPs) (Kathryn J Wood & R. Goto 2012), ainsi que les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, sécrètent le TNF- α (tumor necrosis factor alpha) et des médiateurs altérant la perméabilité et le tonus des vaisseaux (Xian Chang Li 2010). Par ailleurs, les lymphocytes Th1 favorisent le développement des lymphocytes T cytotoxiques au sein du greffon, induisant des phénomènes cytolitiques par la voie Fas/FasL et la sécrétion de perforine et de granzymes (Kreisel et al. 2002). L'inflammation perdure tant que l'antigène activateur du processus est présent, elle se densifie et conduit à la dégradation totale du greffon.

Bien que leur rôle ne soit pas prépondérant dans ce rejet, l'infiltration de lymphocytes B corrèle avec la sévérité du rejet (Sarwal et al. 2003).

- Le rejet aigu à médiation humorale

Simultanément au rejet aigu cellulaire, des anticorps cytotoxiques du receveur sont érigés contre les antigènes du donneur, principalement contre les molécules de CMH de classe I, mais aussi parfois contre les CMH de classe II, les antigènes du groupe sanguin A et B, les molécules de complexe mineur d'histocompatibilité (CmH) (Sumitran 2000).

Les alloanticorps se fixent sur les cellules endothéliales, activent la voie du complément, les macrophages et les cellules NK (natural killer) qui lysent les cellules du greffon par ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity). Par ailleurs, l'endothélium est activé par l'IFN- γ et l'IL-1 (Saadi et al. 2004) sécrétés par les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, par l'ischémie reperfusion indirectement via la stimulation des plaquettes et l'activation du complément, et par les alloanticorps. L'endothélium entre alors dans un état proinflammatoire et procoagulant, marqué par l'expression de molécules d'adhésion, du facteur tissulaire (TF)

et d'inhibiteurs du plasminogène (Z. E. Holzknicht et al. 2002). Ces mécanismes induisent des lésions hémorragiques, des microthromboses, et l'infiltration de lymphocytes, de macrophages et de neutrophiles en périphérie des vaisseaux différent de l'infiltrat interstitiel observé lors du rejet cellulaire. Ceci conduit à l'ischémie et la nécrose du greffon (G. P. McCarthy & I. S. D. Roberts 2002).

Les IgM et IgG sont rapidement éliminées des surfaces, c'est pourquoi la caractérisation du rejet se fait par la détection de dépôts de C4d sur les biopsies (Mauiyyedi & Robert B Colvin 2002).

Une interaction est observée entre les rejets cellulaire et humoral. Les lymphocytes T CD4⁺ activés aident à l'activation des lymphocytes B (D. J. Steele et al. 1996), alors que les alloanticorps et le complément participent à l'activation des lymphocytes T et des cellules NK, médiateurs du rejet à composante cellulaire (B A Wasowska et al. 2001)(Pratt et al. 2002).

C. Les dysfonctions chroniques du greffon

C'est une destruction lente, progressive et irréversible du greffon, caractérisée par un épaissement fibreux de l'intima des artères et/ou une fibrose interstitielle. Elles sont encore mal définies, cependant les analyses histologiques de biopsies ont permis l'établissement de classifications (classification de Banff pour le rein (Sis et al. 2010) et le foie (Ormonde et al. 1999)). Les dysfonctions chroniques peuvent être sans cause immunologique déterminée. Elles sont dues à l'hypertension chronique, la récurrence de la maladie initiale ou le développement de nouvelles maladies, à des infections bactériennes ou virales, ou encore à la toxicité des immunosuppresseurs (Solez et al. 2007; Pascual et al. 2002; Brian J Nankivell et al. 2003). Elles peuvent avoir une origine immune, impliquant les lymphocytes B et les anticorps et parfois par les lymphocytes T.

- Les dysfonctions chroniques à médiation cellulaire

Ce type de rejet est caractérisé par une fibrose de l'intima des artères associée à un infiltrat de la néo-intima par les lymphocytes T et les macrophages (Solez et al. 2007). En effet, les lymphocytes T CD4⁺ sont induits par voie de présentation indirecte (Fangmann et al. 1992), par les cellules mésenchymateuses du receveur remplaçant les cellules endothéliales du greffon (P. C. Grimm et al. 2001; Y. Kapessidou et al. 2006), alors que les macrophages sont activés par les cytokines présentes au niveau du greffon (Crocker et al. 1996; Jun Yang et al. 2003). Les lymphocytes T et les macrophages ainsi activés produisent les cytokines pro-

inflammatoires IFN- γ , IL-1, et TNF- α . La déviation lymphocytaire de type Th2 et la production d'IL-6, d'IL-1 et de TGF- β (tumor growth factor beta) favorisent la fibrose (W. H. Hancock et al. 1993) (M. Hayashi et al. 1995), pendant que l'augmentation de l'expression de récepteurs aux facteurs de croissance favorise la prolifération des cellules du muscle lisse des vaisseaux jusqu'à l'obstruction des artères et l'ischémie du greffon.

- Les dysfonctions chroniques à médiation humorale

Contrairement à la déplétion des lymphocytes T, le défaut de lymphocytes B chez la souris prévient du rejet chronique, qui peut être restauré par transfert d'alloanticorps spécifiques du donneur (P. S. Russell et al. 1994). En effet, les lymphocytes B, aidés par les lymphocytes T CD4⁺ activés par voie directe (Nadazdin et al. 2011) ou indirecte (J. P. Vella et al. 1997), produisent des anticorps dirigés contre les molécules de CMH du donneur. La fixation de ces anticorps sur les cellules endothéliales du greffon exprimant des molécules de CMH de classe I, active les cellules endothéliales (J. D. Smith et al. 2000; Y.-P. Jin et al. 2002), ainsi que la cascade du complément, dont témoignent les dépôts de C4d au niveau des capillaires (Volker Nickenleit et al. 2002). Les cellules endothéliales ainsi activées sécrètent, d'une part des chimiokines, et recrutent des macrophages et des cellules NK cytotoxiques pour l'endothélium (van den Berg et al. 1998), créant des lésions vasculaires d'endartérite fibroproliférative entraînant la dysfonction du greffon.

Ce type de rejet est caractérisé par la présence d'anticorps anti-donneur circulants et de dépôts de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires (Volker Nickenleit et al. 2002). Cependant un rejet à médiation humorale en absence de C4d serait possible (Mengel et al. 2012).

D. Les limites de l'immunosuppression chronique

Les traitements immunosuppresseurs ont pour but de diminuer la réponse immunitaire du patient afin d'empêcher la réponse immune contre le greffon. Ils ciblent principalement les lymphocytes B et T jouant un rôle prédominant dans le rejet de greffe par l'inhibition de leur activation ou de leur prolifération, ou par leur déplétion (Figure 1).

Bien qu'ils soient de plus en plus efficaces, ces immunosuppresseurs ne préviennent, ni ne traitent, le rejet chronique à long terme ni le rejet humoral aigu. De plus, ils causent un certain nombre d'effets secondaires tels que la néphrotoxicité, l'augmentation des maladies cardiovasculaires, de diabète, de cancers et d'infections.

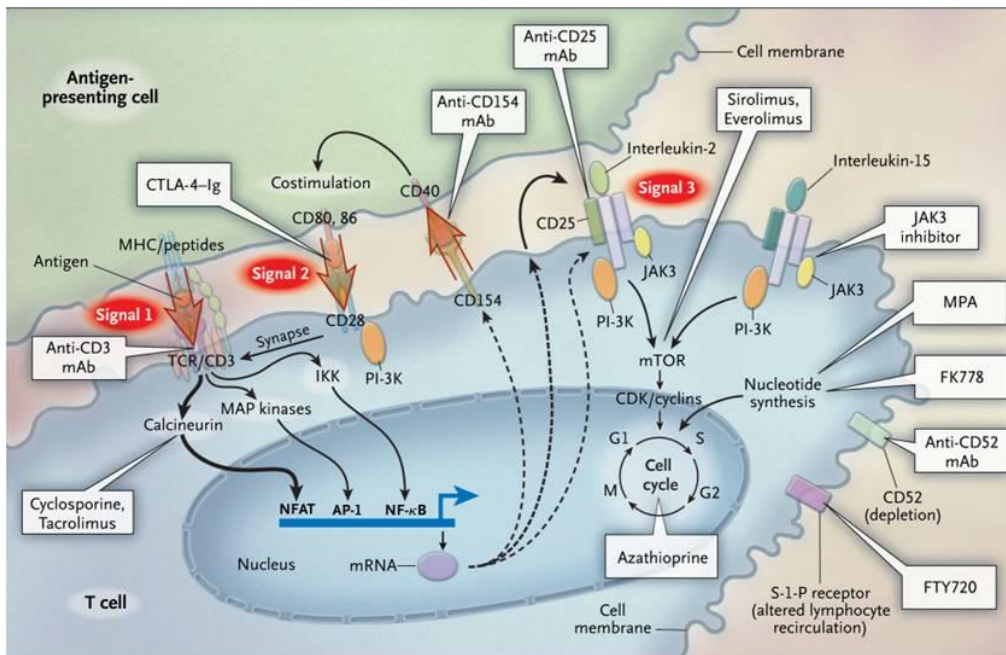


Figure 1. Site d'action de différents immunosuppresseurs ciblant l'activation des lymphocytes T

D'après (Philip F Halloran 2004). La réponse cellulaire T peut être inhibée par le mycophénolate mofétil (MPA), inhibant leur prolifération ou leur activation, par des inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine ou tacrolimus), ou par leur déplétion par l'ATG (anti-thymocytes globulin).

La réponse humorale peut être enrayerée par le mycophénolate mofétil (MPA), inhibiteur de la prolifération des lymphocytes B, par la déplétion des lymphocytes B par des anticorps anti-CD20 ou rituximab (Kohei et al. 2012), par des inhibiteurs du protéasome ou bortezomib, éliminant les plasmocytes (Everly et al. 2010), ou par plasmaphérèse ou l'injection d'IVIg, des IgG de patient sain qui empêchent l'activation des lymphocytes, neutralisent les anticorps circulants, et qui se fixent sur les FcγRIIB inhibiteurs, afin de diminuer les anticorps circulants. D'autre part, des anticorps anti-C5 (eculizumab) permettraient d'inhiber la cascade du complément (Locke et al. 2009).

Nos objectifs sont d'une part, d'identifier des biomarqueurs de tolérance ou de rejet afin d'adapter les doses d'immunosuppresseurs à chaque patient pour être efficace tout en minimisant les effets secondaires ; et d'autre part, d'induire une tolérance spécifique à l'allogreffe chez le patient afin de s'affranchir des immunosuppresseurs.

3. LA REPONSE A MEDIATION CELLULAIRE T

Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CPA) sont capables de reconnaître et capturer des antigènes étrangers au soi. Ce système permet principalement de se défendre contre les infections. Les CPA sont les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les lymphocytes B.

Lors d'une transplantation, les cellules de l'immunité innée sont activées par les signaux de danger libérés par l'ischémie/reperfusion du greffon. Les DC sont à l'interface des réponses immunes innée et adaptative. Les DC du donneur et du receveur présentent des antigènes du donneur aux lymphocytes T et B du receveur qui induisent une réponse immune spécifique contre le greffon.

A. Les cellules dendritiques : présentatrices d'antigènes

Identifiées pour la première fois par Paul Langerhans en 1868, les DC n'ont été caractérisées qu'en 1973 par Steinman et Cohn, dans les organes lymphoïdes secondaires chez la souris. Ces cellules se caractérisent par leurs prolongements cytoplasmiques, leur haute capacité migratoire et leur plus faible capacité d'endocytose comparées aux macrophages (Steinman & Cohn 1973).

Les DC immatures sont une population rare et hétérogène représentant moins de 0.3% des leucocytes dans le sang et 1-2% des leucocytes dans les organes lymphoïdes (Steinman et al. 1997). Il existe de nombreuses sous-populations de DC, chacune présentant une localisation particulière ainsi qu'une spécialisation fonctionnelle. Elles peuvent être classées en DC conventionnelles (cDC), DC plasmacytoïdes (pDC), et DC inflammatoires.

- Les cellules dendritiques conventionnelles

A l'état stationnaire, les progéniteurs des DC migrent, via le sang, de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes et tissus périphériques dans lesquelles ils se différencient en cDC résidentes et migratoires respectivement.

Pour présenter les allo-antigènes aux lymphocytes T, les DC du greffon doivent rejoindre les organes lymphoïdes périphériques (J Banchereau & Steinman 1998) alors que les DC résidentes dans les organes lymphoïdes secondaires doivent atteindre les zones riches en lymphocytes T (Reis e Sousa et al. 1997). En effet, la greffe allogénique de peau, à partir d'une souris donneuse dont les cellules CD11c⁺ expriment la YFP (yellow fluorescent protein), a permis de mettre en évidence la migration des cDC YFP⁺ du greffon vers les ganglions drainants (Celli et al. 2011). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les lymphocytes T CD8⁺ naïfs transférés adoptivement chez le receveur infiltrent les ganglions avant le greffon, soulignant l'activation préférentielle des lymphocytes dans les ganglions (Celli et al. 2011).

Lors d'une transplantation, des antigènes du greffon sont capturés par les DC immatures (Figure 2, n°1). Des signaux de danger (DAMP : damage associated molecular pattern) tels

que les espèces réactives de l'oxygène, les protéines de stress HSP et l'héparine sulfatée libérées lors de l'ischémie/reperfusion du greffon, sont reconnus par les récepteurs PRR (pattern recognition receptor). Ces signaux induisent la migration et la maturation des DC (Figure 2, n°2) qui se traduit par une diminution de l'activité endocytique et de la production de molécules de CMH II dont la durée de vie et le nombre à la membrane plasmique sont augmentés. De plus, les molécules de costimulation B7 et de co-activation ICAM et LFA3 sont fortement exprimées à la membrane. D'autre part, la maturation des DC entraîne l'expression de métalloprotéases qui leur permettent de se détacher de la matrice extracellulaire (Ratzinger et al. 2002). Enfin, elles perdent l'expression des récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires et expriment CCR7, le récepteur de CCL19 et CCL21 (Ohl et al. 2004)(Segura et al. 2012)(R Förster et al. 1999)(Sozzani 2005), ce qui oriente leur migration vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires, où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs (Figure 2, n°3).

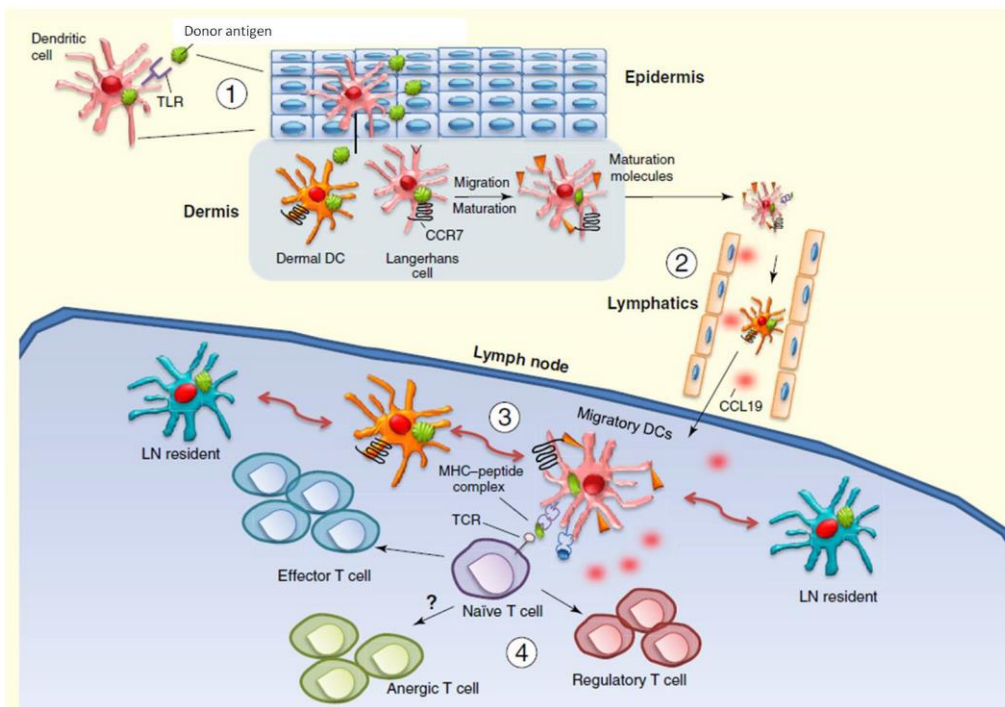


Figure 2. Migration des DC du greffon vers les ganglions lymphatiques drainants
D'après (Buckwalter & Matthew L Albert 2009).

En absence de signaux de danger, les cDC des organes non lymphoïdes migrent de façon permanente vers les ganglions drainants (Geissmann et al. 2010). La présentation d'antigènes du soi en absence de signaux de costimulation aux lymphocytes T autoréactifs permet de maintenir une tolérance périphérique (Ohnmacht et al. 2009).

Les cDC se caractérisent par l'expression du marqueur CD11c. Les population de cDC sont phénotypiquement différentes chez la souris, l'Homme et le rat (J. C. Miller et al. 2012) (Segura et al. 2012). Mon travail de thèse porte sur un modèle de transplantation chez le rat, c'est pourquoi je ne détaillerai pas les populations de DC identifiées chez la souris ou chez l'Homme.

Chez le rat, les cDC sont caractérisées par l'expression du marqueur CD11c⁺, CD103, CMH-II, et la faible production d'interféron alpha (IFN α). Deux sous-populations sont distinguées dans la rate basées sur l'expression du CD4 (B Trinité et al. 2000). Ainsi, les cDC CD4⁺ produisent peu d'IL-12, ne produisent pas de TNF- α (tumor necrosis factor alpha), et induisent des réponses Th1 et Th2. Les DC CD4⁻ se distinguent par une courte durée de vie qui peut être allongée lors d'une stimulation par le CD40 ligand, l'IL-3 ou le GM-CSF, une forte production d'IL-12 et de TNF- α et par l'induction de réponses Th1 (Cécile Voisine et al. 2002). Il faut noter que le CD103 est aussi exprimé sur les lymphocytes T de l'épiderme et de l'épithélium de l'intestin grêle (Brenan & D. J. Rees 2000).

- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes

Les pDC se développent dans la moelle osseuse, circulent dans le sang périphérique et sont présents dans les organes lymphoïdes et les tissus inflammés. Elles expriment fortement les récepteurs TLR7 et TLR9 ce qui leur permet de répondre aux infections virales par une forte production d'IFN de type I (d'où leur nom de natural interferon-producing cells).

Chez la souris, les pDC sont caractérisées par les marqueurs Ly6C⁺B220⁺ CD11c^{low}CD4⁺CD8 α ⁻ CD11b⁻ et produisent l'IL-12 et l'IFN α (Asselin-Paturel et al. 2001). Chez l'Homme, les pDC CD11c⁻ expriment BDCA-2 et BDCA-4 à l'état immature (Dzionek et al. 2000). Chez le rat, Hubert a identifié une population de pDC, qui expriment les marqueurs CMH de classe II, **CD4**, CD5, CD90, CD45R, **CD45RC**, CD161a, CD200, CD172a, CD32, CD86, TLR7 et TLR9 mais pas les marqueurs caractéristiques des cDC CD11b, CD11c, et CD103. Elles produisent l'IFN de type I mais pas l'IL-12p70, le TNF- α , l'IL-1 β , ou l'IL-10 après stimulation (Francois-Xavier Hubert et al. 2004).

La capacité des pDC à stimuler les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques *in vitro* est moindre que celle des cDC chez le rat. Cependant, **leur implication dans la suppression induite par les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} a orienté notre choix quant à leur utilisation dans les expériences de coculture *in vitro* décrites dans la section résultats.** Le traitement des receveurs par un adénovirus recombinant pour la molécule CD40, fusionnée à la partie Fc (fragment cristallisable) d'une immunoglobuline (AdCD40Ig), induit la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Cécile Guillot et al. 2002) par l'induction de lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Les rats traités par AdCD40Ig présentent une accumulation de pDC dans la rate et le greffon en corrélation avec la survie d'allogreffe (vs. rats non-traités). *A contrario*, la cinétique d'expansion des cDC corréle avec la réponse inflammatoire induite par l'allogreffe (X. L. Li et al. 2010). Par ailleurs, l'interaction des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} et des pDC semble privilégiée *in vivo* (X. L. Li et al. 2010). Ces observations sont confortées par des expériences *in vitro*, dans lesquelles les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} de rats greffés et traités par AdCD40Ig inhibent plus fortement la réponse lymphocytaire T lorsqu'ils sont en présence de pDC vs cDC allogéniques (X. L. Li et al. 2010). Les pDC ont donc été utilisées préférentiellement pour étudier les mécanismes de suppression des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} dans cette thèse.

- Les cellules dendritiques inflammatoires

L'étude des DC humaines est essentiellement basée sur des DC générées *in vitro*. Ainsi, les cellules CD34⁺ de moelle osseuse ou du sang de cordon ombilical peuvent, en présence de GM-CSF (granulocyte and macrophage-colony stimulating factor) et de TNF α , se différencier en DC proches des DC interstitielles ou des cellules de Langerhans, appelées BMDC (bone marrow-derived dendritic cells) (Caux et al. 1996). D'autre part, les monocytes du sang peuvent se différencier en cellules appelées MODC (monocyte-derived dendritic cells), en présence d'IL-4 et de GM-CSF (Sallusto & Lanzavecchia 1994).

B. L'activation des lymphocytes T allo-réactifs

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T et les CPA interagissent non spécifiquement en premier lieu par des molécules d'adhérence. Cette interaction amorce une seconde interaction, cette fois spécifique, entre le TCR et le complexe CMH/peptide antigénique. Si le TCR ne reconnaît pas le complexe, les cellules se séparent rapidement. Dans le cas contraire, une réponse immune est déclenchée. L'activation des lymphocytes T nécessite trois signaux : le premier signal dépend de l'interaction spécifique entre le TCR

d'un lymphocyte T et le CMH/antigène d'une DC ; le deuxième signal résulte de l'interaction entre les molécules de costimulation exprimées par la CPA mature et les récepteurs présents sur le lymphocyte T ; enfin, le troisième signal est induit en réponse aux deux précédents par la sécrétion de cytokines (Figure 3).

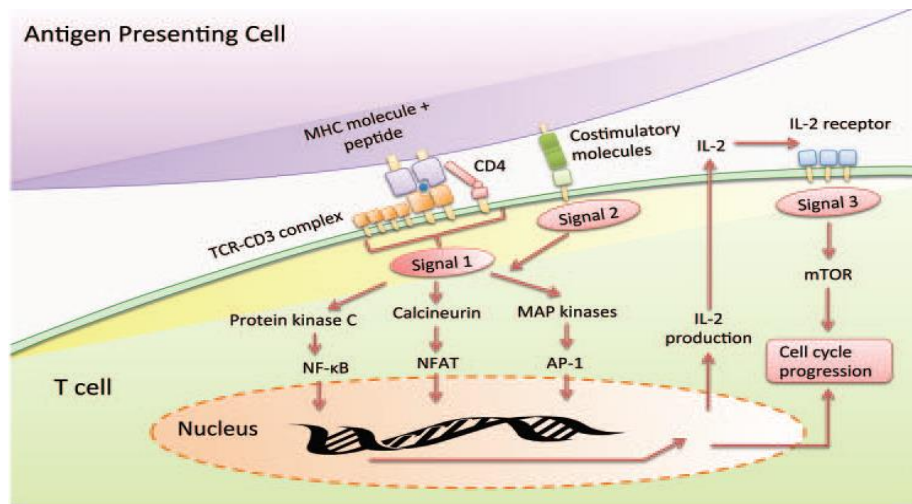


Figure 3. Les lymphocytes T nécessitent 3 signaux d'activation.
D'après Wood 2012 (d'après Halloran 2004)

1. Signal 1 : le signal antigénique

Le TCR $\alpha\beta$ est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β dont le réarrangement des régions V, D (uniquement pour la chaîne β) et J du domaine variable du TCR, associés à une région constante C, permet une large diversité du répertoire de reconnaissance antigénique. Chaque chaîne est ancrée dans la membrane, mais le TCR n'a pas de domaine intra-cytoplasmique. Le signal est donc transmis par les molécules du complexe CD3 /TCR. Celles-ci sont composées de 5 chaînes polypeptidiques invariantes, δ , γ , ϵ , ζ , et η , s'associant selon 3 dimères. Le complexe TCR-CD3 interagit avec le complexe CMH-antigène. D'autres corécepteurs, CD4 ou CD8, interagissent avec les parties invariantes du CMH et déterminent la classe de CMH reconnue par le lymphocyte.

Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ sont étroitement régulés par les CPA. Ces dernières appréhendent des allo-antigènes et les présentent sur des molécules de CMH de classe I et II en présence de molécules de costimulation afin d'activer les lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ respectivement. Chez l'Homme, les CMH sont appelés HLA (human leucocytes antigènes) I d'isotype A, B, ou C, et HLA II d'isotypes DP, DQ, DR, et chez le rat, les CMH I et II

correspondent aux RT1 A, B et D. Les rats Lewis utilisés dans notre modèle d'allotransplantation cardiaque sont des rats Lewis 1A receveurs RT1A^{a/a} RT1B^{a/a} RT1D^{a/a}, et des rats Lewis 1W donneurs RT1A^{u/u} RT1B^{u/u} RT1D^{u/u}. Les CPA du donneur et du receveur présentent les allo-antigènes aux lymphocytes T selon deux systèmes d'allo-reconnaissance : la présentation directe et la présentation indirecte (Gould & Auchincloss 1999). Les deux voies (directe et indirecte) peuvent être impliquées dans le rejet d'allogreffe de façon simultanée ou non. Cependant, certaines études ont également proposé l'existence d'une troisième voie de reconnaissance de l'antigène, la voie semi-directe (Tableau 2).

CPA	CMH	classe	Ag donneur	voie	présentation	aux lymphocytes	persistance après la greffe
donneur	donneur	I	X	endogène	directe	TCD8	+++
		II		exogène		TCD4	+
receveur	receveur	I	CMH I	croisée	indirecte	TCD8	+++
			CMH II				+
	II	CMH I	exogène	TCD4		+++	
		CMH II				+	
donneur		I	X	trogocytose	semi directe	TCD8	+++
		II				TCD4	+

Tableau 2. Résumé des présentations des antigènes du donneur par les DC aux lymphocytes T du receveur en ce qui concerne le Complexe Majeur d'Histocompatibilité.

- La présentation directe des alloantigènes aux lymphocytes T

Les DC du donneur, activées par l'inflammation liée à la chirurgie, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur et présentent des peptides sur des molécules intactes de CMH aux lymphocytes T allo-réactifs.

La présentation directe a été mise en évidence par Talmage et al. Cette équipe a montré que la survie d'allogreffe de thyroïde chez la souris est prolongée par déplétion préalable des leucocytes du greffon, alors que l'injection des DC du donneur restaure le rejet (Talmage et al. 1976).

Pendant leur développement, les lymphocytes T sont sélectionnés positivement s'ils reconnaissent un peptide sur un CMH du soi présenté par les cellules épithéliales corticales dans le thymus (*la sélection positive des thymocytes est développée dans la section II.1.A. de l'introduction*). Or, 5-10% des lymphocytes T périphériques sont capables de se différencier

en cellules T cytotoxiques lorsqu'ils rencontrent un CMH allogénique. Ceux-ci confondent les complexes CMH allogénique-peptide avec les complexes CMH du soi – peptide du non-soi (Lindahl & D. B. Wilson 1977) (Figure 4).

D'après Lechler, les lymphocytes T allo-réactifs pourraient répondre aux allo-antigènes qui partagent des épitopes avec des peptides endogènes, ou bien pourraient reconnaître directement la molécule de CMH allogénique elle-même (R I Lechler et al. 1990). Cette orientation serait déterminée par le degré d'homologie entre les CMH du donneur et du receveur. Obst montre, en effet, que plus les CMH du donneur et du receveur sont proches, plus les lymphocytes T allo-réactifs sont spécifiques du peptide allogénique et pas du CMH lui-même (Obst et al. 2000).

La présentation des antigènes par voie directe jouerait un rôle majeur (M Y Braun et al. 1993)(Pietra et al. 2000). Alors que le non-renouvellement des CPA du donneur limite la présentation directe au rejet aigu, les cellules endothéliales (CMH I⁺) permettraient de continuer à activer les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques allogéniques (Kreisel et al. 2002) (Tableau 2).

Le lieu d'activation des lymphocytes T par voie directe est controversé. La présence précoce des lymphocytes T activés par voie directe, dans le greffon, et tardive dans les ganglions drainants, suggère que l'activation des lymphocytes T par voie directe pourrait avoir lieu hors des organes lymphoïdes secondaires (Baratin et al. 2004). Cependant, l'allogreffe cardiaque chez la souris déficiente pour les organes lymphoïdes secondaires est tolérée, suggérant l'absence d'activation des lymphocytes T dans le greffon (Lakkis et al. 2000).

- *La présentation indirecte des alloantigènes*

Dans la présentation indirecte, les lymphocytes T du receveur reconnaissent des peptides dérivés du CMH ou du complexe mineur d'histocompatibilité (CmH) du donneur présentés par les CPA du receveur (Figure 4).

En effet, les rats préalablement injectés avec un peptide dérivant de la molécule de CMH du donneur ou du CmH (D. M. Richards et al. 2004) rejettent plus rapidement l'allogreffe de peau (Fangmann et al. 1992) (Figure 4). Les lymphocytes T allo-réactifs sont majoritairement des lymphocytes T CD4⁺. Auchincloss a montré que l'allogreffe de peau d'une souris CMH II^{-/-} chez une souris déplétée en CD8⁺ est rejetée. Les lymphocytes T CD4⁺ du receveur ont donc été activés par les CPA du receveur contre les antigènes du donneur (Auchincloss et al. 1993). D'autre part, les cellules apoptotiques du donneur peuvent être capturées par les DC du

receveur (mais pas les macrophages) (M L Albert et al. 1998), qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin de présenter les allo-antigènes sur des CMH I par présentation croisée aux lymphocytes T CD8⁺ (Valujskikh et al. 2002) (Celli et al. 2011). En effet, une greffe allogénique de peau, issue d'une souris donneuse B2m^{-/-} (CMH I^{-/-}) chez une souris B2m^{+/+} (CMH I^{+/+}), puis sa retransplantation chez un receveur B2m^{-/-} (CMH I^{-/-}), induit la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (transférés adoptivement) dans les ganglions drainants la greffe. Cette expérience a permis de mettre en évidence l'infiltration du greffon par les DC (CMH I^{+/+}) du receveur lors de la première greffe, et leur migration vers les ganglions drainants pour activer les lymphocytes T CD8⁺ du receveur (CMH I^{-/-}) lors de la retransplantation (Celli et al. 2011).

La réponse anti-donneur par voie de présentation directe est plus importante dans la phase précoce suivant la transplantation et persiste tant que le greffon contient des CPA du donneur, alors que la réponse anti-donneur par voie de présentation indirecte intervient surtout plus tardivement et persiste avec le greffon (Tableau 2). En effet, la présentation indirecte a été corrélée avec le rejet aigu chez le rongeur (Fangmann et al. 1992) et l'Homme (Z Liu et al. 1996) mais surtout avec le rejet chronique (G Benichou 1999). De plus, la fréquence des lymphocytes T spécifiques du donneur, activés par la voie indirecte de présentation, augmente au cours du temps chez les patients présentant un rejet chronique après une greffe de cœur, de foie ou de rein (Hornick et al. 2000; J. P. Vella et al. 1997; Z Liu et al. 1996).

La présentation indirecte par les lymphocytes B tient un rôle important dans le rejet aigu d'allogreffe. La survie de l'allogreffe de cœur chez des souris déficientes pour l'expression de CMH de classe II sur les lymphocytes B est prolongée, car les receveurs ne produisent pas d'allo-anticorps, et les lymphocytes T CD4⁺ présentent un défaut d'activation (Noorchashm et al. 2006)(Q. Mao et al. 2007).

La présentation indirecte aurait lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Ochando a remarqué que seule la présentation indirecte persiste dans les ganglions lymphatiques (mais pas dans la rate) des souris tolérantes. Ceci suggère que la présentation indirecte dans les ganglions est importante pour la tolérisation périphérique (Ochando et al. 2006).

- *L'allo-présentation semi-directe*

Une molécule intacte de CMH du donneur peut être captée par les CPA du receveur. Ce processus d'échange de molécules membranaires entre deux cellules en contact est appelé trogocytose. **La présentation du CMH du donneur par les CPA du receveur aux**

lymphocytes T du receveur est qualifiée de semi-directe (Figure 4). Pour qu'une régulation soit le plus efficace, outre les phénomènes de suppression de proximité, les Tregs et les T effecteurs doivent être activés par la même CPA. En transplantation, le fait que les Tregs $CD4^+$ puissent réguler les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (reconnaissant des CMH I du donneur sur les cellules du greffon) témoigne de l'existence de l'allo-présentation semi-directe (Shuiping Jiang et al. 2004). Il en est de même pour l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ nécessitant l'aide des lymphocytes T $CD4^+$ (R. S. Lee et al. 1994). Enfin, ceci permet aux molécules de CMH de classe I du donneur d'être toujours présentées aux lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques même après disparition des CPA du donneur (Tableau 2).

Les cellules capables d'allo-présentation semi-directe sont les DC, les cellules endothéliales mais aussi les lymphocytes T. En effet, il est montré que les DC de souris co-cultivées avec des DC allogéniques ou des cellules endothéliales acquièrent des complexes CMH-antigène *in vitro*, phénomène ayant lieu pendant leur migration vers les ganglions lymphatiques *in vivo* (O. B. Herrera et al. 2004). De plus, Tsang a montré que les lymphocytes T peuvent acquérir des complexes CMH-peptides par co-culture avec des CPA allogéniques, et les présenter efficacement aux lymphocytes T naïfs syngéniques (Tsang et al. 2003).

Les CPA peuvent capter les complexes par contact cellulaire. Par exemple, l'injection d'exosomes de DC du donneur, portant des molécules de CMH de classe I, combiné au traitement par le LF15-0195 pour bloquer la maturation des DC, a permis d'induire une tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Les exosomes ont donc été captés par les CPA du receveur, qui, à l'état semi mature, ont présenté les antigènes du donneur dans un contexte tolérogène (Pêche et al. 2006). D'autre part, lors d'une rencontre entre la cellule T et une CPA, les complexes CMH-peptides se regroupent au niveau du site de contact, et peuvent être endocytés par le lymphocyte T (J. F. Huang et al. 1999). Les lymphocytes T présentant une molécule de CMH du donneur par présentation croisée peuvent induire l'apoptose et l'anergie des lymphocytes T, limitant ainsi l'expansion clonale (Tsang et al. 2003).

L'importance relative de ces mécanismes dans l'activation du répertoire allo-réactif et son implication dans le rejet de greffe ne sont pas encore connues.

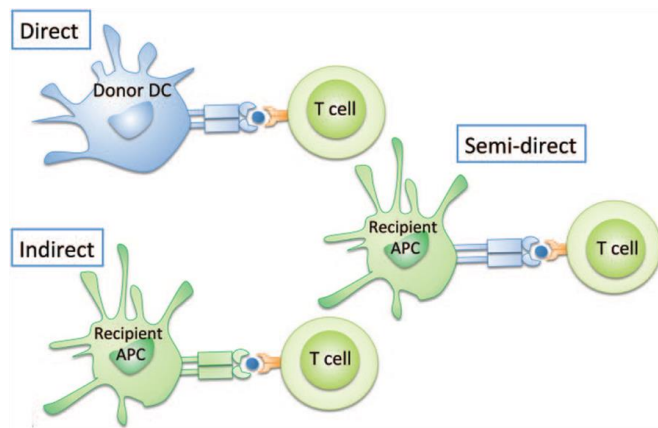


Figure 4. Les voies de reconnaissance directe, indirecte et semi-directe des alloantigènes par les lymphocytes T.

D'après (Golshayan et al., 2007)

2. Signal 2 : les signaux de costimulation

Le signal de costimulation fait intervenir trois types de molécules. Les intégrines exprimées par les lymphocytes T permettent l'adhésion optimale entre le lymphocyte T et la CPA et la formation de la synapse immunologique, telles que LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) liant ICAM (intracellular adhesion molecule) sur les CPA. Les molécules accessoires stabilisent l'interaction lymphocyte T/CPA, telles que CD2 liant LFA-3 des CPA. Enfin, les molécules de costimulation, exprimées par les lymphocytes T, amplifient le signal transduit par le complexe TCR-CD3 et transduisent elles-mêmes un signal indépendant du CD3 (Bjorndahl et al. 1989). Elles sont réparties selon 4 familles : la superfamille des immunoglobulines, celle des récepteurs au TNF (TNF-R pour Tumor Necrosis Factor Receptor) dont fait partie le récepteur CD40, la famille des intégrines, et la famille TIM (T cell immunoglobulin- and mucin-containing-domain) (Tableau 3). En présence d'un signal de costimulation positif, le lymphocyte T activé répond en premier lieu par la synthèse d'IL-2. En l'absence de ce signal, l'activation est incomplète et les lymphocytes T deviennent anergiques (Gimmi et al. 1993), anergie qui peut être levée par l'apport exogène d'IL-2, composant majeur du signal 3 (Beverly et al. 1992). C'est pourquoi de nombreuses stratégies thérapeutiques ciblent les molécules de costimulation en transplantation.

	Récepteur	Ligand	Effet
Superfamille des Ig	CD28	CD80<CD86	Activateur
	CTLA-4	CD80>CD86	Inhibiteur
	ICOS	ICOSL	Activateur
	PD-1	PD-L1/PD-L2	Inhibiteur
	B7H3	?	Inhibiteur
	B7H4	BTLA(?)	Inhibiteur
	LAG-3	MHC II	Inhibiteur
Superfamille du TNFR	CD40	CD40 L	Activateur
	4-1BB	4-1BBL	Activateur
	OX40	OX40L	Activateur
	CD27	CD70	Activateur
	CD30	CD30L	Activateur
	BTLA	HVEM	Inhibiteur
	HVEM	LIGHT	Activateur
	TRANCE	RANK	Activateur
	GITR	GITRL	Activateur
Intégrines	LFA-1	ICAM-1	Activateur
	VLA-4	VCAM-1	Activateur
TIM	TIM-1	TIM-4	Activateur
	TIM-3	galectin-9	Inhibiteur

Tableau 3. Liste non exhaustive des voies de costimulation des lymphocytes T.

- *La voie de costimulation CD40/CD40L*

La molécule CD40 est une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des récepteurs au TNF. Elle est exprimée sur les cellules endothéliales des vaisseaux (D Hollenbaugh et al. 1995), les DC activées (McLellan et al. 1996), les monocytes/macrophages, les plaquettes (Inwald et al. 2003), et les lymphocytes B (Kehry 1996) (Tableau 4).

Le CD40 ligand (CD40L ou CD154) appartient à la famille des TNF et existe sous forme membranaire et soluble, activant les cellules CD40⁺ à distance telle une cytokine (Ludewig et al. 1996). Le CD40L est exprimé par les lymphocytes T CD4⁺ activés, mais aussi par les basophiles, les eosinophiles (Gauchat et al. 1995), les DC du sang (L. M. Pinchuk et al. 1996), les cellules endothéliales et les macrophages (Mach et al. 1997), et les lymphocytes B

(Grammer et al. 1995) (Tableau 4). En effet, le CD40L est exprimé par les cellules B du centre germinatif, principalement par les cellules B mémoires mais aussi par les cellules B naïves, les plasmoblastes, mais pas par les plasmocytes (Grammer et al. 1999).

Cell types	CD40		CD40L		
	Resting	Activated	Resting	Activated	Forms of CD40L
CD4 ⁺ T cells	–	+++	+	+++	Membrane, soluble, cytoplasmic
CD8 ⁺ T cells	–	+++	+	+++	Membrane
B cells	+++	+++	++	+++	Membrane
DCs	–	+++	+	++	Membrane
ECs	+	+++	+	+++	Membrane
Platelets	++	+++	–	++	Membrane, soluble, cytoplasmic
Macrophages	+	+++	+	+++	Membrane

Tableau 4. Expression du CD40 et du CD40L par les cellules immunitaires.
D'après (X.-L. Li et al. 2008)

Le blocage de l'interaction CD40-CD40L a permis de mettre en évidence son rôle pro-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. Chez la souris, les anticorps anti-CD40L se sont révélés efficaces pour prévenir de maladies auto-immunes telles que l'arthrite induite par le collagène de type II (Durie et al. 1993), le lupus systémique érythémateux (Mohan et al. 1995), ou l'encéphalomyélite expérimentale (Gerritse et al. 1996). Dans le domaine de la transplantation d'allogreffe de moelle osseuse chez la souris, il a été montré que le traitement des receveurs par des anticorps bloquant CD40L prévient de la réponse immune du greffon contre l'hôte (GVHD Graft Versus Host Disease) (Durie et al. 1994). D'autre part, l'altération du gène codant le CD40L peut induire une perte de la réponse anticorps dépendante des lymphocytes T, et une absence de lymphocytes B mémoires et d'IgG (immunoglobuline G), IgA et IgE circulantes, constatée chez les patients atteints du syndrome hyper-immunoglobulinémie de type IgM (Notarangelo et al. 1996).

L'interaction CD40-CD40L a un rôle important dans la réponse lymphocytaire B (Tableau 5). Le blocage de cette interaction par le récepteur CD40-Fc soluble inhibe la réponse des lymphocytes B humains (Fanslow et al. 1992), et empêche les lymphocytes B murins d'entrer dans le cycle cellulaire, de proliférer, et de se différencier en réponse aux lymphocytes Th1 et Th2 activés dans le centre germinatif des follicules (R J Noelle et al. 1992). En effet, des expériences chez les souris CD40^{-/-} montrent que l'interaction CD40-

CD40L est nécessaire pour la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T « helper » et pour la réponse anticorps par les lymphocytes B (Kawabe et al. 1994), mais aussi pour la génération de cellules B mémoires (van Essen et al. 1995) par stimulation de l'activité télomérase (B. T. Hu et al. 1997). Ces observations ont été confirmées par le blocage du CD40L par des anticorps (Grammer et al. 1999). Le CD40 permet aussi la production d'IL-6, IL-10 et TNF- α , ainsi que l'expression de molécules d'adhésion, de récepteurs de costimulation (B7-1 (Ranheim & Kipps 1993), B7-2, ICAM, CD23) et de Fas par les lymphocytes B.

De même, **l'interaction CD40-CD40L a un rôle important dans la réponse lymphocytaire T** (Tableau 5). En effet, les souris CD40L^{-/-} présentent un défaut de réponse lymphocytaire Th1, qui résulterait d'un défaut de production d'IL-12 par les CPA (K. A. Campbell et al. 1996). L'interaction CD40-CD40L agit en synergie avec l'IL-12 pour la production d'IFN- γ par les lymphocytes T humains stimulés de façon polyclonale, ainsi que la production d'IL-2 par les lymphocytes Th1, et d'IL-4, IL-5 et d'IL-10 par les lymphocytes Th2 (X. Peng et al. 1996). D'autre part, les signaux induits par la liaison du CD40 activent l'expression de molécules d'adhésion par les lymphocytes T (Barrett et al. 1991).

Par ailleurs, **le CD40 permet la prolifération et la différenciation de progéniteurs hématopoiétiques CD34⁺ en DC fonctionnelles** (Flores-Romo et al. 1997), et reste exprimé sur les monocytes et DC activés (McLellan et al. 1996; Mach et al. 1997) (Tableau 5). L'interaction du CD40 des monocytes et des DC avec un ligand permet leur survie, induit l'expression d'IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, et d'IL-12 favorisant la différenciation de lymphocytes Th1 (Grewal & R A Flavell 1996), induit l'expression de TNF- α , MIP1 α (macrophage inflammatory protein 1 alpha), MMP (matrix metalloproteinase) (Malik et al. 1996), et stimule l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86, LFA-3, ICAM-1.

Enfin, l'interaction de CD40 avec son ligand exprimé par les lymphocytes T, induit **l'activation des cellules endothéliales** au site de l'inflammation, permettant l'adhésion des leucocytes par la E-selectin et la réponse inflammatoire (D Hollenbaugh et al. 1995) (Tableau 5).

L'expression du CD40L par les plaquettes activées est associée à la formation de thrombus (Henn et al. 1998) stabilisé par la liaison du CD40L à l'intégrine alpha2beta3 (André et al. 2002), et à l'activation de cellules endothéliales, sécrétrices de molécules

d'adhésion et de chimiokines pour le recrutement de leucocytes sur le site inflammé (Henn et al. 1998). Les plaquettes expriment par ailleurs le CD40, dont la transduction d'un signal activateur favorise l'adhésion et le recrutement des leucocytes au site de thrombose (Inwald et al. 2003).

type cellulaire	conséquences fonctionnelles de l'activation CD40 in vitro
Pré-B	prolifération, expression de CD23
LB naïfs matures	prolifération, différenciation, commutation isotypique
LB du centre germinatif	prolifération, différenciation, expression de Fas, sélection des B
plasmocytes	production d'IL-6
lymphocytes T	prolifération, expression de CD25, production de cytokines
monocytes	sécrétion de cytokines, production de NO et MMP, activité procoagulantes des monocytes
DC	croissance et survie, expression des molécules de costimulation, augmentation de la production de cytokines
précurseurs CD34+	prolifération, développement des DC
eosinophiles	augmentation de la survie, production de GM-CSF
cellules endothéliales	augmentation de CD54, CD62, CD106

Tableau 5. Conséquences fonctionnelles de l'activation de la voie CD40 sur différents types cellulaires.

D'après (van Kooten & J Banchemau 1997).

L'importance de la voie CD40 dans les réponses cellulaires B et T et dans l'activation des CPA et des cellules endothéliales, impliquées dans les rejets aigu et chronique d'allogreffe suscite un intérêt thérapeutique.

- *Le blocage de la voie CD40/CD40L en transplantation*

L'interaction du CD40L exprimé par les lymphocytes T avec le CD40 présent sur les CPA induit un signal de costimulation nécessaire pour l'activation des lymphocytes T naïfs, après l'engagement du TCR avec le complexe CMH/peptide. Cette interaction induit la production de cytokines par les CPA telles que l'IL-12, et stimule l'expression des molécules de costimulation CD80, CD86, ICAM-1, et la sécrétion de cytokines immunorégulatrices par les lymphocytes T et leur apoptose (P. J. Blair et al. 2000). C'est pourquoi **le blocage des voies de costimulation pourrait prévenir l'activation des cellules T et induire une immunosuppression spécifique d'antigènes.**

Le blocage de l'interaction CD40-CD40L par des anticorps dirigés contre le CD40L peut prévenir du rejet d'allogreffe dans des modèles de transplantation chez le rongeur et le primate non-humain. Chez la souris, le traitement par des anticorps anti-CD40L permet la

survie indéfinie d'allogreffes d'îlots pancréatiques (D. C. Parker et al. 1995), et diminue l'activation des cellules endothéliales, selon l'expression de la E-selectine, la P-selectine, et ICAM-1, et diminue l'athéropathie lors d'une allogreffe cardiaque chez la souris (C. Y. Wang et al. 2002). Chez le primate non-humain, les anti-CD40L humanisés préviennent du rejet aigu d'allogreffe de rein (A D Kirk et al. 1999), et permettent la survie d'allogreffes d'îlots pancréatiques dans le foie et l'indépendance à l'insuline à long terme chez le singe rhesus et le babouin (N S Kenyon, Chatzipetrou, et al. 1999) (N S Kenyon, Fernandez, et al. 1999).

Le blocage de l'interaction CD40-CD40L inhibe la fonction des lymphocytes T effecteurs du rejet selon des mécanismes controversés. Pour Parker et al., le traitement par anti-CD154 empêcherait les lymphocytes T du receveur d'induire des signaux de costimulation dans les lymphocytes du donneur ou les îlots greffés (D. C. Parker et al. 1995). De la même manière, la survie à long-terme de l'allogreffe de coeur chez la souris CD40L^{-/-} serait liée à une diminution de l'expression des molécules de costimulation B7 et CD28 par les cellules infiltrant le greffon et de l'IFN- γ , TNF- α et IL-10 (mais pas IL-4) (K. Shimizu et al. 2000). Cependant, une autre étude utilisant les anticorps anti-CD40L ne montre pas de changement dans l'expression de B7, IL-2, IFN- γ , IL-10 ou IL-4, et suggère un effet des anticorps sur la fonction des lymphocytes T plutôt que sur leur activation (C P Larsen, D. Z. Alexander, et al. 1996). Pour Monk et al., les anti-CD40L prolongent la survie de l'allogreffe de peau chez la souris par des mécanismes dépendant du complément et des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, suggérant la déplétion de lymphocytes T activés plutôt que le blocage des voies de costimulation (Monk et al. 2003a).

Le défaut d'activation des lymphocytes B par blocage de l'interaction CD40-CD40L diminue l'allogénicité des lymphocytes B. En effet, le transfert de lymphocytes B allogéniques chez la souris induit une réponse immune lymphocytaire T spécifique qui peut être diminuée par la coadministration d'anticorps bloquant le CD40L ou par la déficience en CD40L du receveur (Buhlmann et al. 1995). Cependant, d'autres études montrent que la survie de l'allogreffe cardiaque chez la souris traitée par des anticorps anti-CD40L (C P Larsen, D. Z. Alexander, et al. 1996) ou de l'allogreffe cardiaque chez le rat traité par un adénovirus recombinant pour la molécule de CD40 fusionnée à la partie Fc d'une immunoglobuline (AdCD40Ig) (Cécile Guillot et al. 2002)(Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007), n'est pas induite par les lymphocytes B.

Le blocage de l'interaction CD40/CD40L ne prévient pas du rejet induit par les lymphocytes T CD8⁺. L'infection de souris par *Leishmania* accélère le rejet de greffe de peau induit par les lymphocytes T CD8⁺ allo-réactifs activés par réaction croisée, et rend inefficace le traitement par des anticorps anti-CD40L (Pantenburg et al. 2002) (Forman et al. 2002). En effet, le blocage de l'interaction CD40-CD40L n'a pas d'effet sur l'activation, la prolifération, ou la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ médiateurs du rejet d'allogreffe (N D Jones et al. 2000). Zhai et al. ont montré que seuls les lymphocytes T CD8⁺ naïfs dépendent de signaux induits par l'interaction CD40/CD40L pour leur différenciation en lymphocytes T cytotoxiques, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺ mémoires préalablement activés (Zhai et al. 2002). Ainsi, le blocage de cette interaction n'est efficace pour prévenir du rejet d'allogreffe de peau (K Honey et al. 1999) ou de cœur (Ensminger et al. 2000) chez la souris qu'en association avec des anticorps anti-CD8⁺.

Cependant, **le blocage de l'interaction CD40/CD40L génère des lymphocytes T régulateurs (Tregs) CD4⁺CD25⁺.** En effet, la greffe de peau chez la souris, dans un contexte d'incompatibilité des antigènes mineurs (CmH), est tolérée chez le receveur déplété en lymphocytes T CD8⁺, thymectomisé, et traité par des anticorps anti-CD40L. De plus, le transfert de splénocytes de souris naïves, syngéniques du receveur, stimulées par une seconde greffe de peau, n'induit pas de rejet, sauf si les lymphocytes T du receveur sont déplétés les jours suivants cette greffe. Leur déplétion plus tardive permet cependant la tolérance d'une troisième greffe. Ainsi, le traitement par des anticorps anti-CD8 et anti-CD40L a induit des lymphocytes T CD4⁺ régulateurs chez le receveur, capables de convertir de nouveaux Tregs par tolérance infectieuse (L Graca et al. 2000). De plus, le blocage du CD40L augmente l'activité immunosuppressive des Tregs CD4⁺CD25⁺ (Jarvinen et al. 2003), alors capables de prévenir le rejet induit par les lymphocytes T CD8⁺ dans des modèles d'allogreffe de peau et de cœur chez la souris (Andre van van Maurik et al. 2002) et de cœur chez le rat (Masunaga et al. 2005).

Des traitements par transfert de gènes ont donc été développés, afin de bloquer de manière plus efficace et à long-terme l'interaction CD40-CD40L. Ainsi, le traitement par administration d'un AdCD40Ig permet la survie à long-terme de l'allogreffe de peau (M. Nomura et al. 2002), et de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Cécile Guillot et al. 2002) via la génération de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007).

La tolérisation des lymphocytes T CD8⁺ dépend de l'état de maturation des DC. Cependant, les avis sont controversés. Par exemple, pour Albert, la maturation des DC via la liaison du CD40 est nécessaire pour tolérer les lymphocytes T CD8⁺ (M L Albert et al. 2001), alors que pour Grohmann, la ligation du CD40 abroge le potentiel tolérogénique des DC lymphoïdes (U Grohmann et al. 2001). Toutefois, le traitement de macaques par un AAVCD40Ig n'a pas permis de prolonger la survie de l'allogreffe rénale (Angin et al. 2012).

Des stratégies thérapeutiques associent un second traitement pour augmenter l'efficacité du blocage de la voie CD40/CD40L (Tableau 6).

Le blocage de la voie de costimulation de B7 renforce l'effet bénéfique du blocage de la voie CD40/CD40L sur l'allogreffe. L'administration simultanée d'anticorps anti-CD40L et d'une protéine de fusion CTLA4-Ig (portion extracellulaire du cytotoxique T lymphocyte antigen 4 fusionné au fragment Fc d'une IgG) prévient de façon synergique le rejet chronique d'allogreffe cardiaque, prolonge la survie d'allogreffe de peau chez la souris (C P Larsen, Elwood, et al. 1996), et empêche le rejet d'allogreffe chez le singe rhesus (A D Kirk et al. 1997). De même, l'induction de l'expression de CTLA-4Ig et de CD40Ig par thérapie génique améliore la survie d'allogreffe de tissu composite (Kanaya et al. 2003) et de coeur chez le rat (K. Yamashita et al. 2003). La combinaison des anticorps anti-CD40L et anti-CD86 induit la tolérance de l'allogreffe cardiaque chez la souris via des lymphocytes T régulateurs CD4⁺ (Coenen et al. 2006). Le traitement par des anticorps anti-CD28 renforce la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat induite par l'AdCD40Ig en modifiant les mécanismes de régulation (Guillonnet, Séveno, et al. 2007).

Par ailleurs, le traitement par les anti-CD40L combiné à **la transfusion du sang du donneur** prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque chez la souris, corrélant avec une inhibition des cytokines de type Th1 (IL-2 et IL-12) et une augmentation des cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-10), ainsi qu'une diminution de l'expression de la molécule de costimulation CD80 (W W Hancock et al. 1996). Les mécanismes de régulation seraient indépendants de CD80 (W W Hancock et al. 1996)(Niimi et al. 2001). Cependant, l'effet peut être abrogé par le blocage de l'IFN- γ ou de CTLA-4 (T G Markees et al. 1998).

Le blocage de la voie CD40-CD40L peut être combinée **aux immunosuppresseurs**. Le traitement par la ciclosporine A, un inhibiteur des calcineurines, limite l'expression du CD40L (Fuleihan et al. 1994) mais n'empêche pas l'expression du récepteur CD40 par les lymphocytes T humains (van Rijen et al. 2002). Bien qu'une étude ne montre pas d'effet

majeur sur la survie de l'allogreffe par l'addition de ciclosporine A (Bartlett et al. 2003), celle-ci abroge la survie de l'allogreffe de peau chez la souris prolongée par des anticorps anti-CD40L et par la protéine de fusion CTLA-4Ig, alors que l'addition de rapamycine renforce la tolérance en induisant une apoptose massive des lymphocytes T alloréactifs (Y Li et al. 1999). De même, la rapamycine permet la survie à long terme de l'allogreffe de peau chez le primate non-humain, en association avec des anticorps anti-CD40L et la transfusion du sang du donneur (H. Xu et al. 2003). Enfin, le tacrolimus ou les stéroïdes chroniques sont antagonistes aux anticorps anti-CD40L selon un modèle d'allogreffe rénale chez le primate non-humain (A D Kirk et al. 1999) (Tableau 6).

Le traitement par des anticorps bloquant CD40L est associé à la formation de thrombus.

En effet, le relargage de CD40L par les plaquettes activées lors de la greffe, ou l'administration de CD40L recombinant chez la souris CD40L^{-/-} sont suffisants pour induire le rejet d'allogreffe, qui peut être abrogé par des anticorps bloquant CD40L (H. Xu et al. 2006). Les anticorps bloquant CD40L ont été testés chez l'Homme pour le traitement de maladies auto-immunes telles que le lupus systémique érythémateux. Toutefois, les patients développent des thromboses qui pourraient résulter de l'action des anticorps sur les plaquettes et les cellules endothéliales (Sidiropoulos & Boumpas 2004). De même, le traitement par des anti-CD40L induit une thrombose chez le macaque greffé rénal. Son incidence peut être réduite par administration d'anti-coagulants tels que l'héparine (T Kawai et al. 2000) ou le ketorolac (I. Koyama et al. 2004). Dans notre modèle, nous utilisons un autre moyen pour bloquer le CD40L, le transfert du gène codant le CD40Ig. Il pourrait cependant avoir les mêmes conséquences thrombo-emboliques même si des essais préliminaires chez le singe n'ont pas montré de complications (Angin et al. 2012). Une alternative serait de cibler la molécule CD40. En effet, l'administration d'anticorps anti-CD40 en combinaison au belatacept permet de prolonger la survie d'allogreffe d'ilots pancréatiques chez le primate non humain (A. B. Adams et al. 2005) et de rein chez le singe (Imai et al. 2007) et de réduire les signes de thrombose.

Commentaire [b1]: placement ?

Treatment	Models	Results	Mechanisms	Ref
Single treatment				
anti-CD40L	monkey/kidney	prevented acute rejection,	delayed antibody production	(A D Kirk et al. 1999)
CD40Ig	rat/heart	long-term graft survival	CD8+CD45RC ^{low} Treg, IDO dependent	(Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007)
CD40Ig or monomeric CD40	rat/heart	CD40Ig only prolonged graft survival	suppressed CTL	(Masunaga et al. 2005)
CD40Ig	mouse/islet	prolonged graft survival	decreased leukocyte graft infiltration	(Rehman et al. 2007)
anti-CD40L	mouse/heart	tolerance induction	CD4+Treg, TLR4-independent	(Zhai et al. 2006)
anti-CD40L	mouse/heart	prolonged graft survival	generation of CD4+CD25+ Treg	(Andre van van Maurik et al. 2002)
anti-CD40L	mouse/skin	Did not prolong of graft survival	not applicable	(C P Larsen, Elwood, et al. 1996)
CD40Ig	kidney/monkey	Did not prolong of graft survival		(Angin et al. 2012)
with other costimulation blockade				
anti-CD40L + CTLA4Ig	monkey/kidney	prevented acute rejection	synergistically prevented T cell proliferation	(A D Kirk et al. 1997)
anti-CD40 + belatacept	monkey/islet	prolonged graft survival	synergistically promoted graft acceptance	(A. B. Adams et al. 2005)
CD40Ig + anti-CD28	rat/heart	inhibited chronic rejection	Inhibition of alloantibodies	(Guillonneau, Séveno, et al. 2007)
CD40Ig + anti-ICOS	rat/heart	inhibited chronic rejection	Inhibition of alloantibodies and development of tolerogenic cells	(Guillonneau et al. 2005)
CD40Ig + anti RANK	rat/heart	prolonged graft survival	decrease chronic lesions and humoral response	(Guillonneau et al. 2004)
anti-CD40L + anti-ICOS	mouse/islet	prolonged graft survival	induced CD4+CD25+FoxP3+ Treg	(Nanji et al. 2006)
anti-CD40L + anti-LFA-1 + donor bone marrow Tx	mouse/skin	prevented acute and chronic rejection	allogeneic chimerism	(Metzler et al. 2004)
with conventional immunosuppressants				
anti-CD40 + anti-CD86 + CsA	monkey/kidney	long-term drug free survival	induction of TGFβ producing cells	(Haanstra et al. 2005)
anti-CD40L + Sirolimus + DST	monkey/kidney	prevented acute rejection	facilitation of operational tolerance	(E. H. Preston et al. 2005; J. P. Pearl et al. 2007)
anti-CD40L + CsA	rat/liver	long-term graft survival	inhibition of proinflammatory cytokines	(Bartlett et al. 2003)
Anti-CD40 + Tacrolimus	monkey/kidney	prolonged graft survival	synergistically promoted graft acceptance	
anti-CD40L + Rapamycin	mouse/skin	long-term graft survival	Selective depletion of activated T cells	(Monk et al. 2003a)
with other bioreagents				
anti-CD40 + anti-CD86 + ATG	monkey/kidney	prolonged graft survival	no synergy with costimulation blockade	(Haanstra et al. 2006)
anti-CD40L + DST	mouse/heart	long-term graft survival	up-regulated Th2 cytokine, HO-1 dependent	(K. Yamashita et al. 2006)
anti-CD40L + DST	mouse/skin	prolonged graft survival	deletion of CD8+ Tcells, CTLA4 dependent	(Iwakoshi et al. 2000)
anti-CD40L + DST	mouse/skin	long-term graft survival	generated CD4+CD25+ Treg	(Quezada et al. 2005; T G Markees et al. 1998)
anti-CD40L+ Src inhibitor	mouse/heart	prolonged graft survival	reduced cellular infiltration	(Q. Zhang et al. 2005)
anti-CD40L + anti-CD45B	mouse/islet,skin	long-term graft survival	inhibited Th1 and up-regulated Th2 cytokines	(D M Rothstein et al. 2001)

Tableau 6. Stratégies de blocage de l'interaction CD40-CD40L en transplantation.

D'après (X.-L. Li et al. 2008)

3. Signal 3 : le signal cytokinique

Au repos, les lymphocytes T expriment un récepteur de faible affinité pour l'IL-2, constitué des chaînes β et γ . Trois voies de signalisation sont activées par les deux premiers signaux : la voie des calcineurines, la voie des MAPK, et la voie de la protéine kinase C/NF κ B. Leur activation induit la sécrétion d'IL-2, et l'expression de la chaîne α (CD25) du récepteur dont l'affinité pour l'IL-2 augmente. L'IL-2, produite par les lymphocytes Th1, fournit le troisième signal d'activation aux lymphocytes T, via PI3K et mTOR (mammalian target of rapamycin), et induit la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques (J. Shaw et al. 1980). Les cytokines produites ont un rôle déterminant pour la différenciation des lymphocytes T.

En transplantation, des stratégies visent à inhiber la prolifération des lymphocytes T allogéniques, par des inhibiteurs des calcineurine (par les immunosuppresseurs Tacrolimus (FK506) ou Ciclosporine A (Clipstone & Crabtree 1992)), par les glucocorticoïdes (qui inhibent la voie PKC/NF κ B et donc la synthèse de l'IL-2), par le Daclizumab et le Basiliximab (anti-CD25 qui fixent le récepteur à l'IL-2 sur les lymphocytes T activés sans transduire de signal d'activation).

C. La différenciation en lymphocytes T effecteurs du rejet

En fonction de l'environnement cytokinique, les lymphocytes Th0 précurseurs se différencient en sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ helper (Th), caractérisées par les cytokines (Figure 5). Cette différenciation a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T conservent cependant une certaine plasticité et peuvent commuter d'un type de helper à l'autre.

Les lymphocytes Th0 peuvent se différencier en Th1. Lors d'une allogreffe, l'IFN- γ , sécrété par les lymphocytes T CD8⁺ et T CD4⁺, et par les cellules NK et NKT du receveur, ainsi que par les DC du receveur et du donneur, active le facteur de transcription Tbet (Th1-specific T-box transcription factor) via STAT1 (signal transducer and activator of transcription). Le facteur Tbet favorise l'expression d'IFN- γ (Szabo et al. 2000) et de la chaîne β du récepteur à l'IL-12 sur les lymphocytes T CD4⁺. En revanche, il inhibe les facteurs de différenciation en lymphocytes T CD4⁺ Th2 (Szabo et al. 2000). Les lymphocytes T CD4⁺ deviennent alors plus sensibles à l'IL-12, sécrétée par les DC, qui entraîne la différenciation du lymphocyte T CD4⁺ en Th1 via STAT4 et STAT3. La liaison de LFA-1 à ICAM participerait aussi à la différenciation Th1 (B. Salomon & J A Bluestone 1998). Les Th1 sécrètent principalement l'IL-2, le TNF- β et l'IFN- γ , favorisant la prolifération des lymphocytes CTL, le recrutement

et l'activation des monocytes et macrophages, l'activation des cellules NK, la commutation isotypique des lymphocytes B vers un profil IgG2a, et la différenciation Th1 (Rizzo et al. 1995). Les macrophages ainsi activés détruisent les cellules du greffon par la libération de médiateurs oxydants et proinflammatoires, alors que les lymphocytes T cytotoxiques initient l'apoptose des cellules cibles via FasL ou la sécrétion de perforine et granzyme B (Kägi et al. 1994). **Les lymphocytes Th1 sont donc proinflammatoires, ils déclenchent un rejet aigu** (D'Elios et al. 1997) **ou chronique** (Obata et al. 2005) **de l'allogreffe.**

La différenciation des lymphocytes vers un profil Th2 est associée à une meilleure survie de l'allogreffe. Les DC activés peuvent produire l'IL-4 et le MCP1 (monocytes chemotactic protein 1), un facteur chimioattractant pour les macrophages, monocytes, et basophiles, qui renforcent la sécrétion d'IL-4. Les signaux induits par l'IL-4 et le TCR activent le facteur de transduction STAT6 puis GATA3 (trans-acting T-cell specific transcription factor 3). Par ailleurs, il est montré qu'une liaison CD28 forte (B. Salomon & J A Bluestone 1998) et/ou l'IL-33 favorisent la déviation vers un profil lymphocytaire de type Th2 (Jochen Schmitz et al. 2005). Les lymphocytes Th2 aident à l'activation des lymphocytes B de même spécificité antigénique. Ils sécrètent les cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, et IL-25, qui favorisent la réponse humorale de type IgG1 et IgE (Rizzo et al. 1995), l'activation de mastocytes et eosinophiles, et inhibent en parallèle l'expression de STAT4 et du récepteur à l'IL-12 impliqués dans la déviation vers un profil Th1 (Swain et al. 1990)(Rizzo et al. 1995). **Les lymphocytes Th2 sont associés au rejet chronique** (Illigens et al. 2009) **ou à la tolérance** (Koshiba et al. 2003)(Waaga-Gasser et al. 2009)(Amarnath et al. 2011) de l'allogreffe selon les modèles d'étude.

Le TGF β (transforming growth factor) permet la génération de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ régulateurs et inhibe la différenciation en Th1 ou Th2. En association avec l'IL-4, le TGF β peut induire la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th9 proinflammatoires, sécréteurs d'IL-9 (Goswami et al. 2012). D'autre part, l'association du TGF β avec l'IL-6 favorise la différenciation en lymphocytes Th17, via l'expression du facteur de transcription ROR γ t (retinoic acid-related orphan receptor gamma t) et du récepteur à l'IL-23 produite par les DC. **Les lymphocytes Th17 sécrètent l'IL-17, l'IL-21, et l'IL-22 et sont associés aux maladies auto-immunes et au rejet précoce du greffon.** En effet, de forts taux d'IL-17 ont été constatés chez les patients présentant un rejet aigu d'allogreffe rénale (Loong

et al. 2002), alors que le blocage d'IL-17 prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Jianping Li et al. 2006).

La combinaison de l'IL-6 à l'IL-21 induit des lymphocytes Th folliculaires, qui expriment le facteur de transcription Bcl6 (B cell lymphoma 6) et sécrètent l'IL-21. L'IL-21 est proinflammatoire (Dumoutier et al. 2000), elle favorise la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes (Vinuesa et al. 2005) et serait impliquée dans le rejet aigu du greffon (A. Hecker et al. 2009).

Enfin, l'IL-6 peut aussi induire une polarisation de type Th22, exprimant le facteur de transcription AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor), et sécrétant principalement l'IL-22. Ces cellules sont décrites dans des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Néanmoins, une étude récente propose un rôle protecteur de l'IL-22 dans l'allogreffe cardiaque chez la souris, les souris IL-22^{-/-} présentant un rejet accéléré (P. Kapessidou et al. 2008).

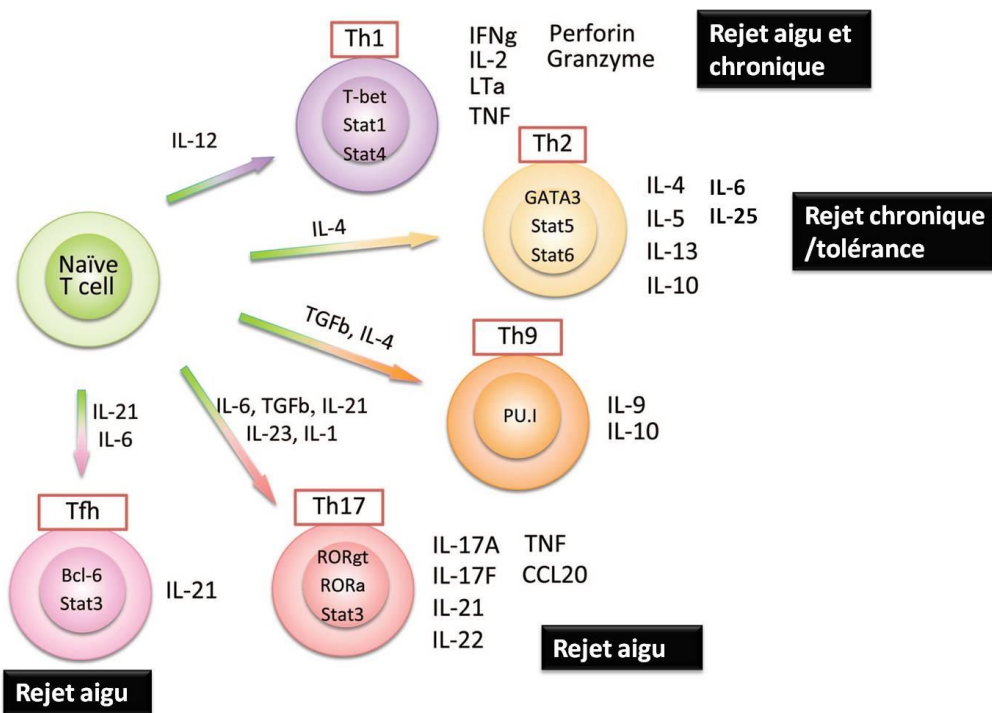


Figure 5. La différenciation des lymphocytes T en effecteurs du rejet d'allogreffe. D'après (Kathryn J Wood & R. Goto 2012).

4. LA REPONSE A MEDIATION HUMORALE

La réponse humorale est induite par les anticorps générés par les lymphocytes B. En transplantation, la réponse humorale **prédomine dans le rejet hyperaigu** induit par des anticorps dirigés contre les antigènes du donneur préformés avant la greffe, et **participe aux rejets aigu et chronique** par des anticorps générés post-greffe, dirigés principalement contre les molécules du CMH du donneur.

A. L'activation des lymphocytes B

Dans les follicules, les lymphocytes B reconnaissent un antigène présenté par les DC, constituant un premier signal d'activation. Ce signal entraîne l'apprêtement et la présentation de l'antigène sur une molécule de CMH de classe II aux lymphocytes T CD4⁺ Th2, préalablement activés par les DC et de même spécificité antigénique, à l'interface du follicule et de la zone T de l'organe lymphoïde secondaire. Les lymphocytes B auto-réactifs échappant à la délétion clonale ont alors peu de chance de rencontrer le lymphocyte T auto-réactif dirigé contre le même antigène (D. M. Russell et al. 1991)(J G Cyster et al. 1994). Les interactions TCR/CMH-peptide, CD40/CD40L, ICOS/ICOSL, CD28/B7 et les cytokines sécrétées IL-4, IL-5, IL-6, et IL-10 par les lymphocytes Th2, fournissent un second signal d'activation aux lymphocytes B (Figure 6, 1) et entraînent leur migration dans les follicules secondaires (Figure 6, 2), le réarrangement du domaine constant des chaînes du BCR, et orientent la commutation isotypique vers la production d'immunoglobulines de classe utile pour la réponse humorale IgG, IgA, ou IgE de même spécificité antigénique (de même paratope) que le BCR de la cellule productrice (Figure 6, 4). Les lymphocytes B se différencient alors en plasmocytes extrafolliculaires, producteurs d'anticorps dans la circulation et de courte durée de vie, en cellules B mémoires précoces (Figure 6, 5) de longue durée de vie, ou en centroblastes (Figure 6, 3) proliférant et s'accumulant jusqu'à former un centre germinatif dans les follicules (Christopher C Goodnow et al. 2010). Cette prolifération implique de nombreuses mutations dans le domaine variable des chaînes du BCR, permettant la maturation de l'affinité des immunoglobulines. Ce phénomène d'hypermutation somatique consiste à introduire des mutations dans les gènes codant la partie variable des Ig afin d'augmenter la diversité et l'affinité des Ig générées. Les nouvelles cellules B (centrocytes), qui ne prolifèrent plus, migrent dans la zone claire des centres germinatifs. Les centrocytes exprimant des Ig de forte affinité pour les antigènes présentés par les DC reçoivent un signal de survie. Les cellules sélectionnées se différencient ensuite en lymphocytes B mémoires (Figure 6, 5) ou en plasmocytes (Figure 6, 4) de haute affinité pour les antigènes (C. D. C. Allen et al. 2007)(Victoria et al. 2010). La plupart de ces plasmocytes migrent vers la moelle

osseuse, d'autres vers la rate. Ils produisent et maintiennent le taux d'anticorps circulant en périphérie. Les cellules mémoires peuvent coloniser les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes.

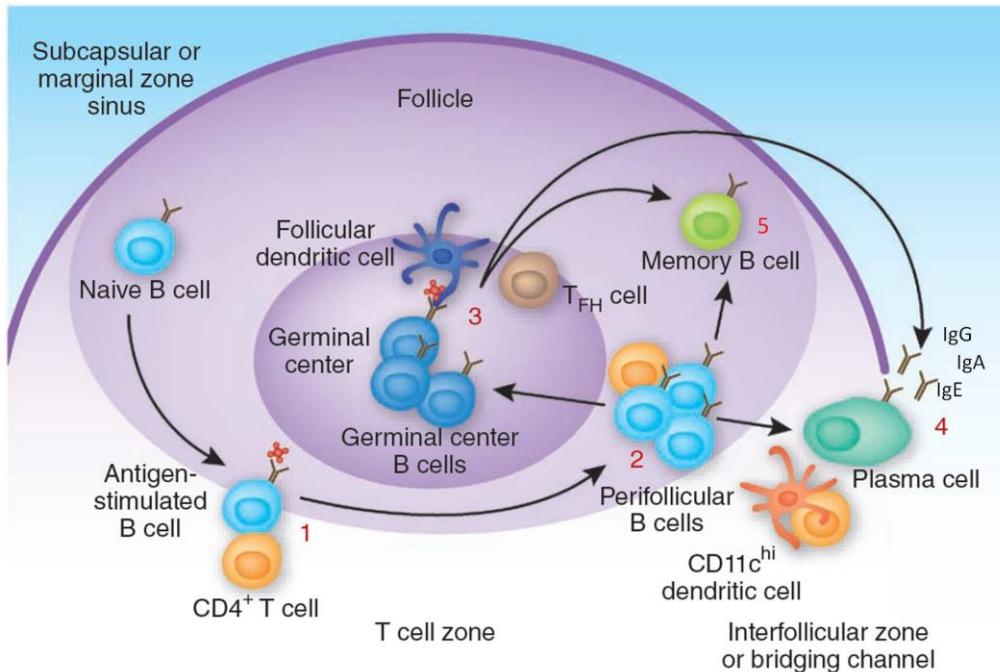


Figure 6. L'activation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires. D'après (Christopher C Goodnow et al. 2010).

Les lymphocytes B mémoires permettent une réponse accélérée, plus forte et plus affine envers un antigène déjà rencontré. C'est pourquoi les anticorps acquis lors d'une précédente transplantation ou d'une grossesse induisent un rejet de type hyperaigu. La réponse humorale intervient aussi dans les rejets aigu et chronique, par la formation d'anticorps post-greffe, dirigés contre les molécules de CMH du donneur. Lors d'une réponse primaire, les anticorps développés sont principalement de type IgM. L'exposition continue aux antigènes du greffon induit une réponse IgG importante. Les anticorps agissent via l'opsonisation des cellules cibles, favorisant leur reconnaissance et leur dégradation par le complément et les cellules phagocytaires, ou via l'ADCC (antibody-dependant cellular cytotoxicity) par les cellules cytotoxiques telles que les cellules NK.

B. Les immunoglobulines

La présence d'anticorps dirigés contre le donneur avant la greffe est un facteur de risque pour le devenir du greffon. **Les anticorps dirigés contre le CMH de classe I sont associés au**

rejet aigu du greffon, alors que les anticorps dirigés contre le CMH de classe II sont associés au rejet chronique (Campos et al. 2006). En effet, la survie du greffon chez les patients transplantés rénaux pré-immunisés contre le CMH de classe II du donneur est de 80% trois ans après la greffe, soit équivalente à celle des patients non immunisés. En revanche, la présence d'anticorps anti-CMH de classe I est associée au rejet, et d'autant plus en présence d'anticorps anti-CMH de classe II (HLA-DR) (Süsal & Opelz 2004). C'est pourquoi des tests de réaction croisée sont réalisés avant la greffe : la reconnaissance des cellules du donneur par le sérum du receveur se traduit par la lyse des cellules, dépendante du complément. De plus, le typage des molécules de CMH HLA-A, -B, et -DR et du groupe sanguin du donneur et du receveur déterminent le niveau d'allogénicité.

Les IgM sont les premiers à être produits suite à la transplantation. Ce sont des auto-anticorps rarement dirigés contre le CMH du donneur. Cependant les IgM fixent plus efficacement le complément que les IgG (Paantjens et al. 2011) et ont récemment été associés au rejet chronique chez les patients ayant subi une greffe rénale, cardiaque (Stastny et al. 2009) ou pulmonaire (Paantjens et al. 2011).

Les IgG se divisent en 4 isotypes : IgG1, IgG2, IgG3, et IgG4, représentant respectivement 60%, 25%, 10% et 5% des IgG du sérum. Il est admis que l'IgG1 et l'IgG3 activent le complément, contrairement aux IgG2 et IgG4 qui l'activent très peu voire pas du tout (Bindon et al. 1988). Or, la fixation du complément par les anticorps dirigés contre les antigènes du donneur est associée au rejet du greffon (Sutherland et al. 2012). En effet, une corrélation est observée entre le ratio d'IgG1 et d'IgG3 et les dépôts de C4d dans le greffon (Bartel et al. 2007). Cependant, les anticorps IgG2 peuvent parfois induire un rejet aigu indépendamment du complément (Nanni-Costa et al. 1996).

C. La cascade protéolytique du complément

La voie classique du complément est activée par la fixation spécifique d'anticorps. La cascade du complément aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui endommage et active l'endothélium (S. Nakashima et al. 2002). Les cellules endothéliales activées produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-8 et le MCP-1, des molécules chimiotactiques pour les cellules neutrophiles et les monocytes, favorisent la perméabilité vasculaire et la sécrétion de facteurs pro-coagulants, aboutissant à des hémorragies, à une thrombose vasculaire et une ischémie du greffon. La génération de

fragments biologiquement actifs participe au recrutement de cellules pro-inflammatoires dans le greffon et à son rejet.

D'après la classification de Banff depuis 2003, les dépôts du fragment C4d dans le greffon témoignent d'un rejet humoral (Volker Nickleit et al. 2002) (M. Kato et al. 2003). L'analyse de biopsies de patients transplantés cardiaques montre en effet une colocalisation des dépôts d'IgG et de C4d, ainsi qu'une corrélation avec l'activation du complément (William M Baldwin 3rd et al. 2004). Cependant, la corrélation n'est pas parfaite. Le marquage C4d est parfois très localisé voire absent sur des biopsies de greffes rénales présentant pourtant des signes cliniques et morphologiques de rejet humoral (A. Takeda et al. 2012) (Mengel et al. 2012). L'absence de dépôt de C4d ne peut exclure l'implication des anticorps dans le rejet, en raison des limites techniques de détection du C4d ainsi que de la réponse effectrice indépendante du complément.

Les molécules du complément sont des cibles thérapeutiques en transplantation. Dans un modèle d'allogreffe de rein chez la souris pré-immunisée contre les molécules de CMH du donneur, le blocage du fragment C5a par des anticorps, associé à un traitement ciclosporine A / LF15-0195, prolonge la survie du greffon par inhibition des réponses cellulaires et humorales (Rother et al. 2008). Les molécules régulatrices de la cascade sont autant de cibles thérapeutiques. Notamment, la génération de porcs transgéniques pour le facteur DAF (delay accelerating factor) humain (Langford et al. 1994) a pour but de pallier à l'inefficacité du facteur DAF (exprimé par les cellules endothéliales du greffon) à inhiber la C3 convertase du receveur en xénotransplantation (Dalmaso et al. 1991).

D. La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)

Les fragments Fc des anticorps peuvent aussi être reconnus par les cellules NK et les macrophages. Ces cellules cytotoxiques lysent les cellules du greffon via la production de perforine, de granzymes, et de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les molécules ROS (reactive oxygen species), le NO (monoxyde d'azote) et le TNF- α .

II. LA TOLERANCE EN TRANSPLANTATION

La tolérance est caractérisée par l'absence de rejet aigu ou chronique, et par une survie indéfinie du greffon chez un hôte immunocompétent. Seuls quelques cas de tolérance spontanée à l'allogreffe rénale ont été décrits chez des patients ayant arrêté leur traitement immunosuppresseur suite à une non compliance ou à l'apparition de cancer (Joanna Ashton-Chess et al. 2007; Sophie Brouard et al. 2007; S Brouard et al. 2012). L'induction de la tolérance chez les patients transplantés permettrait d'arrêter les traitements immunosuppresseurs, dont les effets secondaires sont nombreux, et de prévenir du rejet chronique.

La tolérance est établie par apprentissage du soi et distinction du non-soi au cours du développement, pendant la vie embryonnaire et post-natale, quand le système immunitaire est le plus actif. Les mécanismes de tolérance survenant dans les organes lymphoïdes primaires appartiennent à la tolérance dite centrale, alors que les mécanismes de la tolérance impliquant les organes lymphoïdes secondaires sont dits périphériques.

1. LA TOLERANCE CENTRALE

La tolérance a été décrite pour la première fois par Owen en 1945. Celui-ci a observé que des veaux faux-jumeaux, génétiquement différents mais partageant le même placenta, tolèrent chacun les globules rouges de son jumeau. De plus, une greffe de peau entre les jumeaux n'est pas rejetée (Owen 1945). En 1953, Billingham a remarqué que les mammifères et les oiseaux ne développent pas de réponse immune contre des antigènes étrangers s'ils y sont exposés suffisamment tôt dans leur vie fœtale. En effet, une greffe de moelle osseuse d'une souris adulte A chez un fœtus B permet à la souris B de tolérer spécifiquement une allogreffe de peau du donneur A, les lymphocytes T ayant été sélectionnés dans le thymus par des DC des souris A et B (BILLINGHAM et al. 1953).

A. La sélection des lymphocytes T

1. La sélection positive des thymocytes par les molécules du CMH
Zinkernagel et Doherty ont montré que le transfert de cellules souches hématopoïétiques issues de souris exprimant des molécules de CMH^{a/b} chez des souris de CMH^{a/a} irradiées permet le développement de lymphocytes T du donneur capables de répondre à la présentation d'antigènes sur des CPA de CMH^{a/a}. Ces expériences témoignent d'une éducation des lymphocytes T par des cellules radiorésistantes dans le thymus, dont le CMH imprime la restriction au soi (Doherty & Bennink 1979) (Zinkernagel et al. 1978) (MILLER 1961).

Les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK dérivent d'un progéniteur commun lymphoïde de la moelle osseuse. Les thymocytes $\text{TCR}^- \text{CD3}^- \text{CD4}^- \text{CD8}^-$, dits double négatifs, colonisent le thymus et pénètrent dans la région sous-capsulaire. Les thymocytes en développement réarrangent les gènes codant pour les chaînes α , β , γ et δ du TCR. Si le premier réarrangement résulte en l'expression d'une chaîne β fonctionnelle, celle-ci est exprimée à la membrane plasmique et associée à un substitut de chaîne α , formant un pré-TCR. Si le réarrangement de la chaîne β n'est pas fonctionnelle, la cellule exprime un TCR de type $\gamma\delta$. La cellule réarrange ensuite le gène codant pour la chaîne α , afin de remplacer le substitut en surface. Migrant vers le cortex profond, les thymocytes deviennent $\text{CD3}^+ \text{TCR}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ et sont dits double positifs. Ils subissent alors la sélection positive. Celle-ci consiste en la reconnaissance de molécules de CMH de classes I et II du soi, présentées sur les cellules épithéliales corticales réticulaires (Hogquist & M J Bevan 1996). La reconnaissance par le TCR d'une molécule de CMH de classe I induit un signal de survie pour le thymocyte et la perte de l'expression du co-récepteur CD4^+ , qui exprime alors un phénotype $\text{TCR}^+ \text{CD8}^+ \text{CD4}^-$. A l'inverse, s'ils reconnaissent un CMH de classe II, ils expriment les marqueurs $\text{TCR}^+ \text{CD4}^+ \text{CD8}^-$. Quatre-vingt-quinze pour cent des thymocytes double positifs n'exprimant pas de TCR fonctionnel et ne reconnaissant aucun CMH meurent par apoptose (G. Anderson et al. 1998) (Figure 7).

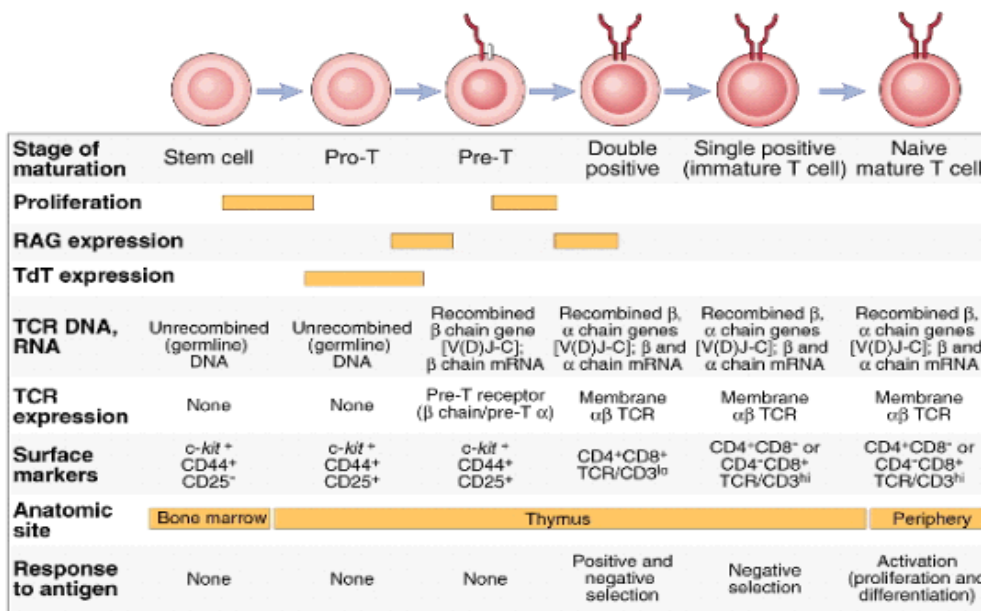


Figure 7. Développement des lymphocytes T non-autoréactifs à partir des cellules souches hématopoïétiques.

2. La sélection négative des thymocytes autoréactifs

Des expériences montrent que l'injection d'un antigène étranger en périphérie chez la souris déclenche une réponse immune lymphocytaire T spécifique, contrairement à l'injection du même antigène dans le thymus. Lorsqu'il est injecté dans le thymus, l'antigène est présenté comme un antigène du soi et les lymphocytes T spécifiques de l'antigène, considérés alors comme autoréactifs, sont éliminés (Staples et al. 1966).

Après l'étape de sélection positive, les thymocytes simple positifs $TCR^+CD3^+CD4^+$ ou $TCR^+CD3^+CD8^+$ migrent vers la médulla (Capone et al. 2001)(Laufer et al. 1996), guidés par un gradient de chimiokines. A la jonction cortico-médullaire, ils entrent en contact avec les DC (T Brocker et al. 1997) présentant un CMH du soi complexé à un antigène spécifique de tissus (Gallegos & Michael J Bevan 2004) ou à un super-antigène (Degermann et al. 1994). La forte affinité pour un tel complexe induit l'apoptose des lymphocytes T autoréactifs, représentant 5% de l'ensemble des lymphocytes T, dont les corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages. Les lymphocytes T simple positifs ayant survécu quittent le thymus et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires (Scollay et al. 1980) (Figure 7).

L'expression des antigènes spécifiques des tissus (TSA) par les cellules épithéliales médullaires est contrôlée par le facteur de transcription AIRE (autoimmune regulator). Des mutations au niveau du gène AIRE chez l'Homme résultent en l'apparition de maladies auto-immunes (Anon 1997), telles que le syndrome auto-immun monogénique APECED (autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy) caractérisé par la perte de la tolérance au soi dans de multiples organes (Zuklys et al. 2000)(M. S. Anderson et al. 2002)(Gavanescu et al. 2007).

Les lymphocytes T autoréactifs qui échappent à la délétion clonale peuvent être maîtrisés en périphérie par les mécanismes d'ignorance, d'anergie et de suppression par les lymphocytes Tregs. Si ce n'est pas le cas, ils induisent des maladies auto-immunes (Roitt & Cooke 1987).

3. La génération de lymphocytes T régulateurs

Une sélection positive secondaire de cellules T régulatrices naturelles $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ par le biais des cellules dendritiques résidentes aurait lieu dans le thymus (Shimon Sakaguchi 2004; N. Watanabe et al. 2005). Les corpuscules de Hassal expriment la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP), qui permet la maturation des DC $CD11c^+$ et leur confère la capacité de différencier des lymphocytes T $CD4^+CD8^-CD25^-$ en $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (N.

Watanabe et al. 2005). Les cellules épithéliales médullaires favorisent aussi l'expression de Foxp3 dans les thymocytes double positifs (Aschenbrenner et al. 2007) (Figure 8).

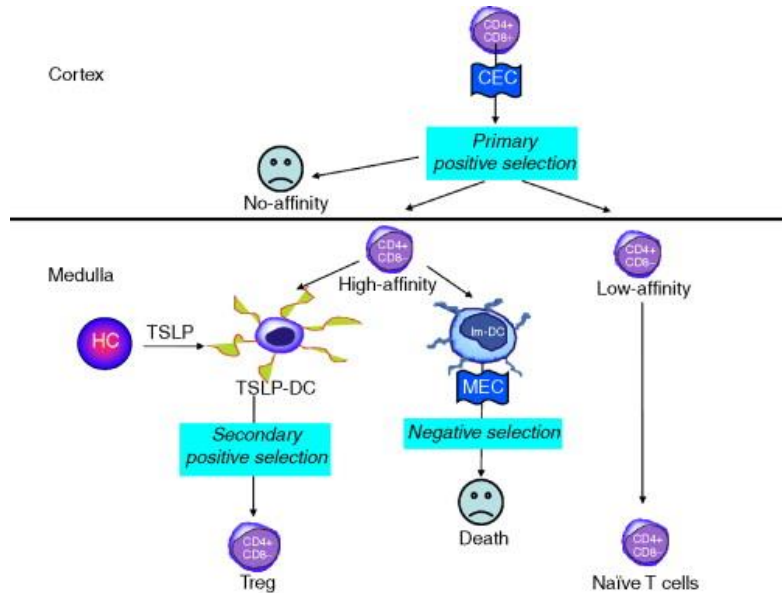


Figure 8. Génération de lymphocytes T régulateurs naturels dans le thymus.
D'après (Y.-J. Liu 2009)

De nombreuses études montrent ainsi que l'établissement d'un chimérisme hématopoïétique en allotransplantation conduit à un état de tolérance immunologique chez le primate et chez l'homme (T Kawai et al. 1995)(Bühler et al. 2002)(Tatsuo Kawai et al. 2008). Une tolérance centrale peut être obtenue par colonisation du thymus par des cellules hématopoïétiques du donneur, qui participent à la sélection du répertoire lymphocytaire (Goldrath & M J Bevan 1999). Les greffes hématopoïétiques sont très nombreuses dans le cadre du traitement de leucémies et lymphomes, cependant les applications cliniques en greffes d'organes solides restent limitées et peu développées.

B. La sélection des lymphocytes B

Chaque cellule exprime une spécificité antigénique unique déterminée par un récepteur BCR de type immunoglobuline membranaire. Le répertoire primaire du BCR est déterminé dans la moelle osseuse par réarrangement des gènes des segments V (variable), D (diversité) et J (jonction) codant l'immunoglobuline. Ce phénomène de recombinaison se fait d'abord pour la chaîne lourde μ de l'IgM puis pour une chaîne légère. L'expression de la chaîne lourde, associée à un substitut de chaîne légère (VpreB et $\lambda 5$), permet une première sélection des cellules pré-B immatures. Un signal peut être induit par la liaison du pré-BCR à l'héparan-

sulfate ou la galectine-1 (B. Rossi et al. 2006) exprimés par cellules stromales de la moelle osseuse, par la reconnaissance d'antigènes du soi (Eschbach et al. 2011), ou par l'oligomérisation indépendante d'antigène (Bankovich et al. 2007). L'activation du pré-BCR permet la recombinaison des gènes codant la chaîne légère κ et l'expression d'un BCR de type IgM. Les recombinaisons aléatoires peuvent aboutir en l'expression d'un BCR autoréactif. Les cellules B immatures subissent alors la délétion clonale. La reconnaissance d'antigènes du soi, avec une forte avidité, induit le processus de recombinaison secondaire des gènes VDJ de la chaîne légère λ , appelé « receptor-editing ». Celui-ci altère la spécificité du BCR. La persistance de la cellule B à reconnaître un auto-antigène induit l'apoptose (D. A. Nemazee & Bürki 1989) ou l'anergie (C C Goodnow et al. 1988) des cellules B. Les lymphocytes B, dits transitionnels, survivant à la délétion clonale quittent la moelle osseuse et migrent dans les follicules primaires du cortex des organes lymphoïdes secondaires pour obtenir un signal de survie (Figure 9).

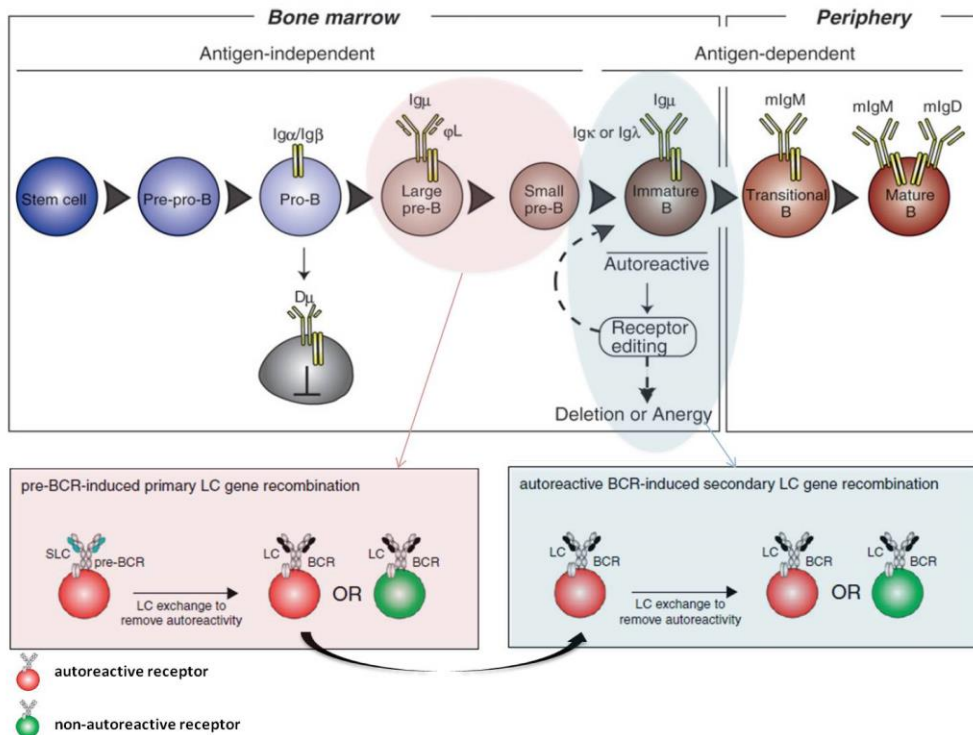


Figure 9. Développement des lymphocytes B non autoréactifs à partir des cellules souches hématopoïétiques.

D'après (Tomohiro Kurosaki 2010) et (Herzog & Juma 2012).

2. LA TOLERANCE PERIPHERIQUE

Malgré l'activité du facteur de transcription AIRE, tous les antigènes des tissus ne sont pas exprimés dans la médulla du thymus ou sont exprimés en quantité insuffisante, ce qui résulte en la présence de lymphocytes T autoréactifs matures circulant en périphérie. En effet, l'absence de présentation d'un antigène dans le thymus induit une susceptibilité accrue à l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris (L Klein et al. 2000). D'autre part, les lymphocytes T autoréactifs ayant une faible affinité pour leur antigène échappent également à la délétion clonale (Bouneaud et al. 2000). C'est pourquoi des mécanismes de tolérance existent en périphérie. Ceux-ci peuvent être de nature passive (ignorance de l'antigène, délétion clonale ou anergie des lymphocytes T autoréactifs, déviation phénotypique) (Figure 10) ou active (suppression par des cellules régulatrices).

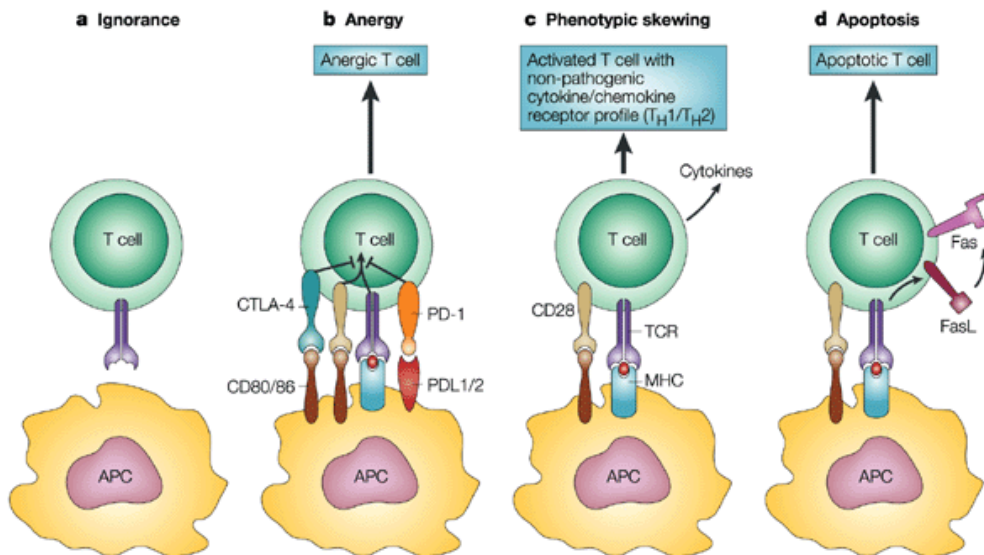


Figure 10. Les mécanismes de tolérance passive
D'après (Walker & Abul K Abbas 2002)

A. La tolérance passive

1. L'ignorance d'antigènes

Ohashi et al. ont généré des souris transgéniques pour un TCR spécifique d'un antigène viral. L'expression de l'antigène viral dans les îlots β du pancréas n'est pas suffisant pour déclencher un diabète. Les lymphocytes T ne détruisent les îlots que lorsqu'ils sont activés par le virus injecté en périphérie. Cette expérience a permis de montrer que **les lymphocytes**

T autoréactifs demeurent présents et fonctionnels, mais qu'ils ignorent seulement la présence de l'antigène (P. S. Ohashi et al. 1991) (Figure 10, a). Certains antigènes sont masqués par des barrières anatomiques et ne sont pas présentés aux lymphocytes. Sont concernés les protéines du cristallin, les spermatozoïdes, ou encore des protéines du système nerveux protégées par la barrière des méninges. La faible quantité d'antigènes est aussi une cause d'ignorance. En effet, une faible quantité d'antigènes peut activer les lymphocytes T cytotoxiques déjà sensibilisés mais pas les lymphocytes T CD8⁺ naïfs. Cependant, le relargage d'antigènes après destruction des cellules par les lymphocytes T cytotoxiques permet la présentation croisée et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ naïfs (Kurts et al. 1998).

2. La délétion des lymphocytes

La présentation d'antigènes en **absence de costimulation** (Ferber et al. 1994), le **manque de facteurs de croissance** pour lesquels les lymphocytes T activés sont en compétition (I. Förster et al. 1995), ou encore une **forte concentration en antigènes** (Alexander-Miller et al. 1996) peuvent induire la délétion des lymphocytes T par apoptose (Figure 10, d). En effet, des modèles d'allogreffes cardiaques et pancréatiques montrent que l'utilisation d'agents particuliers, bloquant la voie de co-stimulation ou la voie de signalisation induite par l'IL-2, induit l'apoptose des lymphocytes et ainsi un état de tolérance (A D Wells et al. 1999).

Les lymphocytes T activés entrent en apoptose suite à un signal venant du TCR et dépendant de la liaison de Fas (Dhein et al. 1995) par un mécanisme appelé AICD (Activation-Induced Cell Death). Par exemple, il a été montré que les souris présentant un défaut d'expression de Fas sont atteintes d'une maladie auto-immune proche du lupus systémique érythémateux (Watanabe-Fukunaga et al. 1992). Réciproquement, les souris déficientes pour le ligand de Fas (FasL) sont atteintes d'une maladie lymphoproliférative (T Takahashi et al. 1994). Egalement chez l'Homme, une délétion dans le gène codant pour Fas induit un syndrome lymphoprolifératif et une auto-immunité (Rieux-Laucat et al. 1995). La voie Fas est aussi impliquée dans la tolérance fœto-maternelle. En effet, FasL est surexprimé dans l'endomètre pour induire l'apoptose des lymphocytes T réactifs contre le fœtus semi-allogénique (Makrigiannakis et al. 2001).

L'induction de la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris déficiente pour Fas suggère que des mécanismes indépendants de la voie Fas/FasL peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T en périphérie (X C Li et al. 1999). Effectivement, chez la souris, des anti-

CD40L et des agonistes anti-CD28 peuvent induire l'apoptose sélective des lymphocytes T activés de façon dépendante du fragment Fc des immunoglobulines ou de l'IFN- γ respectivement (Monk et al. 2003b; X.-Z. Yu et al. 2004).

Commentaire [b2]: dépendant : both the depletion of activated T cells and the suppressive effect of anti-CD28 mAb on GVHD lethality required donor-derived IFN-gamma production (yu 2004)

Les lymphocytes B auto-réactifs échappant à la délétion clonale ont peu de chance de rencontrer les lymphocytes T auto-réactifs envers le même antigène (D. M. Russell et al. 1991)(J G Cyster et al. 1994). Dans de rares cas, la rencontre se produit, mais l'interaction du lymphocyte B avec le lymphocyte T en absence de molécule de costimulation induit son apoptose par un mécanisme dépendant de Fas (Rathmell et al. 1996).

3. L'anergie des lymphocytes

L'anergie des lymphocytes T auto-réactifs correspond à **une inactivation fonctionnelle** de ces lymphocytes qui se distingue par une absence de prolifération et de production d'IL-2 lors d'une nouvelle stimulation (M K Jenkins & R H Schwartz 1987)(R H Schwartz 1990). Cet état de non-réponse est transitoire car il peut être levé par l'apport de grandes quantités d'IL-2 ou par des anticorps anti-OX40 (Ronald H Schwartz 2003).

Des études montrent que les CPA tolérogènes peuvent induire l'anergie des lymphocytes T allogéniques (Hoves et al. 2006) (Vanasek et al. 2006). **L'anergie de ces lymphocytes T peut résulter d'un défaut de costimulation par les CPA**, ou bien d'une interaction de faible affinité entre le TCR et l'antigène présenté, ou encore de l'interaction CTLA-4/B7 (Figure 10, b). En effet, le ligand inhibiteur CTLA-4, dont l'affinité pour le récepteur B7 est dix fois supérieure à celle du ligand activateur CD28, est exprimé par les lymphocytes T après leur activation pour limiter la réponse immune (Krummel & Allison 1995). Le blocage de CTLA-4 chez la souris augmente le nombre de lymphocytes T auto-réactifs et prévient l'induction de tolérance (Walunas & J A Bluestone 1998), et les lymphocytes T CTLA-4^{-/-} sont résistants à la tolérisation (Greenwald et al. 2001). De manière similaire, l'expression de PD-1 (Programmed Death-1) suite à la stimulation antigénique et sa liaison au ligand PDL-1 réduit la synthèse d'IL-2 et induit l'anergie des lymphocytes T (Chikuma et al. 2009).

Les lymphocytes T anergiques peuvent inhiber la fonction CPA des DC (Vendetti et al. 2000), se différencier en Tregs sécréteurs d'IL-10 (Buer et al. 1998), ou entraîner l'apoptose des lymphocytes T (J G Chai et al. 1998). Cependant, la présence de l'antigène est nécessaire au maintien de l'anergie (Ronald H Schwartz 2003). En transplantation, les lymphocytes T alloréactifs devenus anergiques par incubation avec les CPA du donneur et des anticorps

bloquant les récepteurs CD80/CD86, sont capables de transférer la tolérance à l'allogreffe de rein chez le primate non-humain (Bashuda et al. 2005).

L'anergie des cellules B autoréactives serait, quant à elle, due à une désensibilisation du BCR suite à une stimulation chronique par l'auto-antigène (Gauld et al. 2005)

4. La déviation phénotypique vers un profil de type Th2

Les cytokines produites par les lymphocytes de type Th2 sont souvent liées à une baisse de l'auto-immunité. En effet, le transfert de lymphocytes Th2 n'induit pas de diabète auto-immun chez la souris NOD (non-obese diabetic) (Bradley et al. 1999), ni d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (D. A. Young et al. 2000), contrairement au transfert de lymphocytes Th1 (Figure 10, c). En outre, le profil cytokinique des lymphocytes Th2 ou Th1 dans le pancréas permet de prédire respectivement la protection ou la destruction des îlots de Langerhans (Bradley et al. 1999), et les cytokines de type Th2 IL-4, IL-13 et TGF β réduisent l'EAE (D. A. Young et al. 2000).

En transplantation, un état de tolérance est généralement associé à une réponse cytokinique Th2. Par exemple, une étude sur les patients transplantés rénaux montre qu'une forte concentration en IFN- γ et IL-10 dans le sérum avant transplantation favorise la réponse immune contre le greffon, alors que l'augmentation transitoire d'IL-4 protège le greffon (J. Karczewski et al. 2008). Chez la souris, la survie d'allogreffe de coeur peut être prolongée par l'administration d'IL-33 orientant une réponse lymphocytaire de type Th2 (H. Yin et al. 2010), ou par le blocage de la sous-unité p40 de l'IL-12 et de l'IL-17, réduisant les réponses Th1 et Th17 (A. Xie et al. 2011). Par ailleurs, le transfert de lymphocytes Th2 du receveur générés *ex vivo*, dévie la réponse cytokinique vers un phénotype Th2 et prolonge la survie d'allogreffe cardiaque chez le rat (Amarnath et al. 2011). Enfin, si les cytokines IL-4 et IL-12 n'induisent pas elles-mêmes la tolérance, elles augmentent le potentiel suppresseur des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ et facilitent la tolérance à l'allogreffe d'îlots chez la souris (D. Zhang et al. 2010).

En accord avec ces observations, les divers traitements immunosuppresseurs permettant une meilleure survie de l'allogreffe sont associés à une déviation de la réponse lymphocytaire vers un profil Th2. Par exemple, les glucocorticoïdes, utilisés pour traiter les maladies auto-immunes et inflammatoires, et pour prévenir du rejet de greffe, suppriment la réponse lymphocytaire de type Th1, favorisent la réponse humorale via les lymphocytes Th2, et

induisent la tolérance spécifique d'antigènes en modulant la maturation et la fonction des DC, et en favorisant le développement de lymphocytes Tregs producteurs d'IL-10 (Franchimont 2004). D'autre part, le sirolimus réduit la réponse de type Th1 chez les patients transplantés rénaux, comparés à la ciclosporine A néphrotoxique (Libetta et al. 2007).

B. La tolérance active

1. La suppression/régulation

Ce mécanisme permet de limiter la réponse immune vis-à-vis d'organismes pathogènes, et d'enrayer la réponse immune dirigée contre les antigènes du soi à l'origine de maladies auto-immunes. Les cellules du système immunitaire peuvent acquérir une fonction régulatrice pendant leur développement, tels que les lymphocytes Tregs « naturels » dans le thymus, ou en périphérie sous l'influence du micro-environnement, tels que les lymphocytes Tregs « induits » dans l'allogreffe ou le ganglion drainant. Elles peuvent agir par contact ou par la sécrétion de cytokines suppressives. **En transplantation, les cellules régulatrices sont la cible de stratégies thérapeutiques visant à contrôler les réponses immunes innées, déclenchées par l'ischémie/reperfusion du greffon, et adaptatives, déclenchées par l'allogénicité du greffon.**

Les cellules T régulatrices ont été décrites pour la première fois dans les années 1970 par Gershon et al. qui les ont qualifiées de « **cellules suppressives** » (Gershon & Kondo 1970) dont les mécanismes diffèrent de ceux identifiés chez le nouveau-né par Billingham (BILLINGHAM et al. 1953). Hall et al. mettent en évidence leur capacité de **tolérance infectieuse** en transférant les lymphocytes T de rats traités par la ciclosporine A à de nouveaux receveurs adultes irradiés pour prévenir du rejet de greffe (B M Hall et al. 1984)(B M Hall et al. 1985). Plusieurs populations ont depuis été identifiées comme possédant des propriétés régulatrices, notamment chez les patients greffés ayant arrêté les traitements immunosuppresseurs (Takatsuki et al. 2001). Les cellules régulatrices aujourd'hui identifiées appartiennent aux familles de lymphocytes T, lymphocytes B, DC, MDSC (myeloid-derived suppressor cells) ou des macrophages.

2. Les lymphocytes T régulateurs

Un mécanisme majeur de la tolérance périphérique fait intervenir les lymphocytes T régulateurs, capables d'atténuer les réponses immunes. Les lymphocytes T CD8⁺ ont été les premières cellules régulatrices identifiées. Cependant le manque de marqueurs a détourné l'attention sur les lymphocytes T régulateurs CD4⁺. Ces études ont permis d'identifier des

mécanismes de suppression et des molécules immunomodulatrices parfois utilisés par les lymphocytes T régulateurs CD8⁺ (Tableau 7).

cellules	régulatrices	phénotype	mode d'action
Naturelles	T CD4 ⁺ CD25 ⁺	Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ CD45 ⁺ CD122 ⁺ CD103 ⁺ CD134 ⁺ CD62L ⁺	- par contact avec les DC / CTLA-4, LAG-3 - par cytolyse / perforine, granzyme - par privation en IL-2, ATP - par cytokines inhibitrices IL-10, TGFβ, IL-35
	TCD4 ⁺ CD45RC ^{low}		-déviation Th2 - sécrétion d'IL-4, IL-10, IL-13
	TCD8 ⁺ CD45RC ^{low}	Foxp3 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺	- indépendant de IL-10, TGFβ - par contact? - Pas de cytotoxicité - sécrétion d' IL-4'IL-10'IL-13'IFNγTGFβ
Induites	TCD8 ⁺ CD45RC ^{low}	CD25 ⁺⁺ GITR ⁺⁺	- par induction de IDO par l' IFNγ - par cytokines inhibitrices FGL-2, IL-34 - pas de rôle pour IL-10 ou TGFβ - sécrétion de TGFβ et d'IL-2
	Tr1	Foxp3 ⁺ CD25 ⁺ CTLA-4 ⁺	- par les cytokines IL-10, TGFβ; - par contact / CTLA-4, PD-1, - par cytolyse / granzyme B, perforine,
	Th3	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA-4 ⁺ CD25 ⁺	- inhibition des LT et commutation IgA des LB par le TGFβ -sécrétion d'IL-4, IL-10 - réponse non spécifique de l'antigène
	T CD8 ⁺ CD28 ⁻	CTLA-4 ⁺ GITR ⁺ CD62L ⁺ Foxp3 ⁺ TCRVβ limité	- par contact avec les DC / inhibition B7, CD40, et augmentation d' ILT3, ILT4 - par inhibition du CD40L sur les LT - par anergie des LT - par conversion des LT en Tregs - restriction au CMH I
	T CD8 ⁺ αα	Foxp3 ⁻ NKR ⁺ LAG3 ⁺ TCRVβ6	- parapoptose des Th1 - régulent les NKT - restriction au Qa-1
	TCD8 ⁺ CD122 ⁺	CD28 ⁺ PD1 ⁺	chez la souris : - contrôlent l' activation TCD4 ⁺ et TCD8 ⁺ CD122 ⁺ - inhibition des réponses autoimmunes/ IL-10. correspondent aux TCD8⁺CXCR3⁺ chez l'homme
	TCD8 ⁺ CD103 ^{hi}	Foxp3 ⁺	- par cytokines inhibitrices IL-10, IFNγ, - par molécules cytotoxiques - nécessitent un contact avec la cible
	CD8 ⁺ CD11c ⁺		- par l'induction de IDO dans les DC via IFNγ
	TCD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻		- par inhibition de la maturation DC / CTLA-4 - sont CPA/trogocytose - par cytolyse / contact, /Fas, /granzymes+perforine - sécrétion d' IFNγ, TNFα, mais pas IL-2, IL-4, IL-10
	Tγδ	CD4 ⁺ CD8 ⁺ majoritairement	- sont indépendante de CPA - par cytotoxicité/ FasL - inhibent les T + DC dans les tumeurs - régulent les Tαβ par TGFβ, IL10, IL-4
	NKT	TCRαβ CD161 ⁺	- sécrètent des cytokines Th2 - pro-tumorale/ IL-13, IFNγ - par modulation de la fonction de Tregs CD4 ⁺ CD25 ⁺

Tableau 7. Liste non exhaustive des cellules régulatrices

Les travaux de ces 15 dernières années ont permis d'isoler plusieurs populations de lymphocytes Tregs, qui se distinguent par leur origine (naturels ou induits), leurs marqueurs de surface et leurs mécanismes de régulation.

- Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Les Tregs les mieux connus et les plus étudiés sont les lymphocytes T naturels CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ sélectionnés par des interactions de haute avidité dans le thymus (S Sakaguchi et al. 1995). Leur implication dans de nombreux contextes physiologiques ou pathologiques a clairement été établie.

Ces lymphocytes T « suppresseurs » ont été caractérisés en 1985 par Sakaguchi, par les marqueurs CD5^{high} (ou Lyt-1^{high}) (S Sakaguchi et al. 1985), CD25⁺ (S Sakaguchi et al. 1995), et Foxp3⁺ (Khattari et al. 2003) (Shimon Sakaguchi 2003). Les lymphocytes Tregs naturels (nTregs) se distinguent des Tregs induites par l'expression du facteur de transcription **Helios** (Thornton et al. 2010) et de **Nrp-1** (neuropilin-1) (Yadav et al. 2012). Le marqueur **Foxp3** (forkhead box P3) est exprimé constitutivement par les lymphocytes Tregs chez la souris et est nécessaire pour la différenciation et la fonction des Tregs. L'expression de Foxp3 est aussi constatée dans les Tregs humaines, cependant, il est également décrit comme transitoirement augmenté dans les lymphocytes T activés, rendant difficile son utilisation comme marqueur spécifique des Tregs. La faible expression du **CD127** (la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7) permet d'affiner leur phénotype (Weihong Liu et al. 2006).

Les lymphocytes Tregs dits adaptatifs ou iTregs, sont issus de la différenciation de lymphocytes T CD4⁺ conventionnels naïfs en périphérie, par interaction avec une CPA tolérogène présentant un antigène du soi ou par des cytokines tolérogènes. En effet, des expériences de re-transplantation d'allogreffe de peau chez la souris ont mis en évidence la migration d'une partie des lymphocytes Tregs du greffon vers les organes lymphoïdes dans lesquels a lieu la conversion de nouveaux lymphocytes Tregs, l'autre partie subsistant dans le greffon afin de maintenir l'état de tolérance (Luis Graca, Stephen P Cobbold, et al. 2002). Cette idée est confortée par les mécanismes de tolérance infectieuse, dans laquelle des lymphocytes Tregs Foxp3⁺ convertissent des lymphocytes T naïfs, possédant déjà de faibles capacités suppressives (Luis Graca, S. Thompson, et al. 2002), en lymphocytes T Foxp3⁺ (Kendal et al. 2011).

En transplantation, l'absence de Tregs se traduit par un rejet d'allogreffe (D. Chen et al. 2006) **ou une GVHD** (graft-versus-host disease) (Wysocki et al. 2005)(Shevach 2009). Les lymphocytes Tregs sont localisés dans les ganglions drainants pour inhiber l'activation des lymphocytes T naïfs et le développement de lymphocytes T effecteurs, et dans l'allogreffe, pour empêcher le rejet induit par les lymphocytes T effecteurs (Carvalho-Gaspar et al. 2008).

En clinique, un nombre élevé de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a été observé dans le sang périphérique de patients greffés hépatiques opérationnellement tolérants (M Martínez-Llordella et al. 2007). Un tel marqueur de tolérance faciliterait l'adaptation des traitements immunosuppresseurs. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, une étude montre que les lymphocytes Tregs se concentrent principalement dans le greffon et qu'aucune augmentation n'est visible dans le sang périphérique chez les patients stables ou opérationnellement tolérants greffés rénaux (Bestard et al. 2007). Le recrutement des lymphocytes Tregs dans le greffon serait fonctionnellement plus important dans l'induction de la tolérance, mais ne serait visible que par biopsie de l'organe.

La compréhension des mécanismes de suppression par les lymphocytes Tregs est d'intérêt thérapeutique (Figure 11).

Les lymphocytes Tregs peuvent réguler la réponse immune par **contact cellulaire**. La liaison de CTLA-4, un antagoniste de CD28, à B7 sur les CPA permet notamment de moduler le catabolisme du tryptophane par l'activation de la molécule immunorégulatrice IDO (indoleamine 2,3 dioxygénase) (Ursula Grohmann et al. 2002)(Andrew L Mellor & David H Munn 2004). D'autre part, l'expression de LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3) par les lymphocytes Tregs inhibe l'activation des DC par interaction avec le CMH II (B. Liang et al. 2008).

Par ailleurs, les lymphocytes Tregs peuvent agir via la **sécrétion de la molécule immunosuppressive** IL-10 (Suffia et al. 2006). Ils peuvent aussi supprimer et différencier les lymphocytes T effecteurs en lymphocytes Tregs CD4⁺Foxp3⁺ via TGFβ (Andersson et al. 2008). D'autre part, une population de lymphocytes Tregs agit indépendamment de l'IL-10, du TGFβ ou du contact, mais requiert l'IL-35, un nouvel hétérodimère Ebi3 (Epstein Barr virus induced gene 3) / IL-12α, pour supprimer ou différencier les lymphocytes T effecteurs en lymphocytes « Tregs induits par IL-35 », qui contribuent à la tolérance infectieuse (Chaturvedi et al. 2011). En effet, les lymphocytes Tregs Ebi3^{-/-} et IL12a^{-/-} ont une activité suppressive réduite *in vitro* et *in vivo* (Collison et al. 2007).

Les lymphocytes Tregs peuvent aussi induire l'apoptose des cellules effectrices par cytolyse via les granzymes et la perforine (Grossman et al. 2004), et par **perturbations métaboliques** telles que la privation en IL-2 (Pandiyani et al. 2007), ou hydrolyse de l'ATP (Borsellino et al. 2007).

Enfin, les lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+$ permettent la tolérance en agissant sur de multiples effecteurs du rejet. Ils empêchent notamment les lymphocytes T $CD8^+$ d'infiltrer le greffon en empêchant leur activation dans les ganglions drainant le greffon, et de générer des lymphocytes T $CD8^+$ mémoires spécifiques du donneur en infiltrant eux-mêmes le greffon (Carvalho-Gaspar et al. 2008), ils inhibent la prolifération et les fonctions effectrices des lymphocytes T $CD4^+$, ainsi que la maturation de l'affinité des anticorps et la différenciation en plasmocytes (Y. Chung et al. 2011), enravent la cytotoxicité des cellules NK et NKT, ainsi que la maturation et la fonctionnalité des DC, et compromettent la fonction et la survie des neutrophiles, des ostéoblastes et des mastocytes (Shevach 2009)(Rouse et al. 2006).

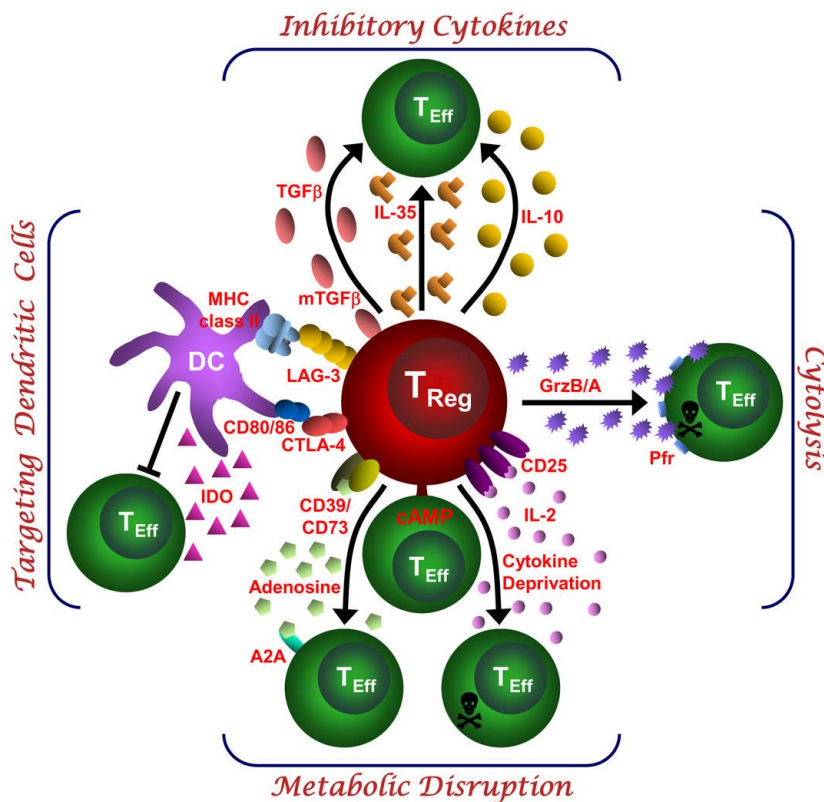


Figure 11. Mécanismes de suppression par les lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. D'après (D. A. A. Vignali et al. 2008)

- Les lymphocytes T régulateurs CD45RC^{low}

➤ *Le CD45*

La molécule de CD45 (ou LCA pour leucocytes common antigen, ou encore T200) est une tyrosine phosphatase transmembranaire. Le CD45 est nécessaire pour la transduction des signaux après la liaison du TCR et du BCR à l'antigène (Hermiston et al. 2003).

Des épissages alternatifs des exons 4, 5, et 6 aboutissent à 8 isoformes possibles du CD45 (Streuli et al. 1987), de poids moléculaires et domaines extracellulaires différents, que sont les CD45RA, RB, RC, RAB, RAC, RBC, RABC, RO. Cependant, l'exon 5 (codant le CD45RB) possède une séquence empêchant son épissage alternatif, seules les isoformes CD45RB, RBC, RAB, RABC existent (Rogers et al. 1992). Après interaction avec l'antigène, les lymphocytes T perdent l'expression du CD45 pour adopter un phénotype mémoire CD45RO⁺ (ou CD45RC⁻) (Figure 12).

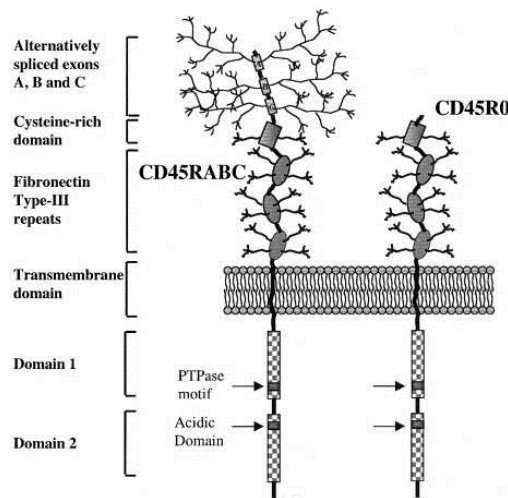


Figure 12. Représentation schématique des isoformes CD45RABC et CD45RO.

D'après (Hermiston et al. 2003)

Cependant, le marqueur CD45RC⁺ (ou CD45RO⁻) n'est pas suffisant pour qualifier les lymphocytes T de naïfs, car les cellules mémoires sont capables de ré-exprimer les isoformes de haut poids moléculaire après activation (M. Hargreaves & E. B. Bell 1997) (Figure 13).

Commentaire [b3]: 1A: Je ne trouve pas ça claire, il faudrait décrire comment les isoformes A, B et C sont exprimés aux différents moments de l'activation et quelles formes peuvent ou pas coexister dans la même cellule. Peut-être montre un schéma. Quelque part il faudra corréliser les isoformes de CD45 chez le rat, souris et homme dans les sens que chez la souris le marqueur CD45RB a été le marqueur utilisé pour définir des CD4 Treg et pas le CD45RC...pour quoi ? j'ai une thèse d'un étudiant de Abdel qui décrit tout ça, je te l'envoie par mail, un schéma et description en page 77 de la thèse.

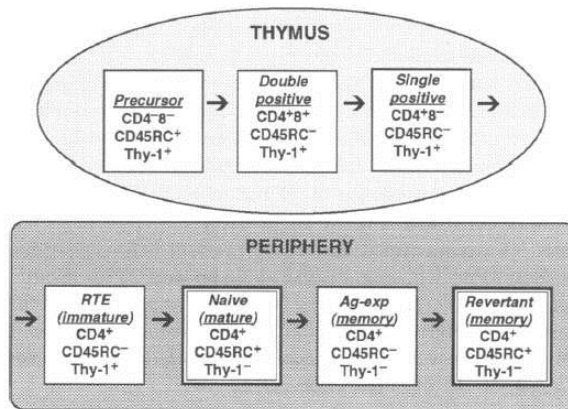


Figure 13. Expression du CD45RC durant le développement des lymphocytes T CD4⁺ chez le rat. D'après (M. Hargreaves & E. B. Bell 1997). Le marqueur Thy-1 aide à distinguer l'état d'activation / de maturation des populations CD45RC⁺ et CD45RC⁻.

Pour ces travaux de thèse, nous avons utilisé les anticorps OX22 et OX33 pour marquer les cellules CD45RC⁺ (Spickett et al. 1983) et CD45RA⁺ (Woollett et al. 1985) respectivement.

➤ *Les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low}*

Les propriétés régulatrices des lymphocytes T CD4⁺ OX22^{low} ont été mises en évidence par Powrie et al. en 1990. Cette équipe a montré que le transfert de lymphocytes T CD4⁺ OX22^{high} d'un rat euthymique chez un rat nude induit une forte inflammation contrairement au transfert de lymphocytes T CD4⁺OX22^{low}, mais surtout, que le co-transfert de lymphocytes T CD4⁺OX22^{low} protège de l'inflammation induite par les lymphocytes T CD4⁺OX22^{high} (F Powrie & D. Mason 1990). En effet, **les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} sont impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires.** Notamment, les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} sont capables de prévenir du diabète auto-immun chez le rat (Fowell & D. Mason 1993) (L. A. Stephens & D. Mason 2000). Le traitement par des anticorps anti-CD28 prévenant de l'arthrite auto-immune chez le rat, corrèle avec la diminution du ratio des lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{high}/CD4⁺CD45RC^{low} dans le sang et la forte expression d'IL-10 (mRNA) dans la synovie (Rodríguez-Palmero et al. 2006). De même, les patients atteints de vasculite associée à ANCA en rémission présentent une augmentation de la proportion des lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} comparés aux patients atteints de lupus érythémateux systémique ou aux patients sains (Ordonez et al. 2009). Leur implication dans la susceptibilité à l'autoimmunité a par ailleurs été montrée (Barendrecht et al. 2002). En effet, la prépondérance des lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{high} chez le rat Lewis est associée à une forte susceptibilité de développer des

maladies auto-immunes induite par une réponse Th1, alors que la prépondérance des lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} corrèle avec la susceptibilité des rats Brown Norway à développer des maladies auto-immunes de type Th2. De plus, des études montrent que les cytokines anti-inflammatoires IL-4, IL-10 et IL-13 sont exclusivement produites par les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} (vs CD45RC^{high}) (J. F. Subra et al. 2001). La forte proportion de lymphocytes T CD45RC^{low} est aussi constatée dans le compartiment des lymphocytes T CD8⁺ des rats Brown Norway (G J Fournié et al. 2001).

Les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low} sont associés à la tolérance en transplantation. La tolérance spécifique à l'allogreffe cardiaque chez le rat Lewis 1A induite par transfusion du sang du donneur, corrèle avec la diminution de la population de lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{high} dans le greffon sécrétant l'IL-2 et l'IFN- γ (R Josien et al. 1995). De plus, Xystrakis et al. ont montré que les lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{high} peuvent induire une GvHD aiguë et chronique contrairement aux lymphocytes T CD4⁺CD45RC^{low}. Cependant, ces dernières ne sont pas efficaces pour prévenir de la GVHD (Emmanuel Xystrakis, Isabelle Bernard, et al. 2004).

➤ *Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}*

La fonction régulatrice des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} a été découverte par Xystrakis et al. en 2004. De nombreuses études ont décrit une susceptibilité accrue des rats Brown Norway (BN) aux maladies auto-immunes, associée à une réponse immune de type Th2, vs Th1 chez les rats Lewis (J. F. Subra et al. 2001) (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004). En parallèle, une plus forte proportion de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} a été observée chez les rats BN. En effet, Qasim et al. ont observé que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} représentent moins de 75% des lymphocytes T CD8⁺ du sang périphérique chez le rat BN contre 90% chez les autres souches (Qasim et al. 1995). Dans les études de Fournier et Xystrakis, le ratio des CD8⁺CD45RC^{high}/CD8⁺CD45RC^{low} est de 4 chez le rat Lewis vs 1 chez le rat BN (G J Fournié et al. 2001) (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004). La différence de **susceptibilité aux maladies auto-immunes** serait donc déterminée par les cellules hématopoïétiques et lymphoïdes et non par les tissus cibles (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004). Dans un autre modèle, Xystrakis montre que la GVHD induite par transfert de lymphocytes T CD4⁺, peut être inhibée par le transfert de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} (Emmanuel Xystrakis, Dejean, et al. 2004). De même, les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} sont associés à la rémission des rats atteints d'uvéite auto-immune

expérimentale, par comparaison aux rats atteints de la forme récurrente, et peuvent prévenir de la maladie (G. Han et al. 2007).

- Phénotype des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}

Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} sont encore peu décrits phénotypiquement. Alors que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} sécrètent les cytokines de type Th1 IL-2 et IFN γ , les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} produisent les cytokines de type Th2 IL-4, IL-10, et IL-13 (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004)(Emmanuel Xystrakis, Dejean, et al. 2004). En outre, les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels présentent une plus forte expression ARNm des cytokines **IFN- γ** , et **TGF β** (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007), ainsi qu'une plus forte expression du facteur de transcription associé aux Tregs **Foxp3** (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007)(G. Han et al. 2007), de **GITR** (glucocorticoid-induced tumour necrosis-factor-receptor related protein) (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007), et de **CTLA-4** (Emmanuel Xystrakis, Dejean, et al. 2004) vs CD8⁺CD45RC^{high} chez le rat. Des observations analogues ont été faites chez l'Homme. Alors que les lymphocytes T CD45RC^{high} et CD45RC^{low} (CD4⁺ et CD8⁺) sont toutes deux capables de produire les cytokines de type Th1 IL-2, IFN- γ , et TNF- α , les cytokines de type Th2 IL-4, IL-5, et la cytokine régulatrice IL-10 sont principalement produites par les lymphocytes T CD45RC^{low}. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ Foxp3⁺ humaines comprennent une majorité de cellules CD45RC^{low} (Ordenez et al. 2009).

Le blocage de l'interaction CD40-CD40L par un AdCD40Ig modifie le phénotype et le profil cytokinique des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels. Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} induits chez des rats transplantés et traités par le CD40Ig présentent une augmentation de l'expression des transcrits CMH II, TGF β , IL-2, CD25 et GITR vs naturels (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). Parmi les Tregs naturels et induits, environ 50% expriment la protéine CD62L, 30% expriment CMH II et/ou CD161, et moins de 10% expriment CD25, OX40, CD103, CD28 (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). L'expression du transcrit Foxp3 n'est pas augmentée par les Tregs induites vs naturels, son expression protéique est observée dans 3% des Tregs induits. Des études sont en cours pour affiner la caractérisation phénotypique de cette population de Tregs induite par CD40Ig, permettant la survie à long terme du greffon (Picarda et al., résultats non publiés).

- Mécanismes de régulation

Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} sont aussi peu décrits fonctionnellement. Peu d'études portent sur les mécanismes d'action des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} naturels. *In vitro*, les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels sont capables d'inhiber la prolifération et la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{high} stimulés de façon semi-allogénique. Ce mécanisme est **indépendant de l'IL-10 ou du TGF β** (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004). De plus, les expériences de culture en « transwell », dans lesquelles les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} sont isolés des lymphocytes T CD4⁺ répondeurs et des cellules stimulatrices, suggèrent un mécanisme de suppression **par contact cellulaire** plutôt que par l'intermédiaire de cytokines (Emmanuel Xystrakis, Dejean, et al. 2004). **Le mécanisme de cytotoxicité a été écarté** (Emmanuel Xystrakis, Dejean, et al. 2004).

La capacité régulatrice des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} peut être augmentée par le blocage de l'interaction CD40-CD40L. En effet, les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} induits par le traitement AdCD40Ig de notre modèle d'étude chez le rat suppriment plus efficacement la réponse lymphocytaire T *in vitro* que les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels. Ils permettent aussi la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque, et surtout, sont capables de transférer itérativement la tolérance par transfert adoptif, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} naturels (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007).

Dans notre modèle de traitement par CD40Ig, le transfert des cellules régulatrices augmente l'expression d'IFN- γ et de **IDO** dans le greffon des receveurs, et le blocage de chacune de ces molécules abroge la prolongation de survie du greffon induite par le transfert adoptif des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). Des expériences *in vitro* confirment les propriétés suppressives de l'IFN- γ , plus connu pour son rôle pro-inflammatoire, et de IDO, et leur implication dans la suppression exercée par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} induits (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007) (Figure 14).

Nous avons aussi montré que les Tregs induits augmentent l'expression de IDO par les pDC (X. L. Li et al. 2010). Les mécanismes de régulation des Tregs induits de notre modèle impliquent les cytokines **FGL2** (fibrinogen-like protein 2) (X. L. Li et al. 2010) (Bézie et al., en révision), **IL-34** (article en préparation), mais **ni l'IL-10 ni le TGF β** (X. L. Li et al. 2010). De plus, de nouvelles expériences de culture en système de transwell, différant de celles

réalisées par Xystrakis et al. par la mise en contact des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ avec des pDC allogéniques mais isolées des lymphocytes T $CD4^+$ répondeurs, montrent la possibilité d'une **suppression à distance**.

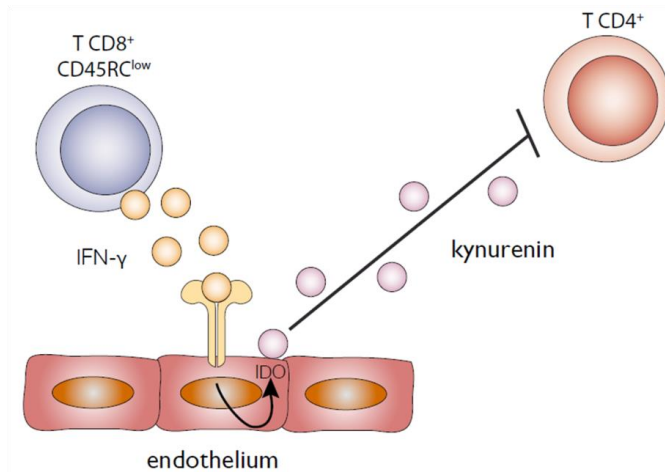


Figure 14. Les lymphocytes Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ augmentent l'expression de IDO par les cellules endothéliales du greffon via l'IFN γ .

Schéma extrait de la thèse de C. Guillonéau. IDO est une enzyme permettant la dégradation du tryptophane en dérivés kynuréniques toxiques pour les lymphocytes T $CD4^+$ médiateurs du rejet d'allogreffe.

L'association du traitement par CD40Ig à des anticorps bloquant le CD28 induit une tolérance (sans rejet chronique) mais indépendante des lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ dont le profil cytokinique est différent du modèle CD40Ig précédent (Guillonéau, Séveno, et al. 2007).

Les données accumulées sur d'autres populations de lymphocytes Tregs $CD8^+$, récemment décrites dans des modèles d'auto-immunité, de tumeur, et de tolérance aux pathogènes et à la greffe, pourraient aider à la compréhension des mécanismes d'action, de l'importance de la spécificité antigénique, et du potentiel des Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ en transplantation d'organes solides (Guillonéau et al. 2010).

- Les autres populations de lymphocytes T $CD8^+$ régulateurs

De nombreuses autres populations de lymphocytes T $CD8^+$ régulatrices ont été décrites chez l'Homme, la souris et le rat (Tableau 8).

Species	Identification	Generation	Phenotypic and function and characterization
Human	CD25+ CD28- Foxp3+ LAG3+ CD45RO+ CD8+ CD45RC^{low} CD8+ CD28+ Foxp3+ CD8 ^{high} CD103+	induced by anti-CD3 mAb Induced by allotransplantation Induced by virus Induced by MTB in vitro induced by pDCs in vivo, ovarian cancer Induced by activated allogeneic pDCs Natural Induced by immature DCs pulsed with MP Induced after allotransplantation Induced by anti-CD3 and TGFβ Induced by CD40 activated B cells Induced by alloantigen	Foxp3+, CTLA4+, CD45RA+ CD27+, Foxp3+ CTLA4+, GITR+, IFN-γ CD25+Foxp3+CCL4+, CD28+, CD62L+ CCR7+ IL-10+, IL-10-dependent IL-10-mediated suppression IL-10 and TGFβ Peptide specific and contact dependent suppression IL-10, TGFβ and CTLA4+ dependent suppression CTLA4+, CD45RO+, CD28+, CD25+, IFN-γ production Foxp3+, CD25+, CD28+, CD62L+, CD45RO+, cell contact-dependent, IL-10, TGFβ, CTLA-4 dependent suppression IL-10 production, cell contact-dependent
Mouse	CD8+ CD8+ CD25+ CD25+ CD28- Foxp3+ CD122+ CD122+ PD1+ CD11c+ Qa-1 restricted CD103 ^{high}	Induced by anti-CD137 and polyI :C Induced by IL-4 IL-12 and dexamethasone Natural Induced by epithelial cells through TGF-β Natural Induced by peptides Natural Natural Induced by anti-ICOSmAb Induced by anti-CD137 Natural Natural	CD103+, IFNγ induced TGF-β-mediated suppression CD45RB+, CD28+, contact dependent, IL-10/TGFβ independent CD44 ^{high} , GITR+, CTLA-4+ CD25+, CD28- CD25+, Foxp3+, TGF-β, IL-10 CD62L+, CD44 ^{low} , CD45RB ^{high} , action through IL-10 and TGFβ TGF-β, suppress anti-DNA IgG production Foxp3-, IL-10 CD44 ^{high} , IL-10 CD45RB+, CD27+, CD45RA+, PD-1+, CD25- IFN-γ and IDO-dependent CD8α+TCRαβ+, killing of CD4+Qa-1+ cells CD44-, TGF-β production
Rat	CD28- CD28- CD8+ CD45RC^{low} CD45RC^{low} CD45RC^{low} CD8+ CD8+ CD8+	Induced by T cell vaccination Induced by DST Induced by oral alloantigen Natural Induced by uveitogenic peptide Induced by CD40lg Induced by UV-B-irradiated DST Induced by DST Induced by oral administration of MBP	Foxp3-, inhibit corneal xenograft rejection Foxp3+, contact-dependent IL-4, prolong graft survival CTLA4+, IL-10, IL-4, IL13, contact-dependent Foxp3+ after stimulation Foxp3-, CD40L-, IFN-γ, IDO, contact dependent and independent Donor-specific unresponsiveness Adoptive transfer of tolerance by CD8+ and CD4+ T cells antigen-driven bystander suppression

Tableau 8. Liste des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ régulateurs

D'après (Ménoret et al. 2011) en annexe.

➤ *Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻*

Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ supprimeurs peuvent être générés après stimulations répétées *in vitro* de cellules mononucléées humaines du sang périphérique par des peptides, des protéines (S Jiang et al. 1998), ou par des CPA allogéniques (Z Liu et al. 1998) ou xénogéniques (Ciubotariu et al. 1998). Leur activation se caractérise par l'augmentation de l'expression de CTLA-4, GITR, CD62L, et de Foxp3 (Scotto et al. 2004). Cependant, l'expression de Foxp3 par les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ du sang périphérique de patients transplantés rénaux stables a été remise en question (Korecka-Polak et al. 2011). Ces lymphocytes Tregs sont restreints aux molécules de CMH de classe I (Z Liu et al. 1998), sont spécifiques d'antigènes et expriment un TCR Vβ limité (S Jiang et al. 1998)(Ciubotariu et al. 1998).

Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ sont capables de supprimer la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ en inhibant la maturation des CPA (Z Liu et al. 1998)(S Jiang et al. 1998)(Ciubotariu et al. 1998). En effet, ces lymphocytes Tregs diminuent ou empêche l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation B7 (Z Liu et al. 1998) et CD40 (S Jiang et al. 1998), et augmentent l'expression des récepteurs inhibiteurs ILT3 et ILT4 (immunoglobulin-like transcript) (C. C. Chang et al. 2002) par les DC, les monocytes et les cellules endothéliales (John S Manavalan et al. 2004). Celles-ci sont alors tolérogènes et inhibent l'expression de CD40L par les lymphocytes T (Ciubotariu et al. 1998), induisent l'anergie des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺CD45RO⁺ et leur conversion en lymphocytes Tregs (John S Manavalan et al. 2003), et amplifient les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻Foxp3⁺ (John S Manavalan et al. 2004).

Les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ sont associés à la tolérance en transplantation. Dans un modèle d'allogreffe hépatique chez le rat, la transfusion du sang du donneur induit des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ dont le transfert adoptif prévient du rejet aigu mais pas du rejet chronique (Y Liu et al. 2007). Selon une autre étude, les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ permettent la tolérance à l'allogreffe intestinale chez le rat (L. Xue et al. 2009). Chez l'Homme, une étude montre la corrélation inverse entre la quantité ainsi que la capacité des lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ circulant du receveur à inhiber l'activation des CPA du donneur, et le rejet de greffe cardiaque, rénale ou hépatique (Ciubotariu et al. 2001). Une autre étude rapporte la présence de lymphocytes T CD8⁺CD28⁻, capables d'augmenter l'expression d'ILT3 et d'ILT4 par les CPA du donneur, dans la circulation périphérique de patients transplantés cardiaques n'ayant pas eu d'épisode de rejet les 6 mois suivants la greffe (C. C.

Chang et al. 2002). Cependant, la présence de lymphocytes T $CD8^+CD28^-$ Foxp3⁻GITR⁻, moins sensibles à l'apoptose que les lymphocytes T $CD8^+CD28^+$, et produisant **la perforine** et le **granzyme A** médiateurs de cytotoxicité, corrèle avec le rejet chronique chez certains patients greffés rénaux (Baeten et al. 2006).

➤ *Les lymphocytes T $CD8^+\alpha\alpha$*

Les lymphocytes T $CD8^+\alpha\alpha$ expriment un récepteur TCR hétérodimérique $\alpha\beta$ et une molécule de $CD8^+$ homodimérique $\alpha\alpha$, et sont restreints à l'épithélium intestinal (Rocha et al. 1991). Ces lymphocytes T régulateurs n'expriment pas Foxp3, surexpriment les récepteurs inhibiteurs des cellules NK et LAG3 (lymphocytes-activation gene 3) (Denning et al. 2007), sécrètent des cytokines de type Th1, excepté l'IL-2 (X. Tang et al. 2006), et sécrètent plus de TGF β et de **FGL2** que les lymphocytes T $CD8^+\alpha\beta$ (Denning et al. 2007).

De façon générale, l'importance des lymphocytes T $CD8^+$ régulateurs a été mis en évidence par la déplétion des lymphocytes T $CD8^+$ dans des modèles d'auto-immunité tels que l'EAE (H Jiang et al. 1992)(Koh et al. 1992). Notamment, le transfert adoptif de lymphocytes T $CD8^+\alpha\alpha$ induit l'apoptose des lymphocytes T $CD4^+$ activés et prévient de l'EAE (X. Tang et al. 2006).

Les lymphocytes T $CD8^+\alpha\alpha$ expriment majoritairement le TCR V β 6 et sont restreints à la molécule de CMH de classe Ib non classique Qa-1. (X. Tang et al. 2007).

Ces Tregs pourraient aussi réguler les cellules NKT (Varthaman et al. 2010).

➤ *Les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$*

Les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ contrôlent l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et des lymphocytes T $CD8^+CD122^-$ *in vivo* et *in vitro* (Rifa'i et al. 2004), et limitent les maladies autoimmunes. En effet, le transfert de lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ prévient de l'EAE induite par la déplétion des cellules $CD122^+$ (Y.-H. Lee et al. 2008), et de la colite induite par le transfert de lymphocytes T $CD4^+CD45RB^{\text{high}}$ (Endharti et al. 2011).

Les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ agissent par la sécrétion d'**IL-10**. La suppression exercée par les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ peut être inhibée par le blocage de l'IL-10 *in vitro* (Endharti et al. 2005). De plus, les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ de souris IL-10^{-/-} ne peuvent prévenir de la colite contrairement aux cellules de souris IL-10^{+/+} (Endharti et al. 2011). Les signaux provenant de CD28 et de PD-1 sont nécessaires pour la production optimale d'IL-10 (H. Dai et al. 2010). Les lymphocytes T $CD8^+CD122^+$ de souris $CD28^{-/-}$ ne sont pas

régulateurs (Z. Shi et al. 2008). De même, les lymphocytes T CD8⁺CD122⁺PD-1⁻ ne seraient pas régulateurs mais mémoires (H. Dai et al. 2010).

Les lymphocytes Tregs CD8⁺CD122⁺ n'existent pas chez l'Homme. Néanmoins, l'expression du **CXCR3** serait presque exclusive des lymphocytes T CD8⁺CD122⁺ vs CD122⁻ et définit chez l'Homme une population de lymphocytes T CD8⁺ aux propriétés régulatrices similaires aux lymphocytes T CD8⁺CD122⁺ de la souris (Z. Shi et al. 2009). Une étude montre d'ailleurs la corrélation inverse des taux d'IL-10 et du ratio de lymphocytes T CD8⁺CXCR3⁺/CD8⁺ avec l'occurrence de l'anémie hémolytique auto-immune (Q. Zhou et al. 2011). Cependant, le marqueur CXCR3 serait insuffisant pour définir une population de cellules régulatrices chez l'Homme (Haruhiko Suzuki et al. 2008).

➤ *Les lymphocytes T CD8⁺CD103^{high}*

L'expression de CD103 et de Foxp3 sont inductibles par la stimulation antigénique et par le TGFβ *in vitro* (Ling Lu et al. 2009). L'expression du CD103 peut aussi être induite par l'IL-4 et l'IL-10, et inhibée par l'IL-12 (Uss et al. 2006). De plus, ces lymphocytes Tregs peuvent être expansés *in vitro* en présence de rapamycine (Uss et al. 2007).

Les lymphocytes T CD8⁺CD103^{high} suppriment la réponse T allogénique par la forte sécrétion d'**IL-10** (Uss et al. 2006), la production d'**IFN-γ** et de **molécules cytotoxiques** (Koch et al. 2008), mais nécessitent un **contact** avec la cellule cible (Uss et al. 2006)(Ling Lu et al. 2009). Ils sont impliqués dans la tolérance. L'expression du marqueur CD103⁺ par les lymphocytes T CD8⁺ est augmentée chez les rats tolérant spontanément l'allogreffe hépatique (Ling Lu et al. 2009), et dans un modèle de tolérance périphérique induite par ACAID (anterior chamber-associated immune deviation)(Keino et al. 2006).

➤ *Les lymphocytes T CD8⁺CD11c⁺*

Le blocage de la molécule de costimulation **CD137** induit l'expansion de lymphocytes T CD8⁺CD11c⁺, supprimant l'arthrite (Seo et al. 2004) et l'uveorétinite expérimentale auto-immune (B. K. Choi et al. 2006) chez la souris, de façon dépendante de l'**IFN-γ** et de l'**IDO**. En effet, comme les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}, les lymphocytes T CD8⁺CD11c⁺ induisent, via IFN-γ, l'expression de la molécule inhibitrice IDO dans les DC.

Commentaire [b4]: idem

3. Les lymphocytes B régulateurs

- Identification

En 1968, il a été montré que le transfert adoptif de splénocytes produisant des anticorps, issus d'animaux immunisés contre les globules rouges de mouton, chez des animaux syngéniques, inhibe la réponse à l'antigène chez les receveurs non immunisés (A. Morris & Möller 1968). Ce fut la première expérience témoignant de l'existence de lymphocytes B régulateurs (Bregs). En 1974, Neta et Katz suggèrent une **régulation des lymphocytes T par des lymphocytes B** pour supprimer les réactions d'hypersensibilité (Neta & Salvin 1974) (Katz et al. 1974). **Le potentiel régulateur des lymphocytes B a ainsi été mis en évidence dans plusieurs modèles de maladies auto-immunes, et caractérisé par la sécrétion d'IL-10 immunosuppressive, d'où leur appellation « B10 ».** Par exemple, il a été montré que les souris déficientes pour la production d'IL-10 par les lymphocytes B développent une EAE (S. D. Wolf et al. 1996)(Fillatreau et al. 2002). De même, les souris CD19^{-/-} ou déplétées en lymphocytes B CD20⁺ présentent des réponses inflammatoires exacerbées (Yanaba et al. 2008)(Matsushita et al. 2008). D'autre part, l'activation de splénocytes par des anticorps anti-CD40 induit une population de lymphocytes B capables de transférer une protection à l'arthrite induite par le collagène, via la production d'IL-10, contrairement aux lymphocytes B de souris IL-10^{-/-} (Mauri et al. 2003). Leur implication dans la colite chez la souris a par ailleurs été étudiée (Atsushi Mizoguchi et al. 2002). Chez l'Homme, des études montrent une moindre production d'IL-10 par les lymphocytes B de patients atteints de sclérose multiple (Duddy et al. 2007) ou de lupus (P. A. Blair et al. 2010).

L'hétérogénéité des lymphocytes Bregs ne permet pas de les distinguer par un seul marqueur, une combinaison de marqueurs est nécessaire. Le marqueur **CD1d** a été associé aux lymphocytes Bregs et à la production d'IL-10 par les Bregs dans plusieurs études (Atsushi Mizoguchi et al. 2002)(J. G. Evans et al. 2007) (P. A. Blair et al. 2010). Le marqueur **CD5** est aussi souvent associé au phénotype des lymphocytes Bregs chez la souris (O'Garra & Howard 1992)(Yanaba et al. 2008; Matsushita et al. 2008) et chez l'Homme (P. A. Blair et al. 2010). Par exemple, la déplétion de lymphocytes B CD1d^{hi}CD5⁺ par des anticorps anti-CD20, avant l'induction de l'EAE, exacerbe la maladie (Matsushita et al. 2008). L'expression de **Foxp3** par les Bregs a aussi été décrite sur une population CD19⁺CD5⁺ chez l'Homme (J. Noh et al. 2010). Le marqueur de maturation **CD138** est exprimé par les cellules B matures régulatrices dans un modèle de souris infectée par la Salmonelle (Neves et al. 2010). De nombreuses populations de lymphocytes Bregs ont été décrites (Tableau 9). Les lymphocytes

Bregs sont aujourd'hui classiquement décrits par les marqueurs CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} chez l'Homme (Kathryn J Wood et al. 2012) et CD1d^{hi}CD21^{hi}CD24^{hi}IgM^{hi}CD19⁺ chez la souris (Mauri & P. A. Blair 2010) (Tableau 9). Cependant, ces marqueurs ne suffisent pas pour définir une population B comme « régulatrice », des études fonctionnelles sont nécessaires.

espèce	phénotype	fonction	référence
souris	CD1d ^{hi} CD21 ^{hi/int} CD62 ^{low} IgM ^{int} CD23 ^{hi}	protection/inflammation chronique intestinale	Mizoguchi 2002
	CD1d ^{hi} CD21 ^{hi} CD23 ⁺ IgM ⁺ AA4.1 ^{int} IgD ⁺ IgM ⁺	protection/arthrite	Evans 2007
	CD19 ⁺ CD1d ^{hi} CD5 ⁺	protection/EAE	Matsushita 2008, Yanaba 2008
Homme	CD19 ⁺ CD38 ^{hi} CD24 ^{hi} CD1d ⁺ CD5 ⁺	protection/SLE	Blair 2010
	CD19 ⁺ CD24 ^{hi} CD27 ⁺	régule la production de TNF α par les monocytes	Iwata 2011
	CD27 ^{hi} CD25 ^{hi} CD86 ^{hi} CD1d ^{hi} TGFb ^{hi} IL10 ^{hi}	inhibition réponse T in vitro	Kessel 2012
	CD19 ⁺ CD5 ⁺ Foxp3 ⁺	allergies alimentaires	Noh 2010
	CD27 ⁺ CD38 ^{+/-} CD1d ⁺ et CD5 ⁺ CD62L Fc γ RIIB ^{hi}	tolérance spontanée	Pallier 2010
	CD19 ⁺ CD27 ⁻ IgD ⁺		Newell 2010
	CD38 ⁺ CD24 ⁺ IgD ⁺		Newell 2010
CD27 ⁻ CD24 ⁺ CD38 ^{hi}	Sagoo 2010		

Tableau 9. Exemples de populations de lymphocytes B régulateurs caractérisés dans des modèles de maladies autoimmunes ou de transplantation (liste non exhaustive).

L'état de maturation des lymphocytes Bregs varie selon les modèles d'étude. Les lymphocytes B **transitionnelles** (immatures) sont capables d'apprêter un antigène et de le présenter sur une molécule de CMH de classe II (fonction CPA). Cependant, la présentation d'antigène par une CPA en absence de signaux de costimulation induit l'anergie des cellules T ou le développement de Tregs. De plus, ces Bregs ne peuvent pas initier l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, ils ne peuvent que soutenir la réponse des lymphocytes T CD4⁺ préactivés (J. B. Chung et al. 2003). De façon intéressante, une étude montre la capacité de l'IL-10 produite par les lymphocytes B à diminuer leur propre expression de B7, telle une boucle de régulation négative (Gillan et al. 2005). Les lymphocytes Bregs **matures** sont autant efficaces. Par exemple, le transfert de lymphocytes B matures permet de réduire le nombre de lymphocytes T CD4⁺ médiateurs de la colite chronique spontanée chez la souris (E Mizoguchi et al. 2000), mais également de neutraliser la réponse immune dans un modèle d'infection chez la souris (Neves et al. 2010).

- Génération de Bregs

L'origine des lymphocytes Bregs naturels est inconnue. Selon l'hypothèse de Claudia Mauri, dans les ganglions lymphatiques, la liaison d'un TLR des lymphocytes B en phase transitionnelle tardive induirait la sécrétion d'IL-10, renforcée après liaison du CD40, du BCR et de B7 aux lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes B se différencieraient ensuite en périphérie, expliquant les divers phénotypes décrits (Mauri & Bosma 2012). Des lymphocytes Bregs peuvent être induits. L'administration de corps apoptotiques induit des lymphocytes B10 CD19⁺ prévenant de l'arthrite induite par le collagène chez la souris, et capables de transmettre la tolérance par transfert adoptif (M. Gray et al. 2007). La fonction des lymphocytes B est dépendante de la signalisation induite par les **TLR** dont certains (TLR2, TLR4) sont nécessaires pour supprimer la réponse Th1 et Th17 (Lampropoulou et al. 2008). Une étude récente montre notamment le rôle de DC CD11b^{hi}Ia^{low} régulatrices, capables d'induire la différenciation de lymphocytes B spléniques en lymphocytes B régulateurs CD19^{hi}RFcγIIB^{hi}IL10⁺, via l'**IFNβ** et le **CD40L** (L. Qian et al. 2012). Les lymphocytes Bregs IL-10 peuvent aussi être induits par **GIFT15** (combinaison de GM-CSF et IL-15) (Rafei et al. 2009), ou par le **TNF-α** qui favorise le développement de la tumeur via les lymphocytes Bregs (Schioppa et al. 2011). **L'induction de Bregs par des lymphocytes Tregs reste à étudier.**

- Mécanismes d'action des Bregs

De nombreuses études ont montré les propriétés suppressives de **l'IL-10** sur les lymphocytes T, dont l'expression par les lymphocytes B dépend du CD1d, de TIM, de l'activation par le BCR, le CD40 ou les TLR (Fillatreau et al. 2002; Mauri et al. 2003; P. A. Blair et al. 2010; Yohei Iwata et al. 2011; Atsushi Mizoguchi et al. 2002; B. Shi et al. 2011; S. Xiao et al. 2012; J. G. Evans et al. 2007; Carter et al. 2011) (Figure 15, n°1). L'IL-10 sécrétée par les cellules Bregs peut inhiber la différenciation et la prolifération de lymphocytes Th1 et Th17 (J. G. Evans et al. 2007; Carter et al. 2011) (Figure 15, n°1a) ainsi que la sécrétion de cytokines par les DC (Moulin et al. 2000) (Figure 15, n°1b). Dans d'autres modèles, **le TGFβ** est un médiateur important de la suppression des lymphocytes Bregs, induisant l'apoptose des lymphocytes Th1 et/ou l'inhibition des CPA (J. Tian et al. 2001) (Figure 15, n°2), l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ (Parekh et al. 2003), ou encore la suppression des cellules polynucléaires neutrophiles et des cellules NK, dans un modèle d'infection par *Salmonella typhimurium* (Neves et al. 2010). **La galectine-1** pourrait aussi être un médiateur de l'apoptose des lymphocytes T induites par les lymphocytes B (Zuñiga et al. 2001).

Les lymphocytes Bregs peuvent aussi agir par contact cellulaire. La voie **Fas/FasL** est effectivement importante pour l'induction de la tolérance à l'allogreffe de peau chez la souris par transfusion du sang du donneur (Minagawa et al. 2004) (Figure 15, n°3).

L'interaction entre les molécules de costimulation CD40 et CD40L semble importante pour la fonction régulatrice des lymphocytes B. En effet, les lymphocytes B de souris CD40^{-/-} produisent moins d'IL-10, développent une réponse anti-tumorale plus forte (S. Inoue et al. 2006), et sont incapables de transférer la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Niimi et al. 1998). Néanmoins, alors qu'une tumeur régresse de façon spontanée dans un modèle de souris déficientes en lymphocytes B, le transfert de lymphocytes B CD40^{-/-} suffit à restaurer la « tolérance » à la tumeur (Shah et al. 2005). Ceci suggère que l'interaction CD40-CD40L n'est pas la seule intervenant dans l'activation des lymphocytes Bregs. Effectivement, leur capacité à supprimer est parfois directement liée à l'expression de la molécule de costimulation B7. Le transfert de lymphocytes B matures permet de réduire le nombre de lymphocytes T CD4⁺ médiateurs de la colite chronique spontanée chez la souris, de façon dépendante des molécules CD40 et CD86 (E Mizoguchi et al. 2000). Blair et al. ont aussi montré que les lymphocytes B CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}IL10⁺ suppriment la différenciation des lymphocytes Th1 de façon dépendante de CD80 et CD86, après stimulation du récepteur CD40 (P. A. Blair et al. 2010). D'autre part, l'expression de B7 par les lymphocytes Bregs est aussi nécessaire pour le développement des lymphocytes Tregs, car le retard de développement des Tregs Foxp3⁺ chez les souris IL-10^{-/-} peut être restauré par le transfert de lymphocytes Bregs IL-10^{+/+}, sauf s'ils sont B7^{-/-} (M. K. Mann et al. 2007) (Carter et al. 2011).

Ainsi, outre leur capacité suppressive directe, **les lymphocytes Bregs favorisent la génération de lymphocytes Tregs** (Figure 15, n°4). En effet, les lymphocytes Bregs sont capables de générer des lymphocytes Tregs Foxp3⁺ dans un modèle d'inflammation des voies aériennes induite par un allergène (Amu et al. 2010) et dans un modèle de tumeur chez la souris (Tadmor et al. 2011). Chez l'Homme, les Bregs peuvent augmenter l'expression de Foxp3 par les Tregs CD4⁺ (A. Kessel et al. 2011), différencier des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ naifs allogéniques en lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Tu et al. 2008), ou encore expandre les lymphocytes Tregs CD4⁺Foxp3⁺ *ex vivo* (L. C. Chen et al. 2009). Les lymphocytes B seraient d'ailleurs plus efficaces pour induire l'expansion des lymphocytes Tregs que les pDC immatures (J. Zheng et al. 2010). D'autre part, il a été montré que le co-transfert de lymphocytes B avec des lymphocytes TCD8⁺α ou des lymphocytes T CD4⁺CD45RB^{hi} induit une protection contre la colite chez la souris, corrélant avec

l'expansion de lymphocytes T $CD3^+CD4^+CD8^-NK1.1^+$ dans les organes lymphoïdes secondaires et des lymphocytes T $CD4^+CD8\alpha^+$ dans l'épithélium intestinal (B. Wei et al. 2005). La différenciation de lymphocytes **Tr1** producteurs d'IL-10 à partir de lymphocytes T $CD4^+$ peut également être induite par des lymphocytes B activés par un ligand du TLR2 (Sayi et al. 2011). Enfin, les lymphocytes B peuvent induire l'**anergie des T $CD8^+$** autoréactifs chez la souris (Werner-Klein et al. 2007). L'expansion de lymphocytes T $CD8^+$ corrèle avec la protection contre la colite induite par les Bregs chez la souris. En effet, les Bregs $CD19^+IL10^+$ des ganglions mésentériques suppriment l'inflammation systémique en activant et stimulant l'expansion des lymphocytes T $CD8^+$ (sécrétants de $TNF-\alpha$, $IFN\gamma$, et d'IL-2), de façon dépendante du complexe CMH-I/peptide et de l'IL-10 (B. Wei et al. 2008).

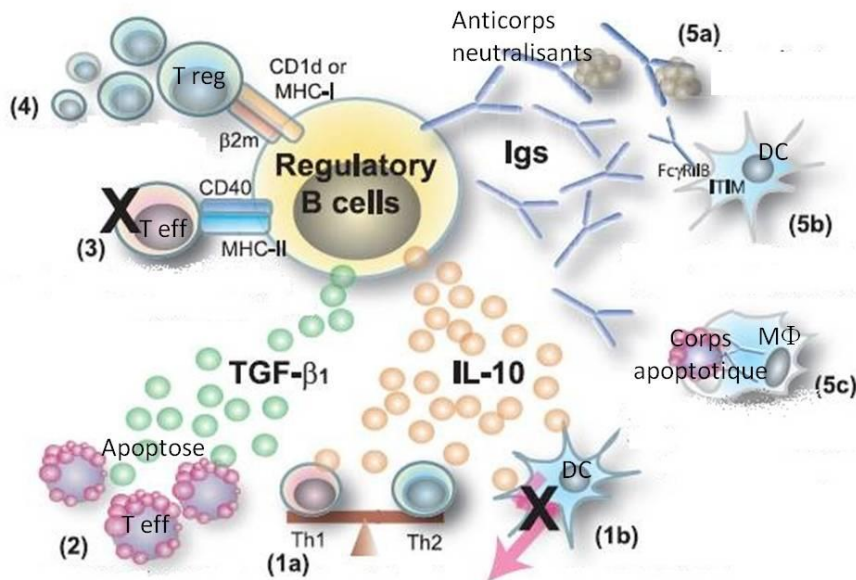


Figure 15. Mécanismes d'action des lymphocytes B régulateurs

D'après (Atsushi Mizoguchi & Atul K Bhan 2006). Les lymphocytes Bregs agissent par la production d'IL-10 qui dévie la réponse immune vers un profil Th2 (1a), et inhibe la sécrétion de cytokines par les DC (1b); par la production de $TGF\beta$ induisant l'apoptose des lymphocytes T effecteurs (2); par l'inhibition des lymphocytes T activés par contact ou via les DC (3); par le recrutement des Tregs (4); par la production d'anticorps neutralisant les facteurs solubles (5a) et l'activation des DC par le récepteur inhibiteur $Fc\gamma RIIB$ (5b) et par la clairance des corps apoptotiques source d'antigènes pour l'activation de lymphocytes T (5c).

- Rôle en transplantation

En transplantation, plusieurs traitements ont induit une prolongation de la survie de l'allogreffe via la génération de lymphocytes B régulateurs chez la souris. En effet, le traitement par des anticorps **anti-CD45RB** induit la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez la souris via des lymphocytes B (Shaoping Deng et al. 2007) de façon dépendante de l'interaction ICAM-1 / LFA1b (Xiaolun Huang et al. 2008). L'administration d'un anticorps de faible affinité pour TIM-1 permet aussi la tolérance à l'allogreffe chez la souris via l'augmentation de l'expression d'IL-10 par les lymphocytes Bregs, orientant la réponse immune vers un profil Th2 (Q. Ding et al. 2011). Une équipe du laboratoire a montré qu'un court traitement par le LF15-0195 induit la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat par la génération de lymphocytes Tregs CD4⁺ mais aussi de Bregs, bloqués dans leur commutation isotypique IgM / IgG, surexprimant BANK-1 (B-cell scaffold protein with ankyrin repeat) et FcγRIIB, induisant une déviation des allo-anticorps vers un profil Th2, infiltrant le greffon et capables de transmettre la tolérance lors d'un transfert adoptif (L. Le Texier et al. 2011). Des anticorps protecteurs vis-à-vis du greffon peuvent aussi induire l'expression de cytokines immunorégulatrices dans le greffon (Figure 15, n°5).

Les études réalisées chez l'Homme montrent que les patients greffés rénaux opérationnellement tolérants sans traitement immunosuppresseur présentent une augmentation du nombre absolu et de la proportion de lymphocytes B en périphérie, de phénotype activé (CD80/86, CD40, CD62L), mémoire (CD27⁺, CD38^{+/-}), CD1d⁺ et CD5⁺, et surexprimant FcγRIIB (Annaick Pallier et al. 2010). D'autres études confirment l'augmentation du nombre de lymphocytes B périphériques chez les patients opérationnellement tolérants greffés rénaux et décrivent un phénotype transitionnel ou naïf. En effet, Porcheray et al. ont montré une forte proportion de lymphocytes B transitionnels en périphérie lors de la reconstitution des lymphocytes B par greffe de moelle osseuse (Porcheray et al. 2009). Par ailleurs, Newell a décrit un nombre élevé de lymphocytes B naïfs CD19⁺CD27⁻ IgD⁺ et transitionnels CD38⁺CD24⁺IgD⁺ dans le sang périphérique des patients transplantés rénaux tolérants (K. A. Newell et al. 2010). Bien qu'aucune différence dans le compartiment de lymphocytes B « matures naïfs » CD27⁻CD24^{int}CD38^{int} ne soit visible, l'augmentation des lymphocytes B transitionnels CD27⁻CD24⁺CD38^{high} et la diminution de la population de lymphocytes B mémoires CD27⁺CD24⁺ IgD⁻CD38^{-int} sont associées à de faibles taux d'anticorps anti-donneur et à la surexpression de Foxp3 chez les patients greffés rénaux tolérants (Sagoo et al. 2010). Ces observations corrélerent avec l'effet des

immunosuppresseurs sur la population lymphocytaire B. En effet, les traitements par l'alemtuzumab, le tacrolimus ou le sirolimus induisent une augmentation transitoire des lymphocytes B transitionnels et une augmentation durable des lymphocytes B naïfs, capables de proliférer et de produire des IgM mais pas d'IgG chez les patients greffés rénaux (Heidt et al. 2012).

Des puces à ADN ont permis d'étudier les gènes différentiellement exprimés chez les patients présentant une tolérance opérationnelle spontanée, comparés aux patients présentant un rejet chronique. Peu de gènes communs aux différentes études ont été relevés, en raison des différents organes greffés, des groupes de patients, des protocoles et des analyses réalisées. En effet, Martinez-Llordella et al. ont étudié les patients greffés hépatiques (M Martínez-Llordella et al. 2007)(Marc Martínez-Llordella et al. 2008), alors que Braud et Brouard ont étudié des patients greffés rénaux (Braud et al. 2008; Sophie Brouard et al. 2007). Néanmoins, le marqueur **CD20** semble important car il est surexprimé chez les patients tolérants des études de Braud, Newell et Martinez. D'autre part, Brouard et al. ont mis en évidence la surexpression de **Foxp3** et de **GITR** chez les patients tolérants et, bien qu'il régule 27% des gènes différentiellement exprimés entre les patients tolérants et ceux en rejet chronique, aucune modulation de l'expression du **TFGβ** n'est observée (Sophie Brouard et al. 2007). Effectivement, selon les résultats de Sagoo, les lymphocytes B des patients tolérants ne surexpriment pas le TGFβ comparés aux lymphocytes B des patients en rejet chronique (Sagoo et al. 2010). De même, l'analyse de Newell ne montre pas de surexpression du TGFβ mais une forte production d'**IL-10** (K. A. Newell et al. 2010). Cependant, pour Pallier et al., les lymphocytes B des patients tolérants n'ont pas de profil cytokinique distinctif (Annaick Pallier et al. 2010).

4. Les cellules dendritiques tolérogènes

Les DC ont un rôle primordiale dans la tolérance centrale et périphérique. En effet, les lymphocytes T autoréactifs meurent par apoptose lors de la délétion clonale induite par les DC dans le thymus (T Brocker et al. 1997). Par ailleurs, la déplétion des DC induit une auto-immunité, montrant leur implication dans le maintien de la tolérance périphérique (Ohnmacht et al. 2009).

Le phénotype immature des DC est souvent associé à une réponse tolérogène. Notamment en condition de repos immunitaire, les DC immatures ou semi matures capturent des corps apoptotiques provenant de cellules du soi en renouvellement, migrent dans les

ganglions drainants et inactivent les lymphocytes T spécifiques de ces antigènes (F. P. Huang et al. 2000). La faible densité de molécule B7, l'absence de production d'IL-12, et parfois la sécrétion de l'interleukine suppressive IL-10 par les DC immatures induisent l'anergie des lymphocytes T et la génération de lymphocytes Tregs, et suppriment les réactions d'hypersensibilité (Mahnke et al. 2003). En transplantation, elles sont tolérogéniques. Par exemple, l'injection de DC du donneur n'exprimant pas la molécule de costimulation B7 (F. Fu et al. 1996), ou l'injection de DC dérivées de la moelle osseuse par de faibles doses de GM-CSF et résistantes à la maturation (M B Lutz et al. 2000), permet de prolonger la survie d'allogreffe cardiaque chez la souris. D'autre part, l'injection de DC autologues immatures combinée à une immunosuppression sous-optimale induit l'expression d'IFN- γ dans les Tregs CD3⁺CD4⁻CD8⁻ via Ebi3, et la survie à long-terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat (M Hill et al. 2011). Chez l'Homme, l'injection de DC matures augmente rapidement la réponse lymphocytaire T, alors que l'injection de DC immatures inhibe la réponse T CD8⁺, augmente le taux d'IL-10 et réduit le taux d'IFN- γ (Dhodapkar et al. 2001). De façon intéressante, le transfert de DC semi-matures semble plus efficace pour prolonger la survie d'allogreffe intestinale chez le rat, comparées aux DC matures ou immatures (X.-J. Yang et al. 2011). Elles permettent aussi l'expansion de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de macaque *in vitro* (Aurélié Moreau et al. 2008). Lorsqu'elles sont incapables de produire des cytokines proinflammatoires, les cellules dendritiques matures peuvent, de même, induire des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (A. Jiang et al. 2007) (Kleijwegt et al. 2011).

Les propriétés tolérogènes des DC plasmacytoïdes sont largement décrites. Par exemple, les pDC peuvent créer un microenvironnement favorable au développement de tumeurs chez la souris (M. D. Sharma et al. 2007), peuvent induire la génération de Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris (Ochando et al. 2006), et stimulent les capacités suppressives des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} dans notre modèle de survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat induite par le traitement par AdCD40Ig (X. L. Li et al. 2010). **Les pDC tolérogènes seraient plus efficaces que les cDC pour stimuler les lymphocytes Tregs.** Les pDC matures sont capables de stimuler la prolifération et d'abroger l'anergie de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, par contact cellulaire et de façon partiellement dépendante de CD86, contrairement aux cDC matures et immatures et aux pDC immatures (Ouabed et al. 2008). Les pDC du donneur permettent une suppression plus efficace par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} du receveur, comparées aux cDC, et interagissent de façon privilégiée avec les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} chez le rat (X. L.

Li et al. 2010). Chez l'Homme, une augmentation du ratio de pDC/cDC, de l'expression de PDL-1 par les pDC, et de la population de lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ est constatée chez les patients greffés hépatiques tolérants vs sous immunosuppression chronique ou constante (Tokita et al. 2008). Les pDC tolérogènes auraient donc un rôle primordial dans la fonction régulatrice des lymphocytes Tregs.

Les DC induisent différents types de cellules régulatrices, telles que les lymphocytes Tr1 (Jonuleit et al. 2000), les lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, et les cellules iNKT (Molano et al. 2008), via notamment le $TGF\beta$ qui est un médiateur des DC $CD103^+$ pour l'induction de Tregs $Foxp3^+$ (Coombes et al. 2007). Les DC tolérogènes peuvent aussi exprimer la molécule IDO, suite à l'interaction avec une cellule Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Andrew L Mellor & David H Munn 2004) ou $CD8^+CD45RC^{low}$ (X. L. Li et al. 2010), impliquée dans le développement de la tumeur (M. D. Sharma et al. 2007) ou dans la survie de l'allogreffe cardiaque (X. L. Li et al. 2010). IDO est une enzyme qui dégrade le tryptophane produisant des dérivés kynurénines toxiques pour les lymphocytes T. Ainsi, les dérivés du tryptophane ainsi que la diminution du tryptophane induisent l'apoptose des lymphocytes T $CD4^+$ (F Fallarino et al. 2002) (Andrew L Mellor & David H Munn 2004) (Figure 16).

Les lymphocytes Tregs sont aussi capables de rendre les DC tolérogènes. Par exemple, une étude montre que des lymphocytes Tregs humaines induites par des DC tolérogènes réduisent des DC pro-inflammatoires en DC matures tolérogènes (Kleijwegt et al. 2011). Les lymphocytes T régulateurs pourraient aussi être impliqués dans le contrôle du développement des cDC (Kang Liu et al. 2009). Des cytokines, telles que l'**IL-10** (Steinbrink et al. 1997) et HO-1 (hème oxygénase 1) (Christine Chauveau et al. 2005), ou les cytokines induisant **IDO** telles que PGE2 (prostaglandine E2), **IFN- γ** , et CTLA-4, ou encore l'activation de certains récepteurs exprimés par les DC peuvent les rendre tolérogènes. Par exemple, l'activation du **Fc γ RIIB** sur les DC inhibe l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ et de lymphocytes Th1 effecteurs, limite la différenciation en lymphocytes Th1 et l'accumulation de lymphocytes T mémoires (Desai et al. 2007). D'autre part, l'expression des récepteurs ILT-3 et ILT-4, induite par l'interaction avec les lymphocytes T $CD8^+CD28^-$ ou par IL-10 et IFN- γ , confèrent aux DC la capacité de rendre les lymphocytes T $CD4^+$ mémoires anergiques et régulateurs (John S Manavalan et al. 2003). Le récepteur tyrosine kinase Mer (MerTK) est aussi important pour

limiter le diabète auto-immun chez la souris NOD via la régulation de DC $CD11c^+CD8\alpha^+$ (Wallet et al. 2008).

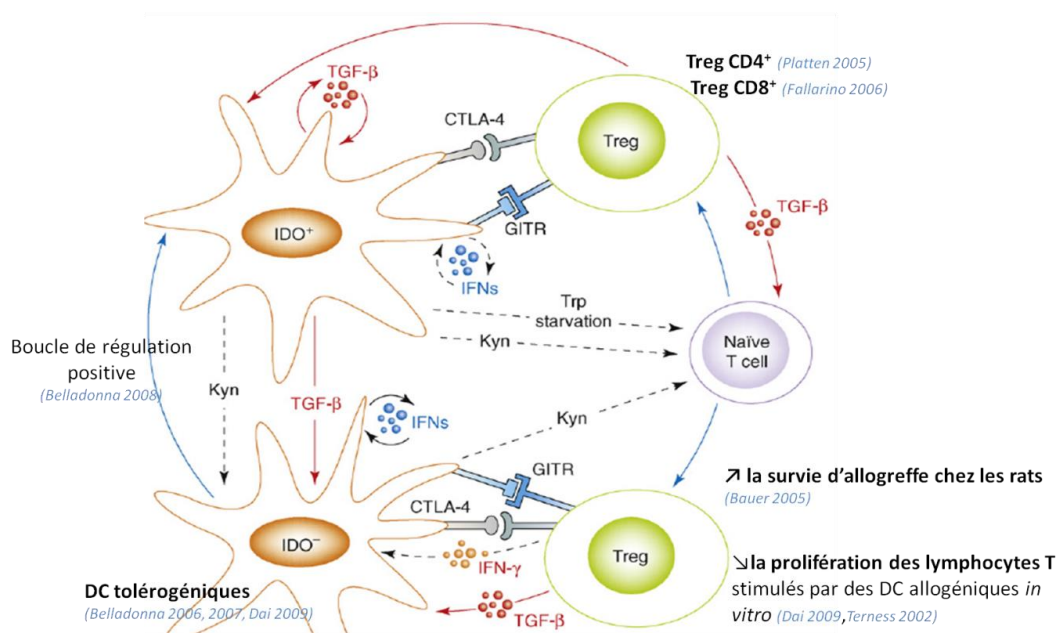


Figure 16. Les DC IDO^+ favorisent la génération de Tregs.

D'après (Maria L Belladonna et al. 2009). L'expression d' IDO par les DC dépend du $TGF\beta$ et des IFN de type I et γ du microenvironnement. IDO est une enzyme impliquée dans la dégradation du tryptophane en catabolites tels que la kynurénine, l'acide hydroxyanthranilique, et l'acide quinolique. Les kynurénines (Kyn) et la pénurie de tryptophane favorisent la déviation des lymphocytes T effecteurs en régulateurs. Par ailleurs, les DC IDO^+ , via les kynurénines, recrutent les DC IDO^- , capables de produire les kynurénines par d'autres voies enzymatiques et de participer à la déviation Tregs. Les lymphocytes Tregs sécrètent du $TGF\beta$ et des $IFNs$, de façon directe ou via les DC dépendamment des interactions $CTLA-4/B7$ et $GLTR/GITR-L$, qui stimulent la production de IDO , amplifiant le système.

Dans le laboratoire, plusieurs modèles de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat reposent sur l'induction de DC tolérôgènes. Le traitement par transfusion du sang du donneur requiert la présence des DC du donneur dans le greffon (R Josien, M Heslan, et al. 1998), et le traitement par le LF15-0195 induit l'expansion de lymphocytes Tregs du receveur par les DC du donneur (Elise Chiffolleau et al. 2002). Dans notre modèle, le traitement par AdCD40Ig induit la survie à long-terme du greffon par la génération de lymphocytes Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$, dont la fonction suppressive est étroitement liée aux pDC. En effet, *in vitro*,

les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} nécessitent un contact avec les pDC et inhibent la prolifération de lymphocytes T allo-stimulés via la production de IDO par les pDC. *In vivo*, la colocalisation des pDC avec les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} et la nécessité de IDO dans le maintien de la survie du greffon témoignent de la tolérogénicité des pDC (Guillonau, Marcelo Hill, et al. 2007).

5. Macrophages activés de façon alternative

Les macrophages sont connus pour leur rôle cytotoxique envers les pathogènes intracellulaires. Cependant, des macrophages aux propriétés régulatrices ont aussi été décrits dans le placenta (Mues et al. 1989), les poumons (Holt et al. 1988) et le foie fœtal (M. D. Chang et al. 1993). Ces fonctions opposées ne sont pas le résultat d'une différenciation mais d'une plasticité qui leur permet d'adapter leur phénotype et leur fonction selon l'environnement (Broichhausen et al. 2012). Ainsi, on distingue les **macrophages activés de façon classique** (CAM) par les cytokines de type Th1, telles que l'IFN- γ ou le LPS, sécrèteurs de TNF- α et de MMP-7 (matrix metalloproteinase 7), et de fonction pro-inflammatoire (Schebesch et al. 1997) (E. Song et al. 2000), **des macrophages activés de façon alternative** (AAM) par les cytokines de type Th2 telles que l'IL-3 et l'IL-4, l'IL-10 (Tzachanis et al. 2002), ou par les glucocorticoïdes (Schebesch et al. 1997), sécrèteurs d'IL-10, de TGF β , PDGF-AA (platelet-derived growth factor AA) et -BB (E. Song et al. 2000), et de fonction régulatrice. Les AAM peuvent aussi être induits par le blocage de l'interaction B7/CD28 dans une coculture de PBMC humains (Tzachanis et al. 2002), ou par coculture de monocytes / macrophages avec des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺CD127^{low}Foxp3⁺ produisant des cytokines anti-inflammatoires IL-10, IL-4 et IL-13 (Tiemessen et al. 2007).

Comparés aux CAM, les AAM ont une plus faible capacité à présenter les antigènes aux lymphocytes T et à sécréter des cytokines pro-inflammatoires en réponse au LPS (M. D. Chang et al. 1993)(Tzachanis et al. 2002)(Tiemessen et al. 2007). En revanche, elles sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ en réponse aux mitogènes (Schebesch et al. 1997), de les rendre anergiques (Tzachanis et al. 2002), et même de les convertir en lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (G. Liu et al. 2011), via la sécrétion d'IL-10, d'inhiber la fonction CPA des DC (Holt et al. 1988), et de favoriser la fibrogénèse (E. Song et al. 2000).

Les AAM sont associés à la tolérance. Il a notamment été décrit que les lymphocytes B10 polarisent les macrophages en M2 (ou AAM) retrouvés dans les tumeurs (S.-C. Wong et al.

2010). En transplantation, les macrophages présents dans les greffons abimés par l'ischémie-reperfusion sont souvent marqueurs du rejet (Ajda Tahereh Rowshani & Vereyken 2012). Cependant, il est montré par ailleurs que les AAM atténuent les lésions dues à l'ischémie-reperfusion, les réactions de rejet, et la fibrose dans l'allogreffe. Par exemple, le traitement des donneurs par injection d'IL-4 induit l'infiltrat du foie par les AAM principalement, et prolonge la survie d'allogreffe hépatique chez le rat (C. Wang et al. 2010). Contrairement aux DC, l'absence de macrophages chez la souris recevant une allogreffe de cellules hématopoïétiques favorise l'expansion des lymphocytes T du donneur et aggrave la GVHD, alors que l'expansion des macrophages par administration du M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) réduit l'expansion des lymphocytes T et limite la GVHD (D. Hashimoto et al. 2011). Mais surtout, l'administration de macrophages régulateurs aux patients transplantés rénaux permet la survie du greffon sans signe de rejet un an après la greffe sous immunosuppression réduite (Hutchinson et al. 2011). **Aujourd'hui, les stratégies thérapeutiques envisagées sont la repolarisation in-situ vers un phénotype régulateur, et la thérapie cellulaire par la génération *ex-vivo* de macrophages régulateurs** (Broichhausen et al. 2012).

6. Application clinique en transplantation

Notre objectif en transplantation est d'améliorer les traitements, la qualité de vie des patients transplantés, de réduire la dépendance aux immunosuppresseurs. Les études fondamentales sur les cellules régulatrices et les résultats encourageants obtenus chez l'animal nous permettent aujourd'hui d'envisager **une application clinique par thérapie cellulaire**. Un projet international, **The ONE Study**, a été fondé par la commission européenne. Il s'agit d'une approche unifiée pour évaluer l'immunothérapie cellulaire en transplantation d'organes solides. Notre laboratoire participe à cette étude de phase I/II. Les cellules régulatrices humaines T CD4⁺Foxp3⁺, les Tr1, les DC (telles que les DC dérivées de monocytes et cultivées à de faibles doses de GM-CSF) ainsi que les macrophages régulateurs, seront injectées à des patients insuffisants rénaux recevant une première transplantation à partir de donneur vivant, et testés pour leur efficacité et leur toxicité, sous traitement immunosuppresseur minime.

7. Le transfert de gènes en transplantation

Le transfert de gènes est devenu un outil essentiel tant pour des études fondamentales que pour la recherche à visée thérapeutique.

Il existe différents vecteurs permettant le transfert de gènes. Les plus efficaces pour transporter un gène d'intérêt sont les vecteurs viraux. Ceux-ci sont non-réplicatifs, et diffèrent par la taille du transgène que l'on peut y insérer, leur tropisme, leur capacité à s'intégrer dans le génome, et leur immunogénicité (Tableau 10).

	taille de l'insert	infection de cellules quiescentes	intégration dans le génome	immunogénicité de la capsid	immunogénicité du produit du transgène
oncorétrovirus	7-8kb	-	+	+	+++
lentivirus		+			
adénovirus	30kb	+	-	++	+++
AAV	4,5kb	+	+/-	++	+

Tableau 10. Caractéristiques des vecteurs viraux les plus couramment utilisés en transfert de gènes

Contrairement au transfert de gène, le traitement par administration de protéines nécessite des injections répétées de fortes doses, impliquant une production de protéine à grande échelle et une stimulation de la réponse immunitaire. Le transfert de gènes en allo-transplantation d'organes solides est une alternative au traitement par administration de protéine dans des modèles expérimentaux.

- Stratégies d'induction de tolérance périphérique

Des stratégies expérimentales visant à bloquer les voies de costimulation peuvent être testées par le transfert de gènes. Par exemple, le blocage de l'interaction B7/CD28 par administration de la molécule soluble CTLA4Ig, correspondant à la partie extracellulaire du domaine de CTLA-4 fusionnée à une IgG1, a fait ses preuves quant à la survie du greffon, dans des modèles d'allogreffes cardiaque (Bolling et al. 1994) et rénale (M H Sayegh et al. 1995) chez le rat, et d'allogreffes d'îlots pancréatiques humains chez la souris (Lenschow et al. 1992). De façon intéressante, des études ont montré que l'expression de CTLA4Ig au moyen d'un adénovirus recombinant (AdCTLA4Ig) injecté en systémique, permet la survie infinie de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Kita et al. 1999) et serait plus efficace que l'administration de la protéine (C Guillot et al. 2000). Dans notre modèle, le blocage de l'interaction CD40-CD40L au moyen d'un adénovirus induit la survie à long-terme de

l'allogreffe cardiaque chez le rat (Cécile Guillot et al. 2002). De plus, le transfert de gènes permet l'expression de plusieurs transgènes à partir d'un même vecteur, tels que l'AdCTLA4-CD40L, induisant une meilleure survie de l'allogreffe rénale chez le rat comparée à l'expression des deux gènes seuls (P.-X. Tian et al. 2006).

Des molécules immunorégulatrices peuvent aussi être surexprimées chez le receveur par transfert de gène. Par exemples, l'infection systémique par un retrovirus recombinant pour IL-10 (L. Qin et al. 1995)(L. Qin et al. 1996) prolongent la survie de l'allogreffe cardiaque chez la souris ; l'infection par un adénovirus recombinant pour IL-13 (AdIL-13) réduit les lésions hépatiques (B. Ke et al. 2003) et rénale (Sandovici et al. 2007) chez le rat ; le traitement par un virus adéno-associé recombinant pour IL-27 (AAVIL-27) combiné à une immunosuppression courte prolonge la survie d'allogreffe cardiaque chez le rat (L. L. Texier et al. 2012), et la délétion du gène IDO prévient de la tumeur chez la souris (M. D. Sharma et al. 2007), alors que le vecteur adéno-viral recombinant pour IDO (AdIDO), pour TGF β (R Josien, Douillard, et al. 1998), ou pour l'IL-10 (David et al. 2000), permet de prolonger la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). Dans ce travail de thèse, l'infection systémique du receveur par un AAVFGL2 (Bézie, en révision) ou un AAVIL-34 (Bézie, en préparation) prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat.

L'inhibition de molécules d'adhésions (ICAM (Poston et al. 1999)), **de cytokines proinflammatoires** (par l'expression du récepteur au TNF- α sous forme soluble (Yoshizumi et al. 2006)), l'inhibition **de chimiokines** (MCP1 (S Fleury et al. 2006)), **ou la surexpression de molécules anti-apoptotiques** (telles que HO-1 (Christine Chauveau et al. 2002) ou Bcl2 (Kienle et al. 2005)), sont autant de stratégies utilisées en transfert de gènes pour atténuer les lésions de rejet en transplantation.

- Expression ciblée du transgène

L'immunogénicité et les effets secondaires du transgène peuvent être minimisés par l'utilisation d'un promoteur spécifique d'un type tissulaire, ou la transduction de l'organe ou des cellules avant leur transplantation pour limiter l'expression aux cellules cibles, non CPA.

Dans certains modèles, l'expression locale du transgène dans le greffon suffit à prolonger sa survie. Par exemple, la perfusion *ex vivo* de l'organe avant sa transplantation a montré qu'une expression locale de CTLA4Ig est suffisante pour induire la survie infinie de l'allogreffe cardiaque (Z. Yang et al. 1999) et hépatique (Olthoff et al. 1997) chez le rat, et pour prolonger

la survie d'allogreffe d'îlots pancréatiques chez le rat (Thomas Laumonier et al. 2003), et cardiaque chez la souris (Zongyou Chen et al. 2003), de la xéno greffe d'îlots de rats chez la souris (S. Feng et al. 1999), ou encore d'hépatocytes humains chez le rat (Y.-K. Chen et al. 2012). De même, l'infection du cœur du donneur par un AdPDL-1 avant transplantation inhibe le rejet aigu de l'allogreffe chez le rat (Dudler et al. 2006) ; la perfusion du greffon par des liposomes recombinants pour IL-10, de même que l'infection du greffon par AdIL-10 ou par un AAVIL-10 deux mois avant transplantation, prolongent la survie de l'allogreffe cardiaque chez la souris (DeBruyne et al. 1998) et le lapin (Brauner et al. 1997), et de l'allogreffe rénale chez le rat (B. Chen et al. 2007) respectivement ; le traitement par AdTGF β protège l'allogreffe cardiaque chez le lapin (Brauner et al. 1997) ; et une étude montre que les infections locale et systémique par AdIL-13 ont le même effet protecteur sur l'allogreffe rénale chez le rat (Sandovici et al. 2007). Dans notre modèle, l'injection d'AdCD40Ig (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007), AdTGF β (R Josien, Douillard, et al. 1998), AdCTLA4-Ig (C Guillot et al. 2000), AdIL-10 (David et al. 2000), AdHO-1 (Christine Chauveau et al. 2002) ou d'un AdIDO (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007) dans le greffon le protège du rejet aigu.

Parfois, l'expression d'une molécule immunosuppressive dans certaines populations de cellules suffit à prolonger la survie du greffon. Notamment, l'expression de CTLA-4 dans une population de DC augmente leur potentiel tolérogène et leur survie chez un receveur allogénique (L Lu et al. 1999). De même, l'infection de DC par AdPDL-1 avant transplantation prolonge la survie d'allogreffe de rein chez le rat (W. Peng et al. 2011). Bien qu'une étude ait montré que l'infection de DC avec un AdIL-10 accélère le rejet d'allogreffe cardiaque chez la souris (W. C. Lee et al. 2000), elle protège l'allogreffe de peau chez la souris humanisée (Coates et al. 2001) et prolonge la survie d'allogreffe intestinale chez la souris (M. Zhu et al. 2003). Enfin, la transduction de lymphocytes T CD4⁺ par un AdIL-10 avant leur transfert chez le receveur protège l'allogreffe de peau chez la souris (Miyamoto et al. 2005). On peut donc imaginer, suite aux résultats obtenus pendant cette thèse, transduire des lymphocytes B naïfs par un AAVFGL2 ou des macrophages par un AAVIL-34 avant de les transférer adoptivement au receveur de l'allogreffe, afin de tester leur capacité régulatrice.

- Voies d'injection

Certaines molécules suppressives maîtrisent mieux la réponse immune contre le greffon lorsqu'elles sont injectées en systémique. En effet, l'expression systémique de CTLA4-Ig serait plus efficace pour prolonger la survie à long terme de l'allogreffe d'îlot chez le rat (Thomas Laumonier et al. 2003) et de xenogreffe d'îlots de rats chez la souris (Potiron et al. 2005). De même, bien que l'infection d'îlots par AdCD40Ig avant transplantation soit suffisante pour prolonger leur survie lors d'une allogreffe chez la souris (Rehman et al. 2007) et lors d'une xéno greffe d'îlots de rats chez la souris (Y.-Z. Jin & S.-S. Xie 2003), l'infection systémique serait plus efficace (Potiron et al. 2005). Par ailleurs, une étude montre que l'induction de l'expression d'IL-10 dans la cornée par transfection plasmidique ou transduction par un AdIL-10 ne prolonge pas la survie de l'allogreffe chez le rat, contrairement à l'infection systémique du receveur par AdIL-10 (N. Gong et al. 2007). L'injection intra-veineuse permet ainsi une transduction de plusieurs organes, en particulier le foie, les poumons et la rate, à l'exception des compartiments protégés tels que le cerveau.

Dans notre modèle, l'injection d'AdCD40Ig dans la paroi musculaire du greffon cardiaque chez le rat permet de concentrer le vecteur. Ceci peut expliquer pourquoi l'injection de l'AdIDO dans le greffon prolonge la survie du greffon contrairement à son injection systémique (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). D'autres voies d'injection sont possibles : la voie orale, permettant une répartition dans la circulation via l'intestin fortement vascularisé, la voie intrapéritonéale, transdermale, ou aérienne.

III. LA FIBRINOGEN-LIKE 2/FIBROLEUKIN (FGL2) : amie ou ennemie ?

Alors que des études supportent un rôle prothrombinase dans le rejet aigu du greffon (Ghanekar et al. 2004; Qin Ning et al. 2005; Mendicino et al. 2005), la fibrinogen-like protein 2 / fibroleukin (FGL2) permet aussi de prolonger la survie d'allogreffe de peau chez la souris (Hao Liu et al. 2008).

1. Caractérisation de FGL2

En 1987, Koyama a identifié le gène pT49 exprimé par les lymphocytes T cytotoxiques chez la souris, dont la séquence présente une forte homologie avec les sous-unités β et γ des fibrinogènes (T. Koyama et al. 1987). En 1995, Ruegg décrit son homologue humain, un gène codant pour deux transcrits de 4.5Kb et 1.5 Kb, et deux protéines de 62 et 64 à 70 kDa chez l'Homme (Rüegg & Pytela 1995) et de 70 et 74 kDa chez la souris (L S Fung et al. 1991) (Yuwaraj et al. 2001). La protéine comprend un peptide signal et deux régions α , cinq motifs de N-glycosylation et des cystéines conservées suggérant un complexe multichaîne. La protéine codée par le gène pT49 fut nommée « fibroleukine » en raison de son homologie avec les fibrinogènes et de sa sécrétion spontanée par les lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ principalement mémoires (Marazzi et al. 1998).

FGL2 serait exprimée de façon constitutive, notamment dans les organes lymphoïdes primaires, les ganglions et la rate, par les leucocytes du sang périphérique, les lymphocytes T cytotoxiques, les monocytes, les cellules endothéliales, les trophoblastes, les cellules de l'estomac et du muscle squelettique (Mingfeng Liu et al. 2003), et par les lymphocytes T de la lamina propria mucosa (Marazzi et al. 1998). Son expression est augmentée dans la paroi des vaisseaux du cœur, dans les cellules mononucléaires périphériques (L. Shao et al. 2012), et dans le serum (Nazia Selzner et al. 2012, p.20) après ischémie/reperfusion, dans les macrophages du foie des patients transplantés atteints d'hépatite virale fulminante (G A Levy et al. 2000). Elle peut être induite en réponse au TNF- α (M. Pope et al. 1995)(Ghanekar et al. 2004) (Mingfeng Liu et al. 2006) et à l'IL-1 (M. Pope et al. 1995) par les cellules endothéliales, à l'IFN- γ ou le LPS par les macrophages (Lafuse et al. 1995) (Marazzi et al. 1998) (Wayne W Hancock et al. 2004) (Mingfeng Liu et al. 2006) et par les lymphocytes (Wayne W Hancock et al. 2004), et d'autant plus par la synergie de l'IFN- γ et du TNF- α (Mingfeng Liu et al. 2006). Par ailleurs, l'IL-12 augmente l'expression de TNF- α , d'IFN- γ et de FGL2 dans la decidua (Knackstedt et al. 2003).

Les premières études décrivent FGL2 comme un facteur procoagulant. La protéine est dotée d'une fonction **prothrombinase** du coté N-Terminal et d'un domaine **FRED** (fibrinogen-related domain) en C-Terminal (Yuwaraj et al. 2001). En effet, Chan a identifié, par mutagenèse dirigée et production de protéines tronquées, la sérine en position 89 de FGL2 comme la protéase permettant le clivage de la prothrombine en thrombine (Figure 17).

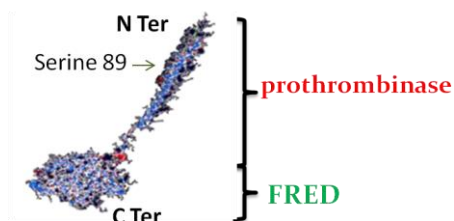


Figure 17. Représentation 3D de la molécule FGL2.

Son activité catalytique dépend du calcium, de facteur Va, et de phospholipides (C. W. Y. Chan et al. 2002). Contrairement au facteur Xa, elle n'est pas inhibée par les antithrombines III, ni éliminée lors du lavage des macrophages, car liée à la membrane (Philip A Marsden et al. 2003). De ce fait, **FGL2 est impliquée dans la perte du fœtus, le développement des tumeurs, et dans le syndrome respiratoire sévère aigu.** En effet, l'expression de FGL2, stimulée par les cytokines de type Th1 TNF- α , IFN- γ et IL-1, dans les trophoblastes et la decidua des souris, induit des dépôts de fibrines et la perte spontanée du fœtus (D A Clark et al. 2001)(D A Clark et al. 1998, p.200). D'autre part, FGL2 est exprimée dans les tissus tumoraux chez l'homme et la souris, particulièrement dans les cellules cancéreuses et inflammatoires interstitielles telles que les macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T CD8⁺, et les cellules endothéliales des vaisseaux. Sa colocalisation avec les dépôts de fibrines supporte sa contribution à l'hypercoagulabilité des tumeurs (K. Su et al. 2008). Par ailleurs, l'infection par le coronavirus/MHV-1 (mouse hepatitis virus strain-1) induit des dépôts de fibrines dans les poumons, qui sont responsables du syndrome respiratoire sévère aigu, et qui corrént avec l'expression de FGL2 dans les cellules inflammatoires et les pneumocytes de type I (De Albuquerque et al. 2006)(Siu et al. 2009)(Y.-H. Hsieh et al. 2010) augmentée dans les macrophages alvéolaires des poumons de patients atteints de maladies pulmonaires obstructives chroniques (Yanling Liu et al. 2010). FGL2 est aussi impliquée dans l'arthrite induite par le collagène via la génération de dépôts de fibrines (Melnyk et al. 2011), ou encore dans la détérioration des fonctions diastoliques et systoliques cardiaques via l'induction d'une

microthrombose chez les rats atteints de diabète de type II (Yanping Ding et al. 2010). Une toute autre fonction de FGL2 (HEP64) l'impliquant dans la distinction des spermatozoïdes viables des spermatozoïdes anormaux a été rapportée (Olson et al. 2004).

2. FGL2 favorise le développement de l'hépatite

Levy a rapporté en 1981 que les cellules mononucléaires du sang périphérique de souris de souches BALB/c, plus sensibles à l'infection par le virus de l'hépatite MHV-3, présentent une activité procoagulante supérieure aux cellules de souches résistantes A/J (G A Levy et al. 1981). La susceptibilité à l'infection par MHV-3 a été liée à l'expression d'une monokine procoagulante capable de cliver la prothrombine en thrombine. Par ailleurs, l'administration d'un anticorps bloquant FGL2 (3D4.3) (L S Fung et al. 1991) diminue la nécrose et améliore la survie de souris infectées par MHV-3 (C Li et al. 1992). Chez l'Homme, **FGL2 est surexprimée dans les macrophages du foie des patients transplantés atteints d'hépatite virale fulminante** (G A Levy et al. 2000), en corrélation avec les dépôts de fibrine (Philip A Marsden et al. 2003) et la sévérité de l'hépatite (C.-L. Zhu et al. 2005)(Foerster et al. 2010).

En effet, les protéines de la nucleocapside de MHV-3 chez la souris (Q Ning et al. 1999) ou les molécules HBc et HBx du virus HBV chez l'Homme (Meifang Han et al. 2008) induisent, via les MAPK et le facteur de transcription cETS-2 notamment (Meifang Han et al. 2008), l'expression sélective de FGL2 par les macrophages hépatiques, les cellules de Kupffer (R. L. Parr et al. 1995), et les cellules endothéliales (pas dans les hépatocytes) (J W Ding et al. 1998). Par sa fonction prothrombinase (R. L. Parr et al. 1995), FGL2 initie et localise des dépôts de fibrines (Philip A Marsden et al. 2003) et induit l'hépatite virale fulminante (J W Ding et al. 1998). Ainsi, l'extinction de l'expression de FGL2 par mutation génétique (Philip A Marsden et al. 2003) (Nazia Selzner et al. 2012, p.20), par shRNA (Chuanlong Zhu et al. 2006) (Xi et al. 2008; Zhi-mo Wang et al. 2006) (S. Gao et al. 2010), ou par des anticorps dirigés contre la partie N-terminale de FGL2 (Nazia Selzner et al. 2012, p.20), font perdre aux macrophages leur fonction procoagulante, réduisent les dépôts de fibrines et la nécrose du foie, et améliorent la survie des souris après infection par MHV-3 (Philip A Marsden et al. 2003). Par ailleurs, les souris $Fc\gamma RIIB^{-/-}$ sont protégées de la destruction des cellules endothéliales sinusoidales et des hépatocytes induite par la liaison de FGL2 au $Fc\gamma RIIB$ (Nazia Selzner et al. 2012, p.20).

FGL2 est impliquée dans la susceptibilité à l'infection par le virus de l'hépatite, par sa fonction procoagulante, mais aussi par sa fonction immunorégulatrice qui empêche la

clairance du virus. Les souris BALB/c présentent une plus forte expression de FGL2 mais aussi un plus grand nombre de lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ et une polarisation de la réponse immune vers un profil Th2, comparées aux souris A/J. D'autre part, les souris $FGL2^{-/-}$ sont résistantes à l'infection, excepté si des lymphocytes Tregs $FGL2^{+/+}$ leur sont transférés (Itay Shalev et al. 2009). Enfin, les patients développant une faible réponse contre le virus de l'hépatite expriment une grande quantité de FGL2 dans leur plasma, corrélant avec la forte infiltration de lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ dans le foie (Foerster et al. 2010).

3. FGL2 est impliquée dans des mécanismes de rejet et de tolérance au greffon

Le rejet hyperaigu des greffes d'organe de porc chez le primate est déclenché par les xénoanticorps reconnaissant l' α -galactosidase. Des porc transgéniques pour la protéine hDAF ont donc été générés. Cependant, malgré la déplétion de xénoanticorps et les traitements immunosuppresseurs, un rejet aigu vasculaire persiste, caractérisé par une microangiopathie, l'infiltration des tissus par les macrophages et les cellules NK, des dépôts de fibrines et une thrombose. L'inhibition de la thrombine permet d'améliorer la survie de la xénogreffe de porc chez le singe (P. J. Cowan et al. 2002). **Des études ont associé l'expression de FGL2 par les cellules endothéliales du greffon au rejet aigu de la xénogreffe rénale de porc chez le singe** (Ghanekar et al. 2004) **ou de l'allogreffe cardiaque chez la souris** (Qin Ning et al. 2005). FGL2 induit d'importants dépôts de fibrines (Qin Ning et al. 2005) entraînant une microthrombose dans les vaisseaux (L. Shao et al. 2012), et/ou induit l'apoptose des cellules endothéliales et des hépatocytes lors de l'allogreffe hépatique chez la souris (Nazia Selzner et al. 2012, p.20). Chez l'homme, une forte expression de FGL2, notamment par les cellules infiltrant le greffon, est associée aux dépôts de fibrines dans les vaisseaux, perturbant la microcirculation et induisant le rejet d'allogreffe rénale (L. Zhang et al. 2004) (Qin Ning et al. 2005). Des stratégies thérapeutiques visent à inhiber la fonction prothrombinase de FGL2 par l'extinction du gène. La xénogreffe d'un coeur de souris $FGL2^{-/-}$ chez le rat $FGL2^{+/+}$ ne présente effectivement pas de signe de thrombose (Ghanekar et al. 2004). Le rejet cellulaire serait même évité en associant un traitement par des immunosuppresseurs tels que la ciclosporine et le venin de cobra, ou le mycophénolate mofétil et le tacrolimus (Mendicino et al. 2005). Cependant, les souris $FGL2^{-/-}$ rejettent l'allogreffe de peau de souris $FGL2^{+/+}$, selon la même cinétique, le même taux de fibrines, et la même réactivité des lymphocytes T que les receveurs $FGL2^{+/+}$ (Wayne W Hancock et al. 2004). Ning confirme, dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez la souris, que la survie de la greffe est prolongée si le donneur est

FGL2^{-/-}, et que les dépôts de fibrines sont moindres lorsque le receveur est FGL2^{-/-} avec, néanmoins, un taux de rejet identique (Qin Ning et al. 2005). D'autre part, l'administration d'anticorps dirigés contre l'exon 1, soit la partie prothrombinase de FGL2, prolonge la survie du greffon (Qin Ning et al. 2005). Ainsi, la partie N-terminale de FGL2 est impliquée dans les mécanismes de rejet du greffon.

La partie C-terminale de FGL2 présente une fonction immunosuppressive et non prothrombinase. Son domaine FRED la classe dans la famille des fibrinogènes, telles que la fibrinogène (Tsakadze et al. 2002), la tenascine (Hemesath et al. 1994), l'angiopoïétine (Papapetropoulos et al. 1999), ou la ficoline (Teh et al. 2000) présentant une activité immunomodulatoire. Par exemple, le clivage de la fibrinogène, dépourvue de propriété suppressive, génère des peptides capables d'inhiber, de façon directe, la blastogénèse et la prolifération allogénique et polyclonale des lymphocytes T et B, et donc de réguler l'évolution des lésions inflammatoires (Edgington et al. 1985) (Robson et al. 1993). Chan fut le premier à mettre en évidence les propriétés suppressives de FGL2 sous sa forme soluble (sFGL2) chez la souris. En effet, sFGL2 inhibe la prolifération de lymphocytes T en réponse à une stimulation allogénique ou polyclonale, ainsi que la maturation de DC dérivés de moelle osseuse stimulés par le LPS (C. W. Y. Chan et al. 2003), et conduit à l'apoptose des lymphocytes B *in vitro* (Itay Shalev et al. 2008) (Hao Liu et al. 2008). De plus, les souris FGL2^{-/-} présentent des lymphocytes T plus réactifs à la stimulation polyclonale et allogénique, polarisés vers un profil Th-1, une augmentation du nombre de pDC et de cDC qui s'explique par une moindre apoptose après stimulation par le LPS, et un plus grand nombre de lymphocytes B produisant de fortes quantités d'anticorps en réponse à un antigène, en accord avec les résultats obtenus *in vitro* (Itay Shalev et al. 2008). Le nombre de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ est aussi augmenté chez les souris FGL2^{-/-}, cependant leur capacité suppressive *in vitro* est moindre, suggérant l'implication de FGL2 dans leur fonction suppressive. L'hypothèse est confortée *in vitro*, par l'abrogation de la suppression exercée par les lymphocytes Tregs sur la réponse allogénique et polyclonale de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ à l'aide d'anticorps (Itay Shalev et al. 2009), et *in vivo*, par la restauration de la susceptibilité des souris FGL2^{-/-} à l'infection par MHV-3 lors du transfert de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de souris FGL2^{+/+} (Itay Shalev et al. 2009). En outre, plusieurs études rapportent la surexpression de FGL2 par les lymphocytes Tregs naturelles CD4⁺CD25⁺CD69⁺Foxp3⁺ impliquées dans les lésions auto-immunes du diabète de type 1 vs les lymphocytes T effecteurs CD4⁺CD25⁻ (Herman et al. 2004), par les lymphocytes T

TCR $\alpha\beta$ ⁺CD8 $\alpha\alpha$ intraépithéliaux de l'intestin grêle chez la souris vs les lymphocytes T $\gamma\delta$ et CD8⁺ β (Denning et al. 2007), par les lymphocytes CD8⁺-NKT like impliqués dans la tolérance au soi vs les lymphocytes T CD8⁺ naïfs (L. Zhou et al. 2008), et par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} régulateurs de notre modèle (X. L. Li et al. 2010). Par ailleurs, l'expression de FGL2 est augmentée lors de la transition de la phase aiguë à la phase asymptomatique de l'infection par VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Q. Li et al. 2009). FGL2 serait donc un marqueur de tolérance. Une étude récente a mis en évidence la surexpression de FGL2 dans l'allogreffe cardiaque tolérée chez la souris traitée par la rapamycine, et qui perdure dans l'allogreffe hépatique tolérée spontanément (L. Xie et al. 2012). Enfin, **l'administration de la protéine FGL2 selon 4 injections de 20 μ g prolonge la survie de l'allogreffe de peau chez la souris jusqu'à 15 jours vs 8 chez les souris contrôles** (Hao Liu et al. 2008). Jusqu'à ce jour, la capacité de FGL2 à induire la survie à long terme de l'allogreffe n'a pas été rapportée.

4. Les récepteurs de FGL2

Le développement spontané d'une glomerulonéphrite par les souris FGL2^{-/-} ou **Fc γ RIIB^{-/-}** (Itay Shalev et al. 2008), l'incapacité de FGL2 à inhiber la maturation des DC dérivées de la moelle osseuse, à induire l'apoptose des lymphocytes B (Itay Shalev et al. 2008) (Hao Liu et al. 2008), et à protéger du rejet l'allogreffe de peau chez les souris Fc γ RIIB^{-/-} (Hao Liu et al. 2008) sont autant de preuves de l'implication du récepteur dans l'immunosuppression induite par FGL2 (Figure 18). Un autre récepteur de FGL2, le **Fc γ RIII**, de moindre avidité, a par ailleurs été identifié (Hao Liu et al. 2008).

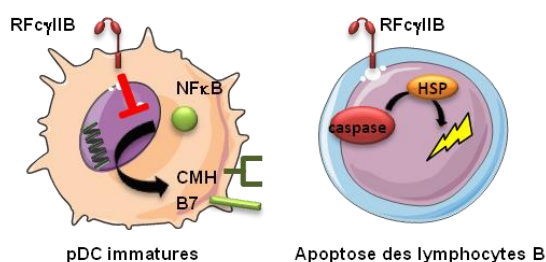


Figure 18. Mécanismes d'action de FGL2 décrits chez la souris

La liaison de FGL2 au FcγRIIB empêche la translocation de NFκB dans le noyau des DC et l'expression des molécules de costimulation et du CMH par les DC, et induit l'apoptose des lymphocytes B via l'activation des caspases et de la protéine de stress HSP. D'après (Itay Shalev et al. 2008) et (Hao Liu et al. 2008).

Les récepteurs activateurs FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, sont exprimés par la plupart des cellules effectrices telles que les monocytes (Ghazizadeh et al. 1994), les macrophages, les mastocytes, les cellules neutrophiles, les DC, et les cellules NK (Salcedo et al. 1993) mais pas par les lymphocytes (Figure 19). Ils induisent, via leur motif ITAM, la dégranulation, la phagocytose (J. D. Young et al. 1984) (C. L. Anderson et al. 1990), l'ADCC, la transcription de gènes codant les cytokines, le relargage de médiateurs inflammatoires (Titus et al. 1987), intervenant dans les réponses inflammatoires aux IgG cytotoxiques et complexes immuns (Baiu et al. 1999).

Le FcγRIIB est un récepteur inhibiteur. Il est exprimé par les macrophages, les mastocytes, les monocytes, les cellules neutrophiles, les DC, et les lymphocytes B (Ravetch & Bolland 2001). Il transduit, via son motif ITIM, un signal inhibiteur de la prolifération cellulaire et de l'afflux de calcium ou un signal d'apoptose. L'équilibre entre les signaux d'activation et d'inhibition permet le maintien de la tolérance, et régule le seuil d'activation des réponses. L'affinité des deux types de récepteurs pour les immunoglobulines est similaire. C'est le ratio des FcR sur la cellule, dont l'expression est régulée pendant la différenciation et le développement des cellules effectrices, qui détermine le signal induit. Ainsi, les FcR influencent la différenciation des DC, la capacité à induire l'anergie ou l'activation des lymphocytes T. Sans les signaux inhibiteurs, les réponses effectrices par les anticorps cytotoxiques et les complexes immuns sont exacerbées, causant des maladies auto-immunes. En effet, les souris RFcγIIB^{-/-} développent des anticorps (Wernersson et al. 1999) dirigés contre la chromatine, soit une glomérulonéphrite (Bolland & Ravetch 2000), des IgE

responsables d'une anaphylaxie (Ujike et al. 1999), et présentent une arthrite induite par le collagène (Yuasa et al. 1999) exacerbée.

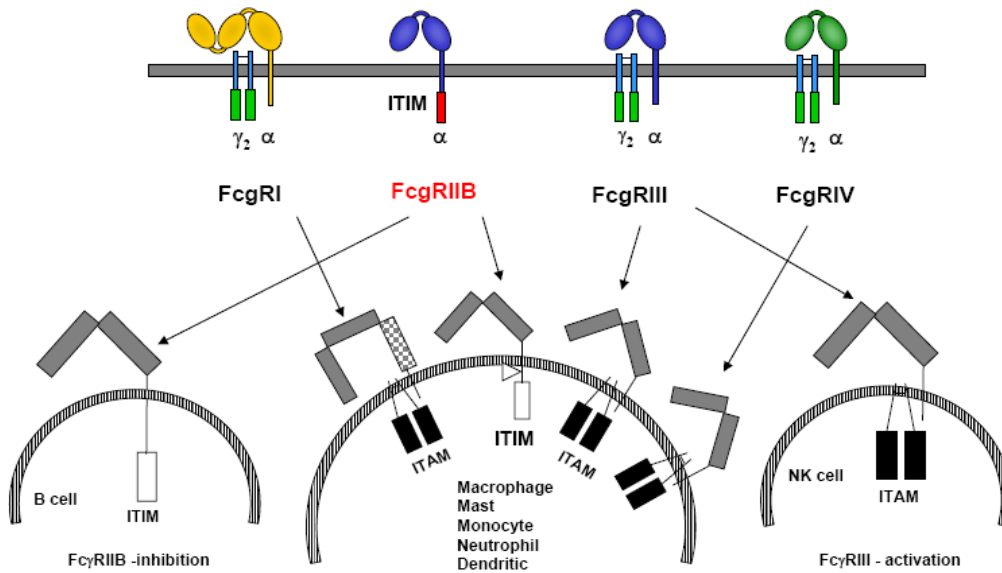


Figure 19. Expression des récepteurs $Fc\gamma R$ par les cellules immunes.
D'après (Ravetch & Bolland 2001)

IV. L'INTERLEUKINE 34 : un potentiel inexploité

1. Une découverte récente

L'interleukine 34 (IL-34) fut découverte en 2008 par Lin et al. lors d'un criblage de protéines ligands de récepteurs exprimés dans un nombre limité de tissus, et ainsi de fonction spécifique. L'équipe a généré une banque de gènes codant pour des protéines sécrétées et des régions extracellulaires de protéines transmembranaires, qu'ils ont fait exprimer dans des cellules par transfection de vecteurs plasmidiques. Les surnageants de culture ont été testés sur des cellules issues de 25 tissus différents. L'intérêt fut porté aux protéines ayant un effet activateur sur peu de tissus. De ce criblage a été mise en évidence la protéine IL-34 (Haishan Lin et al. 2008).

L'IL-34 est une protéine de 241 acides aminés chez l'Homme. Deux isoformes ont été rapportées chez l'Homme, dépendant de l'épissage alternatif des transcrits, et variant d'une glutamine s'insérant entre les résidus 80 et 81 (S. Wei et al. 2010). Elle possède un peptide signal, quatre hélices α , et des ponts disulfures intrachaînes et reliant deux monomères d'IL-34 de 39kDa pour former un homodimère. Elle est conservée entre les espèces, avec une homologie de 99,6% entre l'Homme et le chimpanzé, et de 72% entre l'Homme et le rat ou la souris (Haishan Lin et al. 2008). L'expression de son transcrit a été montrée dans la rate et le thymus, le cœur, le cerveau, les poumons, le foie et les reins, les testicules, la prostate et les ovaires, l'intestin grêle et le colon (Haishan Lin et al. 2008). L'expression de la protéine est décrite dans les cellules de type « osteoclastes-like » des tumeurs osseuses à cellules géantes, dans les ostéoblastes mais pas les ostéoclastes (Baud'huin et al. 2010), les kératinocytes, les follicules pileux, les cellules rénales proximales, les cellules germinales, les neurones, dans le cortex cérébral et l'hippocampe, ainsi que dans le fluide cébrospinal (Yaming Wang et al. 2012), dans les fibroblastes et les synoviocytes de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Chemel et al. 2012). L'expression de la protéine dans la rate, en particulier dans la pulpe rouge, a été rapportée par Lin et al., (Haishan Lin et al. 2008), mais serait faible selon Wang et al. (Yaming Wang et al. 2012).

Le récepteur identifié lors du criblage par Lin et al. est le récepteur au CSF-1 (CSF-1R, M-CSFR ou CD115), codé par le gène c-fms, et exprimé par les cellules de la lignée myéloïde (Haishan Lin et al. 2008)(Xiaolei Ma et al. 2012). L'IL-34 partagerait donc un récepteur avec le M-CSF (macrophages-colony stimulating factor).

2. Le M-CSF : une molécule aujourd'hui bien caractérisée

Le M-CSF existe sous trois isoformes : un protéoglycane sécrété, une forme ancrée à la membrane des cellules, et une glycoprotéine sécrétée. Il est aussi appelé CSF-1, le CSF-2 et CSF-3 étant le GM-CSF (granulocytes and macrophages-colony stimulating factor) et le G-CSF (granulocytes-colony stimulating factor) respectivement. Le GM-CSF peut induire la différenciation et la prolifération des macrophages, mais avec une efficacité moindre que le M-CSF.

La perte de l'expression du M-CSF induit un phénotype ostéopérotique chez la souris op/op (W. Wiktor-Jedrzejczak et al. 1990). Les souris op/op présentent une diminution du nombre d'ostéoclastes et des anomalies squelettiques (S. C. Marks Jr & Lane 1976), mais aussi une diminution du nombre de monocytes dans le sang périphérique et de macrophages dans la cavité péritonéale (W. W. Wiktor-Jedrzejczak et al. 1982). Par ailleurs, il est montré que les progéniteurs hématopoïétiques sont capables de se différencier en monocytes et macrophages en présence de M-CSF (W. W. Wiktor-Jedrzejczak et al. 1982).

D'après le phénotype observé chez les souris op/op, la délétion du gène codant pour le M-CSF a un impact important sur toutes les cellules myéloïdes de la lignée des phagocytes mononucléaires. En effet, le M-CSF permet l'expansion des phagocytes mononucléaires chez la souris (D A Hume et al. 1988), le rat (Ulich et al. 1990), le primate (D H Munn et al. 1990) et l'Homme (VandePol & Garnick 1991). *A contrario*, le blocage du M-CSF par des anticorps réduit le nombre de monocytes CD14⁺CD16⁺ et déplete les cellules de Kupffer chez le primate (Radi et al. 2011). Outre l'absence de macrophages F4/80, les souris op/op présentent une diminution des populations de pDC (-70%) et de CD11c^{hi}DC (-43%), suggérant la nécessité du M-CSF pour une différenciation optimale des DC (MacDonald et al. 2005). Ces observations ont été confirmées par la différenciation de pDC et cDC à partir de précurseurs de la moelle osseuse *in vitro* en présence de M-CSF (Fancke et al. 2008).

Ainsi, le M-CSF est impliqué dans la survie, la prolifération, la différenciation et l'activation des macrophages, et par conséquent dans les maladies inflammatoires et auto-immunes (John A Hamilton 2008), **les cancers et l'immunité innée** (Chitu & E Richard Stanley 2006).

En effet, le M-CSF favorise les maladies auto-immunes. Chez l'homme, l'expression de M-CSF corrèle avec l'infiltration et la prolifération des macrophages dans le glomérule, suggérant l'implication du M-CSF dans le développement de la glomérulonéphrite (Matsuda

et al. 1996). De plus, les patients atteints de lupus néphrétique présentent une augmentation de la sécrétion de M-CSF (Menke et al. 2009).

Le M-CSF est administré chez l'Homme pour prévenir de métastases de mélanome en phase I (D. J. Cole et al. 1994), et l'expression du M-CSF a été associée à une meilleure survie des patients atteints de glioblastome (Serão et al. 2011). Le M-CSF a aussi été utilisé chez l'Homme comme facteur de croissance hématopoïétique pour la transplantation de moelle osseuse après une chimiothérapie myélosuppressive. En effet, le M-CSF raccourcit le temps de récupération des granulocytes circulants et améliore leur survie après transplantation de moelle osseuse sans influencer la rechute de la leucémie ou la GVHD (Masaoka et al. 1990).

Le M-CSF, seul ou combiné à d'autres cytokines, peut induire des macrophages tolérogènes. Par exemple, l'administration de M-CSF chez la souris diminue la réponse des lymphocytes T aux mitogènes via le recrutement de macrophages (Doyle et al. 1992) (Sakurai et al. 1996) (Sakurai et al. 1998). Il augmente l'expression du F4/80 (D A Hume et al. 1988) par les macrophages, dont l'implication dans la tolérance périphérique induite par déviation immunitaire associée à la chambre antérieure (ACAID) et dans la tolérance induite par voie orale (H.-H. Lin et al. 2005) a été montré chez la souris. Les tumeurs sont souvent infiltrées par des macrophages contribuant au développement du cancer. Le M-CSF est nécessaire à la différenciation des macrophages associés aux tumeurs (TAM) à partir de monocytes par le LIF (leukemia inhibitory factor) et l'IL-6 (Duluc et al. 2007). Chez la souris op/op, l'infiltration de la tumeur par les macrophages est réduite de 50%, l'infiltration par les cellules neutrophiles est augmentée, et la vascularisation et le nombre de tumeurs sont diminués (Pyonteck et al. 2012). Chez l'Homme, le M-CSF est un marqueur de carcinome du sein (A. H. Beck et al. 2009), de carcinome hépatique (Budhu et al. 2006), ou encore de tumeur à cellules géantes ténosynoviales (Cupp et al. 2007). Dans le domaine de la transplantation, le pré-traitement de souris par le M-CSF avant le transfert de cellules hématopoïétiques allogéniques expand les macrophages et réduit l'expansion des lymphocytes T du donneur, diminuant la GVHD (D. Hashimoto et al. 2011). De plus, une étude récente montre que la combinaison du M-CSF et de l'IFN γ permet de différencier des monocytes en macrophages régulateurs d'un phénotype distinct des M0, M1 ou M2, ou encore des MoDC, chez la souris. Ces macrophages régulateurs sont capables d'inhiber la réponse T *in vitro* et de prolonger la survie d'allogreffe de cœur chez la souris de façon dépendante de iNOS (Riquelme et al. 2012). Un autre article suggère par ailleurs, que des macrophages CD11b⁺F4/80⁺Foxp3⁺ seraient capables d'inhiber la réponse lymphocytaire T et

de convertir des lymphocytes T effecteurs en régulateurs *in vivo* (Manrique et al. 2011), cependant l'article a été rétracté. Il a aussi été décrit que les pDC de souris op/op cultivées en présence de lymphocytes T allogéniques présentent une expression augmentée du CD40 et du CD86 vs les souris sauvages (MacDonald et al. 2005). Or, l'immaturité des pDC a été associée à une fonction tolérogénique dans plusieurs modèles.

On peut aussi noter que le M-CSF améliore les fonctions cardiaques après l'ischémie en améliorant la survie des cardiomyocytes et via la production de VEGF (vascular endothelial growth factor) (Tatsuma Okazaki et al. 2007).

3. Le CD115 : un récepteur partagé par le M-CSF et l'IL-34

Bien que leur structure primaire ait une faible homologie, le M-CSF et l'IL-34 ont une structure secondaire similaire qui explique leur liaison à un récepteur commun (Garceau et al. 2010). L'acide aminé Q81 serait important pour la liaison de l'IL-34 au récepteur CD115 (S. Wei et al. 2010). Aucun récepteur unique de l'IL-34 autre que le CD115 n'est connu actuellement.

Le CD115 est codé par un proto-oncogène (Sherr et al. 1985) et possède un site tyrosine kinase (Xiaoyan Chen et al. 2008). La liaison du ligand induit la phosphorylation de la tyrosine et son homodimérisation, initiant une cascade de phosphorylation d'autres protéines (W Li & E R Stanley 1991).

Le gène codant pour le CD115 est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules myéloïdes de la lignée des phagocytes mononucléées (Garceau et al. 2010). Son expression par les macrophages a d'abord été montrée (Lichanska et al. 1999). Un modèle de souris transgéniques pour la molécule GFP (green fluorescence protein) sous le contrôle du promoteur du CD115 supporte l'expression du récepteur dans les DC et les macrophages mais pas dans les précurseurs CD11c⁺ de DC. L'auteur conclut donc que le CD115 serait un marqueur de maturation des DC (MacDonald et al. 2005). Néanmoins, une faible expression du récepteur suffit à induire une réponse (Takashima et al. 1995)(Tagoh et al. 2002). Le CD115 pourrait donc être exprimé par les précurseurs myéloïdes (Tagoh et al. 2002) mais non détecté par la technique de MacDonald et al. Le fait que les souris CD115^{-/-} présentent une augmentation de M-CSF circulant (X.-M. Dai et al. 2002) suggère son endocytose par les cellules exprimant le récepteur. En effet, il a été montré que la liaison du récepteur au M-CSF sur les monocytes induit l'internalisation du complexe et leur différenciation en macrophages (Chomarat et al. 2003), alors que le blocage de l'expression du récepteur à la membrane ou de

l'internalisation favorise la génération de cDC (X.-M. Dai et al. 2002). Outre les DC CD11c^{hi} myéloïdes, les souris transgéniques pour la GFP sous le contrôle du promoteur du CD115 ont permis de mettre en évidence l'expression du CD115 dans les DC CD11c^{dim}B220⁺ plasmacytoïdes de la rate. Ainsi, l'expression du récepteur serait moins forte dans les cellules plasmacytoïdes mais présente (MacDonald et al. 2005). Le CD115 est aussi exprimé par les cellules de Langerhans dérivant des monocytes (Ginhoux et al. 2006) répondant au M-CSF produit par les fibroblastes du derme (Takashima et al. 1995), par les lymphocytes B (A. H. Baker et al. 1993), les cellules du muscle lisse des vaisseaux (T. Inaba et al. 1992), et les ostéoclastes (Hofstetter et al. 1992).

Comme les souris op/op, les souris CD115^{-/-} sont ostéopérotiques. Cependant, elles présentent un phénotype plus sévère, et un nombre moindre de macrophages que les souris op/op et sauvages (X.-M. Dai et al. 2002). Ceci suggère un autre ligand pour le CD115. Les rats tl/tl sont aussi atteints d'ostéopérose. Ils doivent leur nom à l'absence de dents (d'où leur nom « toothless »), et présentent par ailleurs un retard de croissance et une faible fertilité, des défauts en macrophages, et des défauts squelettiques (Leonard et al. 1974)(S. C. Marks Jr et al. 1992) (Dobbins et al. 2002). L'administration de M-CSF (Wisner-Lynch et al. 1995), bien qu'il ait un rôle dans ce phénomène d'ostéopérose (Dobbins et al. 2002), ou le transfert de moelle osseuse (S. C. Marks Jr 1977) ne permet pas de restaurer tous les défauts du rat tl/tl, contrairement aux souris op/op (Moutier et al. 1976).

En accord avec les études rapportant le rôle pro-inflammatoire du M-CSF, le CD115 est un marqueur de susceptibilité à l'asthme (E. K. Shin et al. 2010) et au cancer du colon (R. J. Alexander et al. 1995). De plus, l'inhibition du CD115 a mis en évidence son implication dans la prolifération et l'infiltration de l'allogreffe rénale par les macrophages (Jose et al. 2003), et l'EAE induite par la MOG (myelin/oligodendrocyte glycoprotein) chez la souris (Uemura et al. 2008).

Le CD115 est aussi impliqué dans l'induction de macrophages régulateurs. Notamment, le blocage du CD115 par des anticorps réduit le nombre de TAM résidents dans les tumeurs syngéniques (MacDonald et al. 2010). De plus, l'administration d'anticorps anti-CD115 chez la souris exacerbe la GVHD lors d'une allotransplantation de cellules hématopoïétiques par la déplétion des macrophages du receveur (D. Hashimoto et al. 2011).

4. L'IL-34 : plus qu'un substitut du M-CSF...

Le CD115 co-évoluerait avec l'IL-34. Le fait que la liaison de M-CSF au CD115 soit basée sur des ponts salins et ne requiert que des charges opposées, alors que la liaison de l'IL-34 au CD115 nécessite des acides aminés hydrophobes et des ponts hydrogènes, impliquant une structure spécifique et des contraintes chimiques, supporte une co-évolution du CD115 avec IL-34 plutôt qu'avec M-CSF (Garceau et al. 2010).

Cependant, l'IL-34 pourrait être un ligand de second choix pour le CD115. L'affinité du récepteur pour l'IL-34 serait inférieure à son affinité pour le M-CSF chez la souris (S. Wei et al. 2010). Or, la constante de dissociation de la liaison de l'IL-34 au CD115 de 1pM est très inférieure à celle de la liaison de M-CSF au récepteur qui est de 34 pM chez l'Homme (Haishan Lin et al. 2008) (Figure 20).

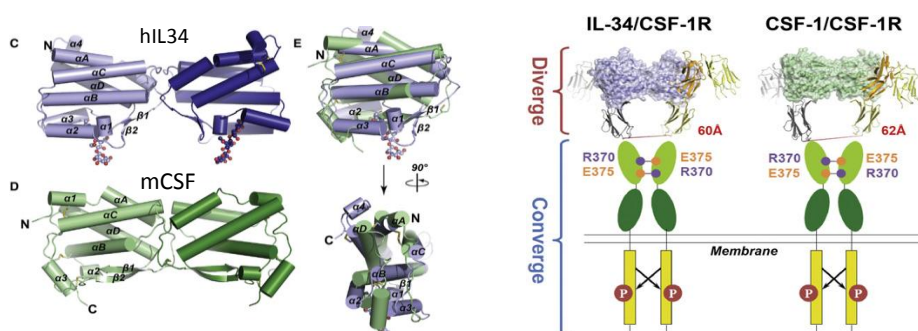


Figure 20. Superposition 3D de IL-34 et M-CSF et comparaison de leur liaison au CD115
D'après (Xiaolei Ma et al. 2012)

Deux sites de liaison distincts pour les deux ligands sur le même récepteur sont envisagés. En effet, une étude a montré qu'un anticorps dirigé contre le CD115 inhibe la fixation du M-CSF mais pas celle de l'IL-34 (Chihara et al. 2010). **Il est aussi possible qu'un second récepteur à l'IL-34 encore non-identifié existe** (Figure 21).

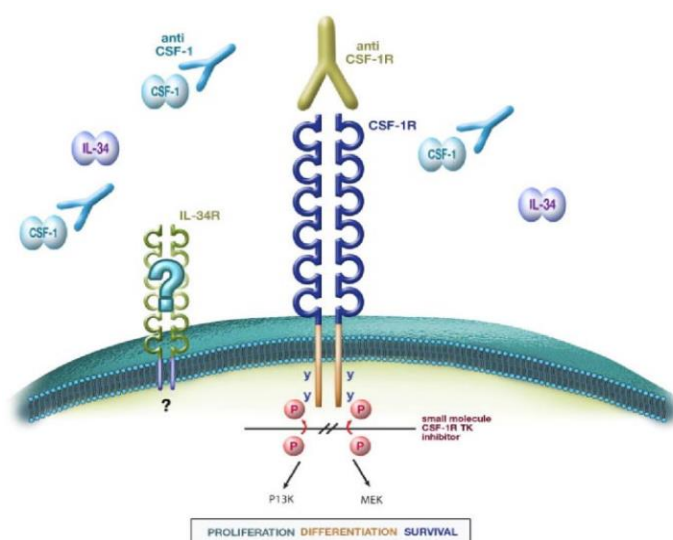


Figure 21. L'existence d'un second récepteur à l'IL-34 n'est pas exclue.
D'après (David A Hume & MacDonald 2012)

La transduction du signal induit par la liaison du M-CSF au CD115 dans les phagocytes mononucléés résulte d'une autophosphorylation du récepteur, et implique la PI3K, ERK (Baud'huin et al. 2010), les JAK (janus kinase) et STAT (Barreda et al. 2004). L'IL-34 semble emprunter la même voie de signalisation que le M-CSF par la phosphorylation de ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase) (Haishan Lin et al. 2008) et de AKT dans les cellules CD11b⁺ (Baud'huin et al. 2010), augmentant l'expression des transcrits TRAP (TNF-R associated protein), NFATc, cathepsin K, marqueurs phénotypiques des ostéoclastes (Baud'huin et al. 2010). De plus, les deux ligands peuvent induire une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1b, TNF- α , GM-CSF et des chimiokines, IP-10 (IFN γ -induced protein), IL-8, et MCP1 par les cellules sanguines humaines via le CD115 (Eda et al. 2010). Cependant des différences dans la signalisation induite ont été observées. En effet, l'IL-34 induit une phosphorylation plus forte mais transitoire du CD115 que le M-CSF, et diminue l'expression du récepteur (Chihara et al. 2010). D'autre part, il a été montré que l'IL-34 induit moins fortement l'expression de CD54 et MCP1 par les macrophages en raison d'une plus faible phosphorylation de STAT, une moindre migration, et induit une plus forte expression de HLA-DR et d'eotaxin-2 que le M-CSF (Chihara et al. 2010).

Au niveau fonctionnel, l'IL-34 peut substituer au M-CSF pour l'ostéoclastogénèse (Baud'huin et al. 2010). Comme le M-CSF, l'IL-34 augmente la viabilité des monocytes (Haishan Lin et al. 2008), la croissance de cellules issues de la moelle osseuse (Garceau et al. 2010), ainsi que l'adhésion et la prolifération des précurseurs des ostéoclastes, et est associée à la pathogénèse des tumeurs osseuses à cellules géantes (Baud'huin et al. 2010). L'injection systémique d'IL-34 chez la souris augmente le nombre de CD11b⁺ (Zhi Chen et al. 2011) et son association à RANKL (receptor activator of NFκB ligand) favorise l'ostéoclastogénèse à partir de cellules murines CD11b⁺ (Baud'huin et al. 2010) ou de monocytes CD14⁺ humains (Baud'huin et al. 2010)(Zhi Chen et al. 2011). Cependant, **l'efficacité de l'IL-34 est inférieure à celle du M-CSF pour induire l'ostéoclastogénèse** chez la souris (Baud'huin et al. 2010) et l'Homme (Zhi Chen et al. 2011), et pour induire la prolifération des macrophages chez la souris (S. Wei et al. 2010). De plus, **les deux protéines induisent des macrophages de morphologies différentes** (Chihara et al. 2010). L'expérience la plus probante a été de générer des souris op/op transgéniques pour l'expression de l'IL-34 sous le contrôle du promoteur du M-CSF. Wei et al. ont aussi montré que **les profils d'expression spatio-temporelle de l'IL-34 et du M-CSF sont différents et que l'IL-34 ne permet pas de compenser tous les défauts des souris op/op**. De plus, l'expression d'IL-34 n'est pas augmentée de façon compensatoire chez les souris op/op (M-CSF^{-/-}) mais diminuée, suggérant une régulation positive de l'IL-34 par le M-CSF (S. Wei et al. 2010).

Les souris CD115^{-/-} présentent des défauts qui ne sont pas observés chez les souris op/op (X.-M. Dai et al. 2002). Cette différence pourrait être due à l'abrogation de la voie IL-34/CD115. Le phénotype ostéopérotique des souris CD115^{-/-} est plus sévère que celui des souris op/op. L'expression de l'IL-34 dans les tissus synoviaux par les macrophages et les synoviocytes corrèle avec la sévérité de l'inflammation et l'érosion osseuse chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Chemel et al. 2012). Cependant, les souris IL-34^{-/-} ne présentent pas de signes d'ostéopérose, probablement en raison d'une compensation par le M-CSF (Yaming Wang et al. 2012). Les macrophages constituant la microglie dans le cerveau sont aussi plus affectés chez les souris CD115^{-/-} que chez les souris op/op. De même, les souris IL-34^{-/-} présentent un défaut de développement de la microglie (Yaming Wang et al. 2012). L'expression de l'IL-34 est plus forte dans le cerveau embryonnaire que l'expression du M-CSF (S. Wei et al. 2010). **Produite par les neurones, l'IL-34 favorise la prolifération des cellules de la microglie CD115⁺**, induit une enzyme permettant la dégradation de l'amyloïde oligomérique B toxique pour les neurones, augmente l'expression de HO-1 et du

TGF β par la microglie, et diminue le stress oxydatif, *in vitro* et *in vivo* (Mizuno et al. 2011) (D. Ma et al. 2012), sans affecter leur capacité de production de cytokines pro-inflammatoires (Yaming Wang et al. 2012). Enfin, **l'absence de cellules de Langerhans chez les souris CD115^{-/-}, pourtant présentes chez les souris op/op, est due à l'IL-34** (Yaming Wang et al. 2012). L'IL-34, sécrétée par les kératinocytes permettrait la différenciation et le maintien des cellules de Langerhans dans l'épiderme chez la souris. La déficience en IL-34 réduit le nombre de cellules de Langerhans dans l'épiderme, et par conséquent induit une moindre migration des cellules de Langerhans vers les ganglions drainants le site inflammé, réduisant les réactions d'hypersensibilité de contact et les réactions DTH (delayed-type hypersensitivity) (Yaming Wang et al. 2012).

PROJET DE RECHERCHE

Le blocage de la voie CD40 par des anticorps anti-CD40L ont permis de prolonger la survie de l'allogreffe chez la souris et le primate. **L'équipe a développé un vecteur adénoviral recombinant pour la molécule CD40Ig (AdCD40Ig) capable de prévenir le rejet aigu d'allogreffe cardiaque chez le rat.** En effet, Guillot a montré que le blocage de l'interaction CD40-CD40L par l'injection d'un AdCD40Ig dans la paroi musculaire du cœur greffé, le jour de la greffe, induit la survie à long-terme du greffon chez 93% des receveurs, vs. 9 jours chez les receveurs traités par un adénovirus non codant (Add1324) (Cécile Guillot et al. 2002).

Alors que le traitement de la souris par des anticorps anti-CD40L induit des lymphocytes Tregs CD4⁺ (L Graca et al. 2000), Guillonneau montre **l'induction de lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low}** par le traitement AdCD40Ig. De plus, le transfert de lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} induits par AdCD40Ig, contrairement aux cellules naturelles, est nécessaire et suffisant pour transmettre la survie à long terme du greffon à tous les receveurs naifs irradiés, et ce, de façon itérative (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007).

Ces cellules Tregs existent à l'état naturel chez l'Homme et le rat. Cependant leur rôle en transplantation humaine n'a pas encore été établi. **La compréhension de leurs mécanismes de suppression permettrait de moduler la réponse immune chez les patients transplantés et de réduire leur traitement par immunosuppresseurs.**

Afin d'identifier les molécules impliquées dans la suppression exercée par ces lymphocytes Tregs induites, les transcriptomes des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} induits par AdCD40Ig vs. naturels ont été comparés par puces pangénomiques. Trois cent quarante neuf gènes présentent une expression différentielle (pour un fold change >2, résultats non publiés). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans diverses fonctions, liées ou non au système immunitaire, ou de fonction inconnue. L'expression différentielle de 51 de ces gènes a été confirmée par PCR quantitative (Angin, Le Mauff, unpublished data). L'étude bibliographique de ces gènes a permis une pré-sélection des molécules les plus prometteuses (Caron, Le Mauff) (Figure 22).

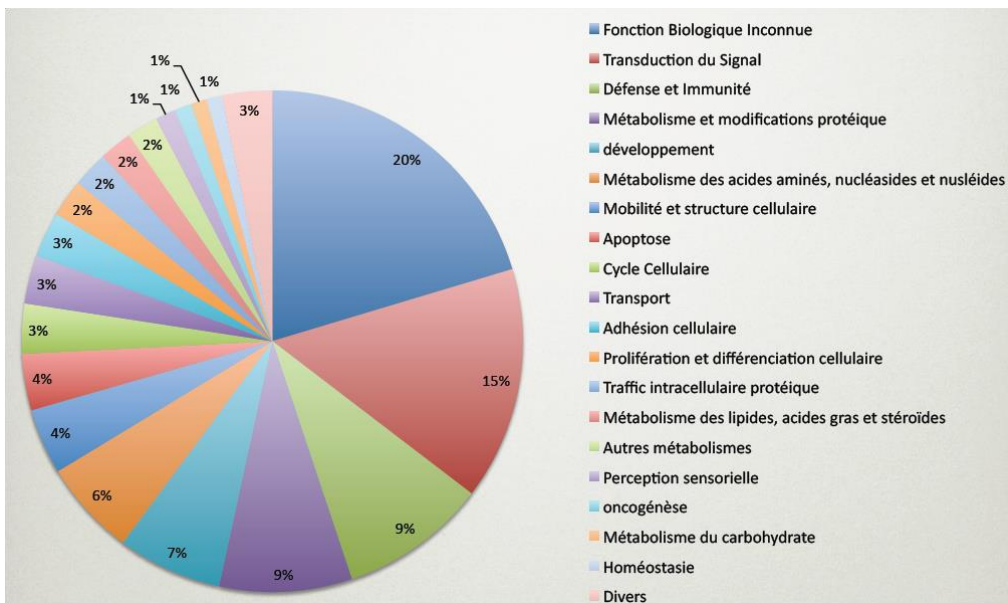


Figure 22. Répartition des gènes différentiellement exprimés entre les Tregs naturels et induits par CD40Ig selon leur fonction biologique.

D'après la thèse de Mathieu Angin, 2008

Les travaux de Guillonnet et al. ont mis en évidence l'implication de l'IFN γ dans la fonction suppressive des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low}. En effet, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de la rate des rats traités par AdCD40Ig ou transférés par des Tregs présentent une surexpression d'IFN γ comparés aux Tregs naturels. De plus, le blocage de l'IFN γ par des anticorps abroge la tolérance infectieuse induite par les Tregs (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007).

L'IFN γ produite par les Tregs peut agir via l'induction de l'expression de **IDO** par les cellules endothéliales du donneur. En effet, IDO est surexprimée dans le greffon des rats transférés par les Tregs et non par les Tregs eux-mêmes. Le blocage de l'IFN γ produit par les Tregs abroge la synthèse de kynurénine par les cellules endothéliales allogéniques *in vitro*, et l'inhibition de IDO (par l'inhibiteur 1-MT) abroge la prolongation de survie du greffon induite par les Tregs *in vivo* (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Ainsi suggérées, les propriétés suppressives de IDO ont été confirmées dans notre modèle d'allogreffe par injection d'un vecteur adénoviral recombinant pour IDO dans le greffon, suffisant pour empêcher le rejet aigu et induire une survie à long terme du greffon (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007).

La surexpression de IDO dans la rate des rats traités par AdCD40Ig suggère une seconde source de IDO (Guillonau, Marcelo Hill, et al. 2007). Les travaux de Li et al. montrent la migration des Tregs dans le greffon la première semaine suivant la greffe puis la colonisation de la rate durant le premier mois (X. L. Li et al. 2010). Il montre par ailleurs l'interaction privilégiée des lymphocytes Tregs avec les pDC dans la rate et le greffon, population amplifiée par le traitement par AdCD40Ig, et met en évidence la nécessité d'un contact entre les Tregs et les pDC, ainsi que l'importance de IDO dans la suppression exercée par les Tregs sur la prolifération de lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ syngéniques en réponse à des pDC allogéniques dans des expériences de culture en transwell *in vitro* (X. L. Li et al. 2010).

Ces tests de coculture, dans lesquels la prolifération de lymphocytes T $CD4^+CD25^-$ spléniques d'un receveur naif stimulés par des pDC spléniques d'un donneur peut être inhibée par les lymphocytes T régulateurs $CD8^+CD45R^{low}$ spléniques d'un receveur traité par AdCD40Ig, ont été utilisés pour analyser les capacités suppressives de molécules surexprimées par les Tregs après traitement par AdCD40Ig, au moyen d'anticorps bloquants. Ces tests *in vitro* ne remplacent pas les tests fonctionnels *in vivo*, mais permettent un affinage des molécules d'un potentiel intérêt thérapeutique avant leur étude *in vivo*. Ils ont notamment permis de confirmer l'implication de l'IFN γ et de IDO dans les mécanismes de suppression des lymphocytes Tregs (X. L. Li et al. 2010) (Figure 23).

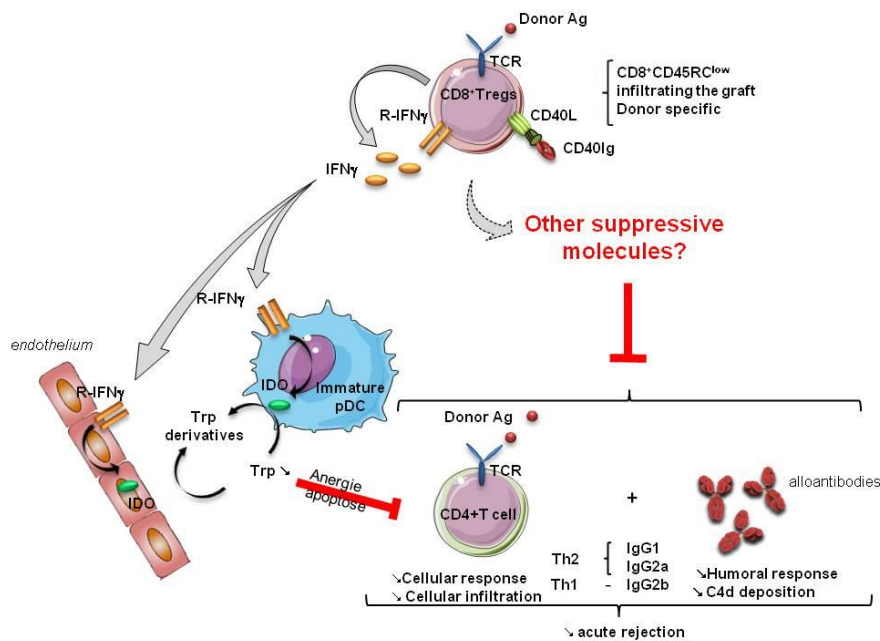


Figure 23. Etat des connaissances avant ce travail de thèse.

L'expression de IDO est induite dans les cellules endothéliales du greffon des animaux traités par AdCD40Ig en réponse à l'IFN γ . Le rôle de IDO, exprimé par les pDC, dans la suppression induite par les Tregs a été montré. Cependant, l'expression de IDO ne serait pas induite par l'IFN γ . Les mécanismes d'action de l'IFN γ *in vitro* restent à élucider. D'autres molécules surexprimées par les Tregs induits par CD40Ig vs naturels pourraient être immunorégulatrices.

Ce travail de thèse est focalisé sur l'étude de deux molécules identifiées, surexprimées par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} après traitement par AdCD40Ig vs. les Tregs naturels, FGL2 et IL-34. Nous avons étudié leur cinétique d'expression dans les organes dans lesquels s'accumulent les Tregs, leur implication dans la suppression induite par les Tregs *in vitro*, ainsi que leur capacité à prévenir du rejet d'allogreffe cardiaque chez le rat *in vivo*.

RESULTATS

Projet I

Résultats préliminaires

<p style="text-align: center;">Mécanismes et localisation des cellules T régulatrices CD8⁺ dans un modèle de tolérance à la transplantation cardiaque</p>

Xian Liang Li, Séverine Ménoret, Séverine Bezie, Lise Caron, Dominique Chabannes, Marcelo Hill, Franck Halary, Mathieu Angin, Michèle Heslan, Claire Usal, Liang Liang, Carole Guillonnet, Brigitte Le Mauff, Maria Cristina Cuturi, Régis Josien and Ignacio Anegón

Publié dans *Journal of Immunology* 2010;185:823-833.

Titre original: Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance

J'ai choisi de placer cet article en annexe de cette thèse, et de ne présenter que la figure 6 de l'article (figure 24 de la thèse) regroupant les résultats obtenus concernant FGL2 dans la section « résultats ».

Résumé de l'article comportant des résultats préliminaires

Malgré les nombreuses preuves de l'importance des cellules régulatrices CD8⁺ allospécifiques chez les rongeurs et les patients transplantés opérationnellement tolérants, les mécanismes par lesquelles les lymphocytes Tregs CD8⁺ induisent la tolérance sont mal connus. Nous avons précédemment montré que le traitement par CD40Ig induit la génération de lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} permettant la survie à long terme de l'allogreffe cardiaque chez le rat. Dans cet article, nous montrons que l'accumulation des Tregs CD8⁺ et de pDC tolérogènes dans le greffon et la rate, mais pas dans les ganglions lymphatiques, est associée à l'induction de la tolérance chez les receveurs d'allogreffe vascularisée. Les pDC, de façon préférentielle, stimulent la capacité des Tregs CD8⁺ à inhiber la réponse T CD4⁺ aux antigènes du donneur *in vitro*. Quand les Tregs CD8⁺ ne sont pas en contact avec les cellules effectrices CD4⁺, la suppression est induite via la molécule IDO. Le contact des Tregs CD8⁺ avec les cellules effectrices CD4⁺ change leurs mécanismes de suppression, en impliquant l'IFN γ et la fibroblast growth factor 2 (FGF2). *In vivo*, l'IDO et l'IFN γ sont impliqués dans l'induction de la tolérance, suggérant que le contact des Tregs CD8⁺ avec les cellules effectrices CD4⁺ est crucial pour moduler leur fonction *in vivo*. En conclusion, l'interaction des Tregs CD8⁺ avec les pDC est nécessaire pour l'inhibition des cellules T CD4⁺, impliquant différents mécanismes selon la présence ou non d'un contact entre les Tregs CD8⁺, les pDC, et les cellules effectrices CD4⁺.

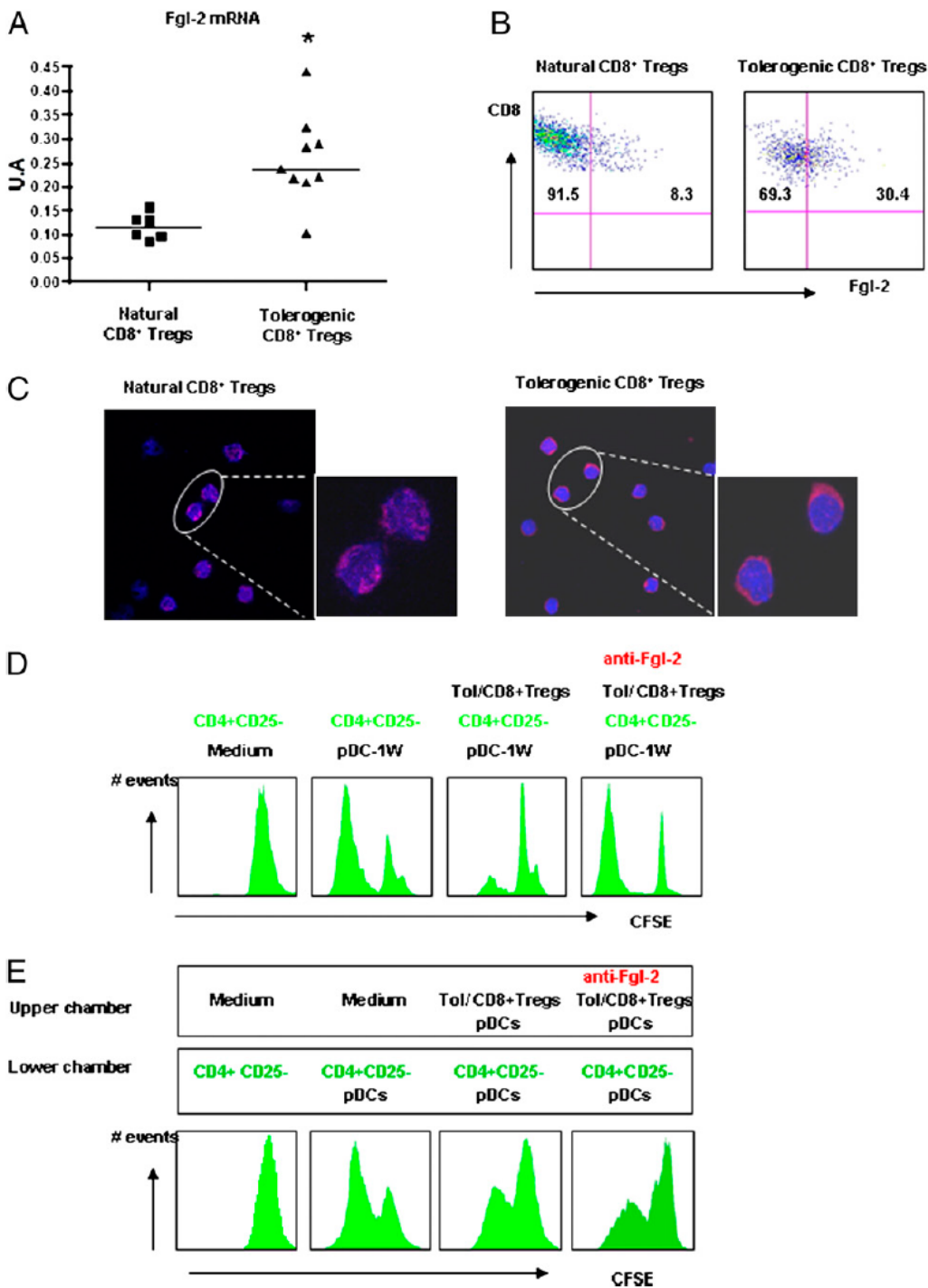


Figure 24. Implication de FGL2 dans la suppression exercée par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en contact avec les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻.

Le cœur d'un rat Lewis 1W a été greffé en position hétérotopique intra-abdominale chez un rat de souche Lewis 1A, différant par ses molécules de CMH (RT1^{u/u} et RT1^{a/a} respectivement). L'injection de $5 \cdot 10^{12}$ pi/rat d'un adénovirus recombinant pour CD40Ig (AdCD40Ig) dans le greffon, le jour de la greffe, permet la survie à long terme du greffon chez 93% des receveurs (Cécile Guillot et al. 2002) via la génération des lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} ont été purifiés à partir de la rate par FACS Aria (Ménoret et al. 2011) et analysés phénotypiquement et fonctionnellement.

L'analyse du transcriptome des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus des rats traités par AdCD40Ig, vs. les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} naturels par puces pangénomiques a mis en évidence la surexpression de FGL2 avec un « fold change » de 2,2.

Nous avons confirmé l'augmentation de l'expression de FGL2 par les Tregs induits par AdCD40Ig vs. Tregs naturels, au niveau des transcrits par PCR quantitative (Figure 24A), et au niveau protéique par cytométrie en flux (Figure 24B) et microscopie confocale (Figure 24C). L'implication de FGL2 dans la fonction suppressive des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} a par la suite été étudiée *in vitro* (Figure 24D). Dans ces expériences, les lymphocytes T CD4⁺ d'un receveur naïf (Lewis 1A) prolifèrent en présence de pDC allogéniques (issus d'un donneur de souche Lewis 1W). L'ajout de lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} de rats traités par AdCD40Ig inhibe la réponse T aux alloantigènes. De façon intéressante, l'ajout d'anticorps bloquant FGL2 empêche la suppression induite par les Tregs sur les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 24D). Des expériences similaires ont permis de mettre en évidence le rôle de l'IFN γ dans la suppression induite par les Tregs *in vitro* et *in vivo* (X. L. Li et al. 2010)(*cf annexe*). La séparation physique des lymphocytes Tregs et des lymphocytes T effecteurs n'abroge pas la suppression induite par les Tregs, cependant l'IFN γ n'est plus leur principal médiateur. Afin de déterminer l'importance du contact dans la suppression via FGL2, nous avons testé le blocage de FGL2 dans ces expériences de culture en transwell. De la même façon que l'IFN γ , le blocage de FGL2 n'abroge pas la suppression induite par les Tregs sur les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Figure 7E de l'article).

Article I

La Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induit la survie à long-terme de l'allogreffe par l'induction de lymphocytes B régulateurs

Séverine Bézine, Elodie Picarda, Laurent Tesson, Karine Renaudin, Justine Durand, Emmanuel Meriau, Elise Chiffolleau, Carole Guillonneau, Ignacio Anegon, Lise Caron.

Article en révision dans *Journal of Immunology*.

Titre original: Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induces long-term allograft survival through regulatory B cells.

**Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induces long-term
allograft survival through regulatory B cells.**

Séverine Bézie*, Elodie Picarda*, Laurent Tesson*, Karine Renaudin‡, Justine Durand*,

Emmanuel Meriau*, Elise Chiffolleau*, Carole Guillonneau*, Ignacio Anegon*§, Lise

Caron*§

*INSERM UMR 1064-ITUN, Nantes, France;

‡Centre Hospitalier Universitaire, Faculté de Médecine. 1, rue Gaston Veil 44035 Nantes

Cedex 1 France

§ both senior and corresponding authors.. INSERM 1064, 30 Boulevard Jean Monnet,

44093 Nantes, Cedex 1, France. E-mail lise.caron@univ-nantes.fr or

Ignacio.Anegon@inserm.fr. Fax: 33240087411. Telephone:

Running title: FGL2 induces allograft survival through B cells

Grant support: This work was supported by a research fellowship from the French Transplantation Society and the Fondation Progreffe (to S. B.) as well as a grant from the Roche Organ Transplantation Research Foundation (to I.A.).

Keywords. Bregs, cytokines, tolerance, transplantation.

ABSTRACT

Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin has been previously described as being produced by CD4⁺ Tregs. In a rat model of heart transplantation tolerance dependent on CD8⁺ Tregs, we recently showed that these cells over-express FGL2. In the present manuscript we show that *in vivo*, over-expression of FGL2 through gene transfer without any further treatment resulted in inhibition of allograft rejection. Adoptive cell transfer of splenocytes from FGL2-treated rats with long-term survival (> 100 days) inhibited acute and chronic rejection in a donor-specific and infectious tolerance manner, since adoptive transfer up to a fourth consecutive recipient resulted in transplantation tolerance. Adoptive cell transfer also efficiently inhibited anti-donor antibody production. Analysis of all possible cell populations among splenocytes revealed that B lymphocytes were sufficient for this adoptive cell tolerance. These B cells were also capable of inhibiting the proliferation of CD4⁺ T cells in response to allogeneic stimuli. This is the first description of regulatory B cells generated by FGL2 and capable of inducing infectious tolerance.

INTRODUCTION

Different types of T cells, B cells and DCs have immunosuppressive properties (1–3). Understanding the generation and function of these cells could help to find new specific immunosuppressive strategies to avoid long-term exposure to broad spectrum immunosuppressive treatments in patients with transplanted organs or autoimmune diseases.

In a model of cardiac allotransplantation in rats, we have previously shown that blocking CD40-CD40L by treatment with CD40Ig induces long-term graft survival through generation of alloantigen-specific CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells (CD8⁺ Tregs) (4). Suppressive CD8⁺ Tregs with the same phenotype are also found in humans (5). We have previously shown that rat CD8⁺ Tregs are capable of transferring transplantation tolerance through IFN γ production, which induces IDO in different cell types (4). Nevertheless, other mechanisms are also active and in general little is known about the mechanisms and molecules involved in the function of these or other CD8⁺ Tregs (6).

Transcriptomic comparison of CD8⁺ Tregs from rats treated with CD40Ig and with long-term allograft survival vs. naïve rats, revealed fibrinogen-like protein 2/fibroleukin (FGL2) over-expression (7). Some studies have shown that cell membrane-associated FGL2 has a prothrombinase activity involved in acute graft rejection when expressed in the donor organ (8, 9). In contrast, several studies have also shown that soluble FGL2 has immunosuppressive functions, such as that mediated by CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (10, 11). In this regard, FGL2 produced by CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ Tregs favors the development of hepatitis in mice (11) and in humans (12) at least partly by inhibition of virus clearance. Moreover, FGL2 protein administration prolongs skin allograft survival in wild-type but not Fc γ RIIB KO mice (13). In the rat, we have shown that FGL2 is involved in CD8⁺CD45RC^{low} Treg suppression of *in vitro* CD4⁺ T cell responses (7).

Nevertheless, the significance of FGL2 in this rat cardiac allograft survival *in vivo* and in a more general way in allotransplantation remains to be determined.

In this work we show that *in vivo* FGL2 expression through gene transfer results in inhibition of allograft rejection and generation of regulatory B cells (Bregs) capable of iterative transfer of allograft tolerance.

MATERIALS AND METHODS

Animals and cardiac transplantation models.

Heart allotransplantation was performed between MHC incompatible male LEW.1W (donors, haplotype RT1u) and LEW.1A (recipients, haplotype RT1a) rats as previously described (4). Third-party grafts were from the Brown-Norway strain (haplotype RT1n). Heart survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. The experiments were approved by the regional ethical committee for animal experimentation.

Quantitative RT-PCR.

The isolation and retrotranscription of mRNA as well as the quantification of specific mRNA levels using SYBR green technology after normalization to HPRT values have been described (4). The sequence of primer pairs for rat *fgl2* were

5'-CAAGAACACAACCAGCCAAATCC-3' (forward) and

5'-CCCAGCCAAAATTCTCGTTCAA-3' (reverse).

Monoclonal antibodies and flow cytometry.

The antibodies used for the detection of T cells (R7/3), CD4⁺ T cells (OX35), CD8⁺ T cells (OX8), CD8⁺CD45R^{low} T cells (OX8, OX22), pDCs (85C7 expressed by pDCs (14), OX35 for CD4, His24 for CD45R), and CD45RA⁺ cells (OX33) were obtained, with the exception of 85C7, from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). All biotin-labeled mAbs were visualized using Streptavidin-PE-Cy7 (BD Biosciences) or Streptavidin-Alexa405 (BD Biosciences). FGL-2 was detected using a polyclonal antibody produced in house (see below for details). FcγRIIB was detected using a rabbit anti-FcγRIIB mAb (Epitomics, Burlingame, California). IFNγ was blocked with mAb DB1 (hybridoma DB1, IgG1, kindly provided by P.H. Van der Meisle, Rijswijk,

The Netherlands). Antibodies against IgD, IgM, CD80 (3H5), CD86 (24F), RT1B (OX6), CD27 (LG 3A10), CD24 (His50), CD5 (OX19) and CD11b (MRC OX42) expression markers were used to characterize the CD45RA⁺ cell phenotype. A Canto II cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence and data were analyzed using FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Cells were first gated by their morphology and dead cells excluded by selecting DAPI viable cells.

Generation of a polyclonal rat FGL2 antibody.

Rabbits were immunized against two rat fgl2-specific peptidic sequences CKLQADEHPDPGGN and CYKFSFKKAKMMIRPKSFKP (PolyPeptide Laboratories, France). Rat FGL2 antibodies were purified from serum with a peptide-coupled NHS-HiTrap column. Albumin contamination was removed with protein A columns. Eluat purity was checked by Silver-Nitrate coloration. Anti-FGL2 reactivity was tested against both rat FGL2 peptides used for Ab production by ELISA. The human-recombinant FGL2-GST protein (Abnova) was tested by western blot and the rat FGL2 protein expressed in cells transfected by a plasmid encoding FGL2 (pIFGL2 see below) was tested by FACS. FGL2 blocking activity was tested in coculture tests, using the antibodies at 100 µg/ml, as previously described (7).

AAV generation and gene transfer.

The rat FGL2 and control GFP plasmids were constructed by positioning the respective complete cDNA sequences downstream of a RSV promotor and the Igκ signal peptide. The plasmids were first tested in HEK293T cells transfected with lipofectamine reagent ([Life Technologies](#), Carlsbad, CA). GFP expression was observed 24h later. Cells and supernatants were analyzed for FGL2 expression 48h after transfection, by FACS and western blot to confirm FGL2 expression detection. The plasmids were then used to produce AAV vectors of serotype 8 (LTG platform, INSERM UMR 1089, Nantes),

respectively AAV-FGL2 and AAV-GFP. HEK293T cells were transduced with 10^2 to 10^5 vector genome copies/cell of AAV-FGL2 or AAV-GFP and $5 \cdot 10^3$ for AdLacZ. Twenty-four hours later, since GFP was expressed, cells were harvested and analyzed for FGL2 expression by PCR and by FACS before adenoviral-induced cell apoptosis. Recombinant AAV-FGL2 and AAV-GFP vectors ($5 \cdot 10^8$ infectious particles/kg or $3 \cdot 10^{12}$ vector genomes/kg) were injected *i.v.* (in a volume of 500 μ l) or *i.m.* (3 injection points with 70 μ l/point) into the hind leg of 4-week-old rats, one month before the transplantation. A blood sample was taken for donor-specific alloantibody quantification at day 120 post transplantation.

Mixed lymphocyte reaction

Naïve Lewis 1A $CD4^+CD25^-$ T cells, Lewis 1W cDCs and pDC, as well as AdCD40Ig-treated Lewis 1A $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs were sorted as previously described (7). $5 \cdot 10^4$ $CD4^+CD25^-$ and $CD8^+CD45RC^{low}$ Tregs, and 12500 pDC were cultured per well (7). The suppressive activity of B cells was tested by adding $CD45RA^+$ FACS-sorted B cells at a 1:1 ratio with $CD4^+CD25^-$ T cells. Human recombinant FGL2-GST protein was added to $CD4^+$ T cells and pDC from 0.4 to 10 μ g/ml for analysis of suppressive activity. Rabbit anti-rat FGL2 antibodies or control immunoglobulins were tested for blocking activity at 100 μ g/ml. Proliferation of CFSE-labelled $CD4^+CD25^-$ T cells was analyzed by flow cytometry 6 days later, by gating on TCR^+CD4^+ cells (R7/3-APC, OX35-PECY7) among live cells (DAPI negative) (**supplemental data 1**).

Donor specific alloantibody quantification.

Donor spleens were digested by collagenase D, stopped with 400 μ l of 0.1mM EDTA, and red cells were lysed. Serum complement was inactivated by heating prior to incubation with donor splenocytes at a 1/8 dilution and revelation with either anti-rat IgG1 (MCA 194, Serotec), anti-rat IgG2a (MCA 278, Serotec), or anti-rat IgG2b (MAC195, Serotec)

and anti-Ms Ig-488 as an Isotype control (ref 11029, Serotec). A FACS Canto (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence and data were analyzed using FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Geometric mean fluorescence intensity (MFI) of tested sera was divided by the mean MFI values of 5 naive Lewis-1A sera used as controls.

Adoptive cell transfer.

Spleens were digested by collagenase D for 15 minutes at 37°C, stopped with 400 µl of 0.1 mM EDTA, and red cells were lysed. Splenocytes were sorted by FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA) by gating on TCRαβ-APC (R7/3) and TCRγδ-FITC (V65), CD8⁺CD45RC^{low} T cells (OX8, OX22), pDC (85C7), or CD45RA-biotin-Streptavidin-PE-Cy7 (OX33) positive cells. The purity of the sorted populations was greater than 99%. Fractions of total splenocytes ($\geq 100 \cdot 10^6$ cells) and FACS Aria-sorted CD45RA⁺B cells or T cells ($\geq 16 \cdot 10^6$ cells), CD8⁺CD45RC^{low} ($5 \cdot 10^6$ cells), or pDC ($1 \cdot 10^6$ cells) were adoptively transferred *i.v.* the day before transplantation into naïve LEW-1A recipients that had received 4.5 Gr of whole-body irradiation the same day.

CD45RA⁺ cell differentiation.

CD45RA⁺ cells from naive Lewis 1A spleens were sorted by FACS Aria and incubated for 24h at 37°C with or without FGL2-GST recombinant protein and 1µg/ml CpG ODN 2006.

Statistical analysis.

The One-Way ANOVA Kruskal Wallis test and Dunn's post-tests were used for analysis of PCR and coculture experiments. The Two-Way ANOVA test and Bonferroni post tests were used for donor-specific antibody analysis and splenocyte phenotype characterization, and the Mantel Cox test was used to analyze survival curves.

RESULTS

FGL2 involvement in AdCD40Ig-mediated long-term graft survival.

We have previously reported that FGL2 was over-expressed at both mRNA and protein levels in CD8⁺ Tregs from AdCD40Ig-treated versus naïve rats and we also showed that FGL2 was involved in the suppression mediated by these cells *in vitro* (7). To confirm the *in vivo* involvement of FGL2 in CD8⁺ Treg-mediated suppression, we studied FGL2 expression in the graft, where CD8⁺ Tregs are recruited and exert their effects (7). During the first days following transplantation, a significant increase in *Fgl2* transcript was detected in the graft of AdCD40Ig-treated versus non-treated rejecting and non-grafted naïve rats, which returned to baseline levels in long-term surviving grafts (> 120 d) (**Fig. 1**). These kinetics correlated with the accumulation of CD8⁺ Tregs in the graft during the first week followed by their migration towards the spleen during the first month, as previously described (7). In contrast, FGL2 levels in the spleen were comparable in all groups of animals (**data not shown**).

Immunosuppressive functions of FGL2 *in vitro*

FGL2 expression can be induced by IFN γ -stimulation of macrophages and endothelial cells (15, 16) and CD8⁺ Tregs produce IFN γ (4). To study the relationship between these two molecules, we analyzed FGL2 production by CD8⁺ Tregs cocultured with CD4⁺ T cells and allogeneic pDCs, with or without an IFN γ -blocking Ab. Analysis of the expression of FGL2 by CD8⁺ Tregs in the presence of IFN γ -blocking mAb vs. control cultures was decreased 60% (**Fig. 2 A and B**). This argues in favor of an IFN γ -dependent FGL2-induction pathway in CD8⁺ Tregs. pDCs were used in these experiments and in the

ones described below because we found that CD8⁺ Treg were activated optimally by pDCs and vs. myeloid DCs (7).

To further confirm these results, we produced a polyclonal Ab against rat FGL2 that, when included in the allogeneic MLR, abrogated CD8⁺ Treg-mediated suppression of CD4⁺ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs (**Fig. 2 C**).

To confirm the suppressive functions of FGL2 in an MLR, we cocultured CD4⁺CD25⁻ T cells as responder cells, with allogeneic pDCs as stimulator cells, in the presence of a range of recombinant FGL2 protein concentrations. Analysis of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation showed a dose-dependent inhibition of proliferation by FGL2 (**Fig. 2 D and E**).

FGL2 has been described to deliver inhibitory signals to bone marrow-derived DCs by binding to FcγRIIB (13, 17). Using an anti-rat FcγRIIB mAb we observed, by both FACS and confocal analysis, that rat pDCs express FcγRIIB (**Fig. 3 A**). When FGL2 was incubated with pDCs or CD4⁺ responder T cells 1h prior to a MLR and washed, or with both cell types during the MLR, we observed inhibition of CD4⁺ T cell proliferation only when FGL2 was present during the MLR (**Fig. 3 B**). These results indicate that the suppressive effect of FGL2 on CD4⁺ T cells requires the presence of pDCs during the whole MLR assay and not just a short pulse previous to the assay.

FGL2 induces long-term graft survival

We tested the effect of FGL2 on cardiac allograft survival in rats using an AAV recombinant vector encoding the complete sequence of rat FGL2 (AAV-FGL2). We first confirmed the expression of the FGL2-recombinant plasmid (pFGL2), used afterwards to generate AAV-FGL2, by transfection in HEK293T cells. FGL2 secretion in cell supernatants from transfected cells was detected by western blot using the homemade

anti-rat FGL2 antibody and by FACS (**supplemental data 2 A, B and C**). FGL2 expression was then confirmed in AAV-FGL2 transduced cells by quantitative RT-PCR and FACS analysis (**supplemental data 2 D and E**).

To analyze the tolerogenic effect of FGL2 *in vivo*, untreated allograft recipients received AAV-FGL2 either by intravenous injection 30 days before the allotransplant, since we and others have shown maximal expression levels of sequences vectorized by AAV vectors around this time point with long lasting expression thereafter (18, 19). Intravenous injection of AAV-FGL2 resulted in a significant prolongation of graft survival vs. untreated or AAV-GFP-treated recipients, with 38% of animals presenting long-term (>100 days) surviving grafts (**Fig. 4**). FGL2 has been shown to moderately prolong allograft survival in mice (13) but our results indicate that it can also generate tolerogenic mechanisms robust enough to induce long-term allograft survival.

FGL2 induces splenic tolerogenic cells capable of infectious allogeneic graft acceptance.

To determine whether FGL2 over-expression resulted in the generation of a tolerogenic cell population, splenocytes from AAV-FGL2-treated rats with long-term surviving allografts were transferred to minimally irradiated recipients, the day before the transplant. This resulted in long-term graft survival for all animals, contrary to cells from non-treated rats (**Fig. 5**). Moreover, splenocytes from these adoptively transferred tolerant recipients were again capable of transferring tolerance in second, third and fourth cycles of splenocyte transfer resulting in long-term graft survival for 100%, 66%, 75%, and 100% of grafted hearts, respectively (**Fig. 5**). Adoptive transfer of long-term allograft survival was donor-specific since hearts of Brown-Norway third-party origin were

rejected. Thus, splenocytes from FGL2-treated rats contained a cell population capable of inducing infectious tolerance in a donor-specific manner.

Alloantibody levels and tissue graft analysis

To further analyze the immune mechanisms underlying long-term allograft survival by FGL2 treatment and transfer of tolerogenic splenocytes. Alloantibody levels of the IgG1, IgG2a and IgG2b isotypes were all significantly reduced in AAV-FGL2-treated recipients with long-term surviving grafts vs. controls (**Fig. 6**). Recipients with adoptively transferred splenocytes showed a further decrease in alloantibody levels, including IgG1, IgG2a or IgG2b, resulting in levels significantly lower than those of AAV-FGL2-treated rats and comparable to those of naive animals (**Fig. 6**). This indicates that FGL2 globally inhibited anti-donor immune responses without a preferential Th1 or Th2 switch (IgG2b or IgG2a and IgG1, respectively) (20).

FGL2 induces regulatory B cells

In order to identify the cell populations involved in infectious tolerance, we first analyzed the phenotype of FGL2-treated and transferred splenocytes vs. splenocytes from naïve animals. No statistically significant changes were seen among CD8⁺ T, CD8⁺CD45RC^{low} T, CD45R⁺ B cells, CD4⁺ T or pDCs (**data not shown**).

We then purified different spleen cell populations and performed adoptive transfer. Transfer of TCR⁺ or CD8⁺CD45RC^{low} T as well as pDCs did not delay acute rejection (median 20 days) (**Fig. 7 A**). In view of these results, we analyzed the tolerogenic potential of B cells *in vivo*. B cells represent 40% of splenocytes and some populations of

regulatory B cells have been recently identified in mice and humans (2). We did not observe any increase in the number of CD45RA⁺ B cells in spleens from recipients with long term graft survival treated with FGL2-AAV. Nevertheless, a phenotypic analysis of graft cells isolated from 4th-splenocyte-transferred recipients highlighted an infiltration by CD45RA⁺ B cells 100 days post transplantation (**data not shown**). CD45RA⁺ B cells from adoptively transferred rats with long-term surviving grafts were sorted by FACS Aria (**supplemental data 3**) and transferred to naïve rats one day before transplantation. This resulted in a long-term graft survival whereas CD45RA⁺ B cells from naïve non-transplanted rats did not have an effect (**Fig. 7 A**). This supports the involvement of B cells in this infectious tolerance phenomenon initiated by FGL2 treatment.

The suppressive properties of B cells from splenocyte-transferred tolerating rats were also tested *in vitro*. In MLR experiments, CD45RA⁺ B cells isolated from rats with long-term surviving grafts (FGL2 CD45RA⁺ B cells) inhibited CD4⁺ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs or anti-CD3-induced proliferation, unlike CD45RA⁺ B cells from naïve rats (**Fig. 7 B and C**).

We phenotypically characterized the CD45RA⁺ B cells that were used for adoptive transfers. CD45RA⁺ cells had a decrease in the proportion of follicular B cells (IgM⁺IgD⁺) due and an increased in transitional T1 population (IgM⁺IgD⁻) but also in isotype-switched cells (IgM⁻IgD⁻) (**Fig. 7 D**). These CD45RA⁺ B cells expressed more FcγRIIB when they came from splenocyte-transferred recipients than control rats, suggesting a higher responsiveness to FGL2 (**Fig 7 E**). The few studies reporting FGL2 interaction with B cells described apoptosis induction (13, 17). We incubated naïve B cells in the absence or presence of CpG as an activator of B cells and in the presence or absence of FGL2 protein for 24 hours and observed no apoptosis or modification in phenotype (**supplemental data 4**).

We further analyzed the phenotype of the tolerogenic CD45RA⁺ cells *in vivo*. Following the transfer of tolerogenic CD45RA⁺ cells, a large proportion (31.5 %) of cells observed within the grafts were CD45RA⁺ whereas CD45RA⁺ cells were barely detectable in syngeneic grafts (**Fig. 7 F**). Whereas tolerogenic B cells were rather immature before injection, the CD45RA⁺ cells infiltrating the graft expressed a more mature phenotype in B-cell transferred recipients, since 60.1 ± 11.2 % of graft CD45RA⁺ cells had switched from an IgM to an IgD isotype (CD45RA⁺IgM⁺IgD⁻) vs. 8.6 ± 0.8 % in the spleen. Consequently, only 13.6 ± 6.4 % of CD45RA⁺ cells showed a follicular maturation status (CD45RA⁺IgM^{high}IgD^{low}) in the graft vs. 55.8 ± 2.6 % in the spleen (**Fig. 7 G**). Correlating with these results, CD24, a marker of transitional immature B cells, was less expressed by CD45RA⁺ graft infiltrating cells as compared with splenic B cells from the spleens of both adoptively-transferred recipients and control naïve splenocytes, whereas the maturation marker CD27 tended to be increased in the graft cells, albeit without significance, and CD5 was roughly comparable (**Fig. 7 H**).

DISCUSSION

In this manuscript we describe, for the first time, the capacity of FGL2 to induce long-term allograft survival through active cellular tolerogenic mechanisms. This tolerogenic effect was mainly mediated by Bregs.

FGL2 has a dual prothrombinase and immunoregulatory activity, depending on its expression at the cell membrane or as a secretory molecule, respectively. FGL2 prothrombinase activity has been postulated to directly convert prothrombin to thrombin (21, 22). The cell membrane expression of FGL2 by cells of affected organs favors fibrin deposition in cardiac allografts (8) and xenografts (9, 23), viral fulminant hepatitis (24) and experimental arthritis (25). FGL2 also exists as a secretory molecule with immunoregulatory activity (13, 17, 26). In transplantation, administration of soluble FGL2 was shown to double skin allograft survival (from ~7 days in controls to ~16 days) but did not result in long-term survival (13). Recently, FGL2 together with Foxp3 and killer cell lectin-like receptor G1, were shown to be over-expressed in models of liver and cardiac transplantation tolerance (27). In line with this tolerogenic function in transplantation, mice deficient in FGL2 develop autoimmune glomerulonephritis (17) and FGL2 has been shown to be expressed by mouse CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (10) and CD8⁺ α suppressive intraepithelial T cells (28). Additionally, a suppressive function for FGL2 produced by mouse CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs has been demonstrated both *in vitro* and *in vivo* (11). FGL2 was also found to inhibit LPS-induced maturation of mouse BMDCs (26). Contrary to these results, FGL2-deficient mice rejected cardiac and skin allografts with identical timing to controls and also showed normal immune responses to microorganisms inducing a type 1 response (16). We already reported that the suppressive effect of rat CD8⁺ Tregs was at least partially mediated by FGL2 (7) and we confirmed these results in the present manuscript by inhibition of MLR by FGL2 and by the use of a

novel anti-rat FGL2 antibody. It is not surprising that FGL2 mRNA was expressed during the first days following transplantation in the spleen of rats with untreated allogenic grafts and that its expression was further increased in the grafts of AdCD40Ig-treated rats during the first week (Fig 1), as this correlates with graft infiltration by FGL2-overexpressing CD8⁺ Tregs (7).

Bregs have been described in autoimmunity, cancer and transplantation (29). In transplantation, Bregs have been described in a mouse model treated with anti-CD45RB alone (30) or in combination with anti-TIM-1 antibody (31) and in a rat model treated with an analogue of the immunosuppressor deoxyspergualin (32). The possibility of Bregs has been suggested in spontaneously tolerant kidney transplant patients (33, 34). Although Bregs have been shown to transfer transplant tolerance (31)(32), to the best of our knowledge, our results describe, for the first time, the capacity of Bregs to induce infectious tolerance. This phenomenon refers to tolerance transferred serially to new naïve T cells by regulatory cells specifically for first-donor alloantigens and not third-party donors, usually through DCs (35) and until now described for CD4⁺ Tregs (36) and CD8⁺ Tregs (4). Bregs mediate their effects by a variety of mechanisms, including IL-10, which has been reported in several models, as well as TGFbeta and FasL (29). Bregs develop from a variety of stimulation protocols including TLR ligands or CD154 signaling and this variability may explain the differences in phenotype and suppressive mechanisms exerted by Bregs (29). There is also variability in the phenotype of B cells, with some B cells from autoimmune models expressing markers of marginal zone and transitional 2 precursors (IgM⁺IgD⁺CD19⁺CD1d^{high}CD24⁺CD5⁺CD27⁻) (29, 37). Other models, such as *Salmonella* infection, have shown a mature phenotype (CD19⁺CD138⁺) (38). Some transplantation models have described Bregs as mature cells that are blocked in their differentiation (32, 39). In general, Bregs do not display a phenotype of mature

naïve follicular B cells (IgM⁺IgD⁺). This variability also raises the question of whether different Breg populations exist, as is the case for CD4⁺ and CD8⁺ Tregs. Due to the lack of antibodies against useful markers to define the maturation of B cells (CD1, CD21, CD23, CD38, CD138 and IL-10) in the rat, it is not possible to directly compare rat B cells with their human or mouse counterparts. Nevertheless, the available markers showed that in our model, B cells among splenocytes capable of transferring long-term allograft survival showed significantly fewer naïve follicular B cells with a concomitant increase in transitional and isotype-switched B cells. In B cell-transferred recipients, the B cells in the graft had a higher proportion of isotype-switched cells vs. the spleen and a lower proportion of transitional CD24⁺ cells. The proportion of CD5⁺ Bregs was not higher than in controls but differently to mice, the rat does not have CD5⁺ B1a cells (40). In our model, Bregs accumulated in the graft and displayed a mature phenotype. Only a few previous studies have detected Bregs at the site of inflammation in various models, mainly those of lupus and autoimmune colitis in mice (41, 42).

The effect of FGL2 on Breg generation is novel. FcγRIIB is one of the receptors of FGL2, albeit the existence of others is not excluded (13, 17). FcγRIIB was reported as a marker of tolerance in patients with a Breg signature (33, 34). Moreover, a very recent manuscript described Bregs that have, as a prominent feature, high expression of FcγRIIB (43). Since both pDCs and B cells express FcγRIIB, the emergence of Bregs by FGL2 could have been the consequence of an indirect effect on B cells through pDCs and/or a direct effect on B cells. Further experiments are needed to dissect these possibilities but our present results showing that FGL2 inhibited CD4⁺ effector cells in the presence of pDCs as well as the infectious tolerance and previous reports on the effect of FGL2 on myeloid DCs (13, 17, 26) suggest that at least pDCs may act upstream on the induction of Bregs by FGL2. Furthermore, FGL2 did not induce changes in the maturation or

apoptosis of B cells in the presence or absence of CpG stimulation. To our knowledge, the induction of Bregs by CD4⁺ or CD8⁺ Tregs, as seems to be the case in our model where CD8⁺ Tregs act through FGL2, has not been described before.

The mechanisms by which mouse or human Bregs inhibit T cell responses include the generation of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs (44–46) or other types of Tregs (41), as well as a direct effect on CD4⁺ T cells, usually through IL-10 (29)(43). More experiments are needed to prove whether the Bregs in our model are actively regulating through their action on DCs that in turn tolerize CD4⁺ T cells or directly inhibiting CD4⁺ cells. Both mechanisms seem plausible since FGL2 not only inhibited MLRs (in the presence of pDCs and CD4⁺ cells) and generated infectious tolerance, but also inhibited proliferation of CD4⁺ T cells stimulated by anti-CD3 in the absence of pDCs

CD40 signaling has been shown to be important for Breg development (29, 30). It is therefore possible that in our original model of allograft tolerance induced by blockade of CD40 signaling through treatment with CD40Ig, the emergence of CD8⁺ Tregs producing FGL2 was promoted (7) but not of Bregs. In CD40Ig-treated recipients, FGL2 likely promoted allograft tolerance through inhibition of CD4⁺ T cells. In FGL2-treated recipients in the presence of intact CD40 signaling, the immunoregulatory effects of FGL2 were likely both, inhibition of CD4⁺ T cells and promotion of Bregs.

The role of BCR signaling in Breg generation has been suggested in some studies but has not yet been formally proven (29). A dissociation between Breg function and antibody production has been described in which B cell-restricted deficiency of calcium sensors results in exacerbation of EAE with conserved antibody production (47). Analogously, Breg function in the anti-CD45RB transplantation tolerance model in mice was independent of antibody production (30). Our results showing donor-specific suppression

suggest that BCR recognition of donor antigens could be involved. Since alloantibody production was inhibited, it is possible that signaling through the BCR was modified by FGL2-mediated of Fc γ RIIB with decrease alloantibody production and simultaneous production of immunosuppressive molecules.

In our model, CD8⁺ Tregs were a source of FGL2 but since CD4⁺ Tregs also produce FGL2 (10), it is possible that Bregs may be induced in other models of transplantation tolerance through FGL2. Since FGL2 also inhibits CD4⁺ T cell proliferation not only in the rat but also in the mouse (26), it is likely that FGL2 immunoregulation acts at different levels that need to be defined in humans. The induction of Bregs by FGL2 is a new tolerogenic mechanism that underlines the emergence of Bregs as a tolerogenic cell population and has the potential to be used in the clinics either as a marker or as an inducer of tolerance.

REFERENCES

1. Picarda, E., I. Anegon, and C. Guillonneau. 2011. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3: 35–37.
2. Mauri, C., and M. R. Ehrenstein. 2008. The “short” history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 29: 34–40.
3. Manicassamy, S., and B. Pulendran. 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol. Rev.* 241: 206–227.
4. Guillonneau, C., M. Hill, F.-X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Hervé, X.-L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Ménoret, A. Saoudi, B. Le Mauff, R. Josien, M. C. Cuturi, and I. Anegon. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 1096–1106.
5. Ordonez, L., I. Bernard, F.-E. L’faqihi-Olive, J. W. C. Tervaert, J. Damoiseaux, and A. Saoudi. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS ONE* 4: e5287.
6. Guillonneau, C., E. Picarda, and I. Anegon. 2010. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* .
7. Li, X. L., S. Ménoret, S. Bezie, L. Caron, D. Chabannes, M. Hill, F. Halary, M. Angin, M. Heslan, C. Usal, L. Liang, C. Guillonneau, B. Le Mauff, M. C. Cuturi, R. Josien, and I. Anegon. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* 185: 823–833.
8. Ning, Q., Y. Sun, M. Han, L. Zhang, C. Zhu, W. Zhang, H. Guo, J. Li, W. Yan, F. Gong, Z. Chen, W. He, C. Kosciak, R. Smith, R. Gorczynski, G. Levy, and X. Luo. 2005. Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/fibroleukin in experimental and human allograft rejection. *J. Immunol.* 174: 7403–7411.
9. Ghanekar, A., M. Mendicino, H. Liu, W. He, M. Liu, R. Zhong, M. J. Phillips, G. A. Levy, and D. R. Grant. 2004. Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *J. Immunol.* 172: 5693–5701.
10. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6: 1142–1151.
11. Shalev, I., K. M. Wong, K. Foerster, Y. Zhu, C. Chan, A. Maknoja, J. Zhang, X.-Z. Ma, X. C. Yang, J. F. Gao, H. Liu, N. Selzner, D. A. Clark, O. Adeyi, M. J. Phillips, R. R. Gorczynski, D. Grant, I. McGilvray, and G. Levy. 2009. The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. *Hepatology* 49: 387–397.

12. Foerster, K., A. Helmy, Y. Zhu, R. Khattar, O. A. Adeyi, K. M. Wong, I. Shalev, D. A. Clark, P.-Y. Wong, E. J. Heathcote, M. J. Phillips, D. R. Grant, E. L. Renner, G. A. Levy, and N. Selzner. 2010. The novel immunoregulatory molecule FGL2: a potential biomarker for severity of chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 53: 608–615.
13. Liu, H., I. Shalev, J. Manuel, W. He, E. Leung, J. Crookshank, M. F. Liu, J. Diao, M. Cattral, D. A. Clark, D. E. Isenman, R. M. Gorczynski, D. R. Grant, L. Zhang, M. J. Phillips, M. I. Cybulsky, and G. A. Levy. 2008. The FGL2-FcγRIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *Eur. J. Immunol.* 38: 3114–3126.
14. Anjubault, T., J. Martin, F.-X. Hubert, C. Chauvin, D. Heymann, and R. Josien. 2012. Constitutive expression of TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE)/receptor activating NF-κB ligand (RANK)-L by rat plasmacytoid dendritic cells. *PLoS ONE* 7: e33713.
15. Liu, M., M. Mendicino, Q. Ning, A. Ghanekar, W. He, I. McGilvray, I. Shalev, D. Pivato, D. A. Clark, M. J. Phillips, and G. A. Levy. 2006. Cytokine-induced hepatic apoptosis is dependent on FGL2/fibroleukin: the role of Sp1/Sp3 and STAT1/PU.1 composite cis elements. *J. Immunol.* 176: 7028–7038.
16. Hancock, W. W., F. M. Szaba, K. N. Berggren, M. A. Parent, I. K. Mullarky, J. Pearl, A. M. Cooper, K. H. Ely, D. L. Woodland, I.-J. Kim, M. A. Blackman, L. L. Johnson, and S. T. Smiley. 2004. Intact type 1 immunity and immune-associated coagulative responses in mice lacking IFN gamma-inducible fibrinogen-like protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 3005–3010.
17. Shalev, I., H. Liu, C. Kosciak, A. Bartczak, M. Javadi, K. M. Wong, A. Maknoja, W. He, M. F. Liu, J. Diao, E. Winter, J. Manuel, D. McCarthy, M. Cattral, J. Gommerman, D. A. Clark, M. J. Phillips, R. R. Gorczynski, L. Zhang, G. Downey, D. Grant, M. I. Cybulsky, and G. Levy. 2008. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J. Immunol.* 180: 249–260.
18. Toromanoff, A., Y. Chérel, M. Guilbaud, M. Penaud-Budloo, R. O. Snyder, M. E. Haskins, J.-Y. Deschamps, L. Guigand, G. Podevin, V. R. Arruda, K. A. High, H. H. Stedman, F. Rolling, I. Anegón, P. Moullier, and C. Le Guiner. 2008. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.* 16: 1291–1299.
19. Le Guiner, C., K. Stieger, R. O. Snyder, F. Rolling, and P. Moullier. 2007. Immune responses to gene product of inducible promoters. *Curr Gene Ther* 7: 334–346.
20. Brüggemann, M., C. Teale, M. Clark, C. Bindon, and H. Waldmann. 1989. A matched set of rat/mouse chimeric antibodies. Identification and biological properties of rat H chain constant regions mu, gamma 1, gamma 2a, gamma 2b, gamma 2c, epsilon, and alpha. *J. Immunol.* 142: 3145–3150.

21. Schwartz, B. S., G. A. Levy, D. S. Fair, and T. S. Edgington. 1982. Murine lymphoid procoagulant activity induced by bacterial lipopolysaccharide and immune complexes is a monocyte prothrombinase. *J. Exp. Med.* 155: 1464–1479.
22. Chan, C. W. Y., M. W. C. Chan, M. Liu, L. Fung, E. H. Cole, J. L. Leibowitz, P. A. Marsden, D. A. Clark, and G. A. Levy. 2002. Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity. *J. Immunol.* 168: 5170–5177.
23. Mendicino, M., M. Liu, A. Ghanekar, W. He, C. Kosciak, I. Shalev, M. Javadi, J. Turnbull, W. Chen, L. Fung, S. Sakamoto, P. Marsden, T. K. Waddell, M. J. Phillips, R. Gorczynski, G. A. Levy, and D. Grant. 2005. Targeted deletion of Fgl-2/fibroleukin in the donor modulates immunologic response and acute vascular rejection in cardiac xenografts. *Circulation* 112: 248–256.
24. Marsden, P. A., Q. Ning, L. S. Fung, X. Luo, Y. Chen, M. Mendicino, A. Ghanekar, J. A. Scott, T. Miller, C. W. Y. Chan, M. W. C. Chan, W. He, R. M. Gorczynski, D. R. Grant, D. A. Clark, M. J. Phillips, and G. A. Levy. 2003. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *J. Clin. Invest.* 112: 58–66.
25. Melnyk, M. C., I. Shalev, J. Zhang, A. Bartczak, R. M. Gorczynski, N. Selzner, R. Inman, P. A. Marsden, M. J. Phillips, D. A. Clark, and G. A. Levy. 2011. The prothrombinase activity of FGL2 contributes to the pathogenesis of experimental arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 40: 269–278.
26. Chan, C. W. Y., L. S. Kay, R. G. Khadaroo, M. W. C. Chan, S. Lakatoo, K. J. Young, L. Zhang, R. M. Gorczynski, M. Cattral, O. Rotstein, and G. A. Levy. 2003. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 170: 4036–4044.
27. Xie, L., N. Ichimaru, M. Morita, J. Chen, P. Zhu, J. Wang, P. Urbanellis, I. Shalev, S. Nagao, A. Sugioka, L. Zhong, N. Nonomura, S. Takahara, G. A. Levy, and X.-K. Li. 2012. Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity for distinguishing between allograft rejection and tolerance. *Liver Transpl.* 18: 444–454.
28. Denning, T. L., S. W. Granger, S. Granger, D. Mucida, R. Graddy, G. Leclercq, W. Zhang, K. Honey, J. P. Rasmussen, H. Cheroutre, A. Y. Rudensky, and M. Kronenberg. 2007. Mouse TCR α beta+CD8 α alpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J. Immunol.* 178: 4230–4239.
29. Mauri, C., and A. Bosma. 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 221–241.

30. Deng, S., D. J. Moore, X. Huang, M.-M. Lian, M. Mohiuddin, E. Velededeoglu, M. K. Lee 4th, S. Sonawane, J. Kim, J. Wang, H. Chen, S. A. Corfe, C. Paige, M. Shlomchik, A. Caton, and J. F. Markmann. 2007. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J. Immunol.* 178: 6028–6032.
31. Lee, K. M., J. I. Kim, R. Stott, J. Soohoo, M. R. O'Connor, H. Yeh, G. Zhao, P. Eliades, C. Fox, N. Cheng, S. Deng, and J. F. Markmann. 2012. Anti-CD45RB/Anti-TIM-1-Induced Tolerance Requires Regulatory B Cells. *Am. J. Transplant.* 12: 2072–2078.
32. Le Texier, L., P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Merieau, T. Quillard, B. Charreau, J. P. Souillou, M. C. Cuturi, S. Brouard, and E. Chiffolleau. 2011. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am. J. Transplant.* 11: 429–438.
33. Newell, K. A., A. Asare, A. D. Kirk, T. D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W. J. Burlingham, W. H. Marks, I. Sanz, R. I. Lechler, M. P. Hernandez-Fuentes, L. A. Turka, and V. L. Seyfert-Margolis. 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120: 1836–1847.
34. Sagoo, P., E. Perucha, B. Sawitzki, S. Tomiuk, D. A. Stephens, P. Miqueu, S. Chapman, L. Craciun, R. Sergeant, S. Brouard, F. Rovis, E. Jimenez, A. Ballou, M. Giral, I. Rebollo-Mesa, A. Le Moine, C. Braudeau, R. Hilton, B. Gerstmayer, K. Bourcier, A. Sharif, M. Krajewska, G. M. Lord, I. Roberts, M. Goldman, K. J. Wood, K. Newell, V. Seyfert-Margolis, A. N. Warrens, U. Janssen, H.-D. Volk, J.-P. Souillou, M. P. Hernandez-Fuentes, and R. I. Lechler. 2010. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120: 1848–1861.
35. Kendal, A. R., and H. Waldmann. 2010. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 560–565.
36. Qin, S., S. P. Cobbold, H. Pope, J. Elliott, D. Kioussis, J. Davies, and H. Waldmann. 1993. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* 259: 974–977.
37. Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto, and T. F. Tedder. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28: 639–650.
38. Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A. A. Kühl, C. Loddenkemper, M. Haury, S. A. Nedospasov, S. H. E. Kaufmann, U. Steinhoff, D. P. Calado, and S. Fillatreau. 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 33: 777–790.
39. Pallier, A., S. Hillion, R. Danger, M. Giral, M. Racapé, N. Degauque, E. Dugast, J. Ashton-Chess, S. Pettré, J. J. Lozano, R. Bataille, A. Devys, A. Cesbron-Gautier, C. Braudeau, C. Larose, J.-P. Souillou, and S. Brouard. 2010. Patients with drug-free long-

term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int.* 78: 503–513.

40. Vermeer, L. A., N. K. de Boer, C. Bucci, N. A. Bos, F. G. Kroese, and S. Alberti. 1994. MRC OX19 recognizes the rat CD5 surface glycoprotein, but does not provide evidence for a population of CD5bright B cells. *Eur. J. Immunol.* 24: 585–592.

41. Wei, B., P. Velazquez, O. Turovskaya, K. Spricher, R. Aranda, M. Kronenberg, L. Birnbaumer, and J. Braun. 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 2010–2015.

42. Blair, P. A., K. A. Chavez-Rueda, J. G. Evans, M. J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol.* 182: 3492–3502.

43. Qian, L., C. Qian, Y. Chen, Y. Bai, Y. Bao, L. Lu, and X. Cao. 2012. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcyIIbhi regulatory B cells through IFN- β and CD40L. *Blood* 120: 581–591.

44. Mann, M. K., K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan, and B. N. Dittel. 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178: 3447–3456.

45. Carter, N. A., R. Vasconcellos, E. C. Rosser, C. Tulone, A. Muñoz-Suano, M. Kamanaka, M. R. Ehrenstein, R. A. Flavell, and C. Mauri. 2011. 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: 5569–5579.

46. Amu, S., S. P. Saunders, M. Kronenberg, N. E. Mangan, A. Atzberger, and P. G. Fallon. 2010. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 1114–1124.e8.

47. Matsumoto, M., Y. Fujii, A. Baba, M. Hikida, T. Kurosaki, and Y. Baba. 2011. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity* 34: 703–714.

FIGURE LEGENDS**Figure 1. Increased FGL2 expression in grafts of AdCD40Ig-treated recipients.**

Grafts from AdCD40Ig-treated recipients were collected at day 5 (*AdCD40Ig-D5* $n=3$) and day 120 (*AdCD40Ig-D120* $n=20$) after transplantation and analyzed by quantitative RT-PCR, compared with grafts from non-treated-recipients 5-days after transplantation ($n=8$), syngeneic grafts ($n=3$), and hearts from naïve non grafted animals ($n=8$) (One-Way ANOVA, Kruskal Wallis test: ** p value=0.0036, Dunn's post test). Housekeeping gene: HPRT and reference: pool of 24 animals.

Figure 2. FGL2 is immunosuppressive *in vitro*.

The expression of FGL2 by CD8⁺ Tregs and its effects on CD4⁺ cells were analyzed *in vitro*. **A)** FGL2 expression was analyzed by cytofluorimetry in CD8⁺ Tregs co-cultured with CD4⁺CD25⁻ T cells (50,000 cells/well) and allogeneic pDCs (12,500 cells/well) with or without a neutralizing anti-IFN γ mAb (DB1) or isotype control (50 μ g/ml, $n=7$) Wilcoxon test $p=0.015$. **B)** Representative histogram of FGL2 expression by CD8⁺ Tregs in the presence or absence of anti-IFN γ mAb (DB1, black line) or isotype control (filled gray). **C)** anti-rat FGL2 Ab (100 μ g/ml) abrogates CD8⁺ Treg-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs (same culture conditions as above). Data are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. **D)** Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of different concentrations of recombinant FGL2-GST was evaluated by CFSE dilution by gating first on DAPI live cells and then on TCR⁺CD4⁺ cells (**supplemental data 1**). CD8⁺ Tregs from AdCD40Ig-treated rats (Tregs) were used as a positive control for suppression. ($n=4$, * $p=0.01$ and *** $p=0.0002$). **E)** A representative histogram of one experiment out of 4 of CD4⁺CD25⁻

T cells co-cultured with pDCs in the absence (filled grey) or presence of 10 µg/ml of recombinant FGL2-GST (black line) (analyzed in duplicates).

Figure 3. The FGL2-receptor FcγRIIB is expressed by rat pDCs

A) FcγRIIB was detected on splenic pDCs by FACS (left: grey histogram isotype control and white histogram with anti-FcγRIIB MAb) and by confocal microscopy (right). **B)** pDC or CD4⁺T cells were incubated with FGL2-GST protein for 2 hours before being added to fresh CD4⁺T cells or pDC respectively. Proliferation was compared with that of CD4⁺T cells responding to pDC in the presence of FGL2 protein. (n=6, Two-Way ANOVA, Bonferroni post test **p<0.01)

Figure 4. Over-expression of FGL2 *in vivo* prolongs graft survival

Graft recipients received intravenously 7.7×10^7 pi/rat of AAV-FGL2 (▼n=8) or AAV-GFP (●n=5) and received a transplant 30 days later. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Log-rank (Mantel-Cox) test *p=< 0.02 for AAV-FGL2 vs. no treatment and AAV-GFP.

Figure 5. Adoptive transfer of splenocytes from AAVFGL2-treated rats with long-term surviving grafts transfer donor alloantigen-specific long-term graft survival in an iterative way.

Splenocytes from tolerant AAVFGL2-treated recipients were intravenously injected into minimally irradiated recipients (LEW.1A) the day before heart allotransplantation (LEW.1W). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall.

Adoptive transfer of total splenocytes (10^8 cells) from rats with long-term surviving grafts (≥ 120 days) from AAV-FGL2-treated rats were adoptively transferred (1st-transferred, n=6), and then total splenocytes (10^8 cells) were iteratively transferred to 2nd- (n=7), 3rd (n=3) and 4th (n=3) LEW.1A recipients receiving LEW.1W hearts. Third-party grafts were from Brown-Norway origin (n=3). Splenocytes from naïve non-transplanted rats did not inhibit acute rejection (n=5) and non-transferred recipients also showed acute rejection (n=6). (Log-rank (Mantel-Cox) Test *p value* ***<0.0001).

Figure 6. AAV-FGL2 and adoptive transfer of splenocytes suppressed alloantibody production.

Sera were collected >100 days after transplantation from rats treated with AAV-FGL2 or receiving adoptive transfers. Levels of donor-specific IgG1, IgG2a, and IgG2b antibodies were evaluated by cytofluorimetry and normalized to serum from naïve rats (MFI / MFI syngeneic)-(MFI syngeneic). Two way Anova, Bonferroni post test *p value* * <0.5 ; ** <0.01 ; ***<0.001.

Figure 7. Adoptive transfer of B cells transfers tolerance.

A) Graft recipients received different spleen cell populations as explained in legend of figure 5. B cells ($CD45RA^+$, n=3), T cells (TCR^+ , n=4), $CD8^+$ Tregs ($CD8^+CD45RC^{low}$, n=2), pDCs (mAb 85C7⁺ n=3) from splenocyte-transferred tolerant rats were sorted by FACS Aria (sorting strategy displayed in supplemental data 3) and adoptively transferred to minimally irradiated recipients the day before the transplant. Log-rank (Mantel-Cox) Test *p* <0.05* $CD45RA^+$ from tolerant animals vs. $CD45RA^+$ cells from naïve rats and all other groups. B) Part of the transferred tolerogenic $CD45RA^+$ cells were

tested for inhibition of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic LEW.1W cDCs, or pDCs (stimulator/effector ratio of 1:4) or anti-CD3. Naïve B cells n=3, tolerogenic B cells n=4. **C**) Representative histogram of one proliferation assay of CD4⁺CD25⁻ T cells with allogeneic pDCs and CD45RA⁺ cells from naïve (filled gray) or splenocyte-transferred tolerant rats (black line). **D**) CD45RA⁺ cells from the spleen of 4th-splenocyte-transferred recipients were analyzed for maturation (IgD, IgM labeling) by FACS, compared with control rats (n=3) (follicular transferred vs. control, $p < 0.05$) **E**) and for the FcγRIIB expression marker (t test, $p = 0.047$) with one representative histogram out four (left) and mean percentage of FcγRIIB⁺ cells among b cells (right, n=4). **F**) Grafts from tolerogenic B cell-transferred recipients (n=3) were analyzed for CD45RA⁺ cells presence as compared with syngeneic grafts. **G**) Graft-infiltrating and splenic CD45RA⁺ cells from CD45RA⁺ cell-transferred recipients were characterized for maturation (IgD, IgM labeling) (isotype switched transferred vs. controls $p < 0.001$ and follicular transferred vs. controls $p < 0.01$) and **H**) for CD5, CD24 and CD27 expression markers by FACS and comparing splenocytes and grafts from adoptively transferred long-term recipients (> 100 d) and naïve control splenocytes. Two-Way ANOVA with Bonferroni post-tests $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$.

Figure 1. S. Bézie et al.

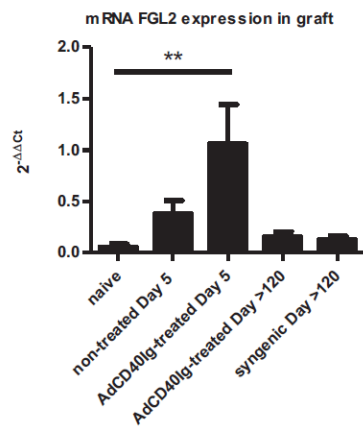


Figure 2. S. Bézie et al.

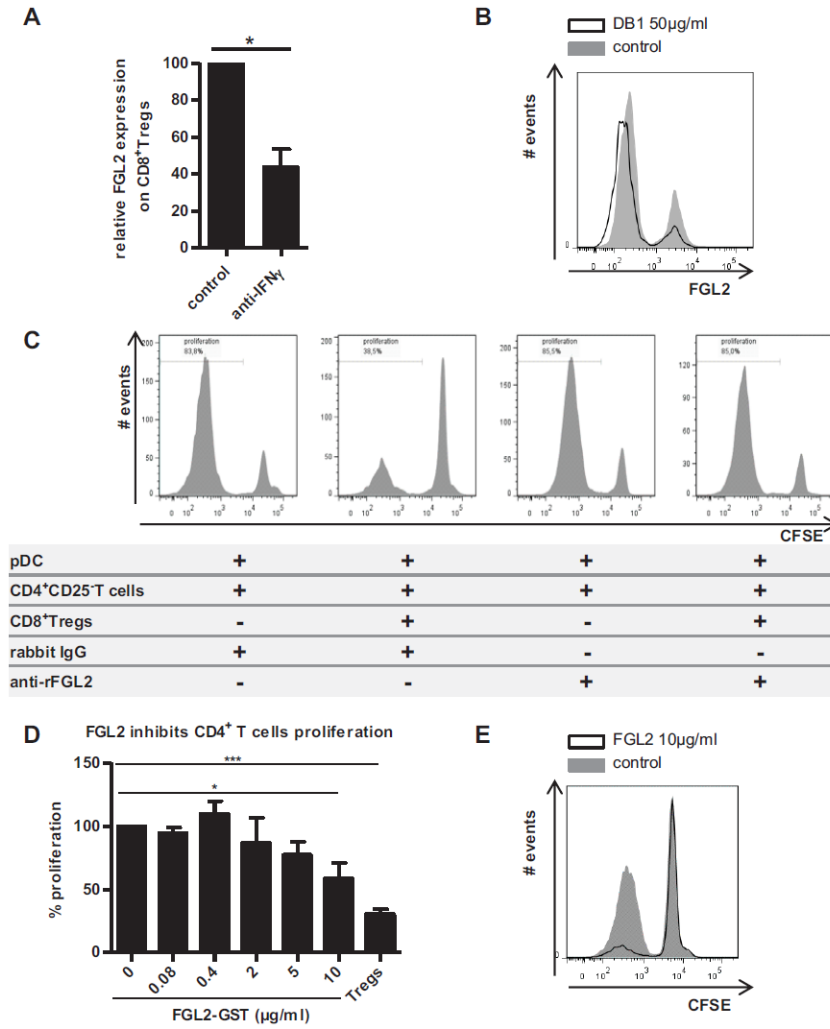


Figure 3. S. Bézie et al.

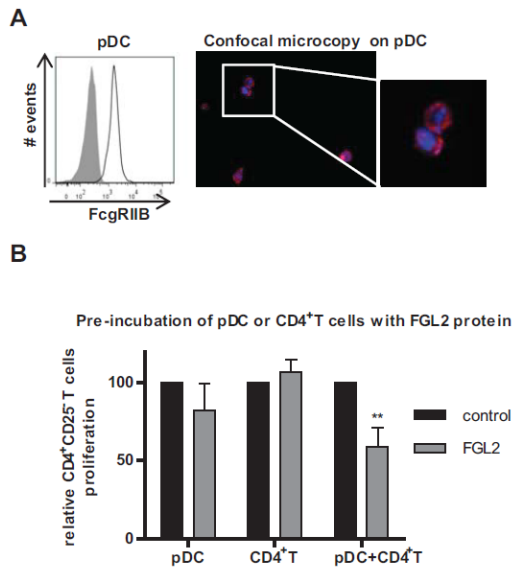


Figure 4. S. Bézie et al.

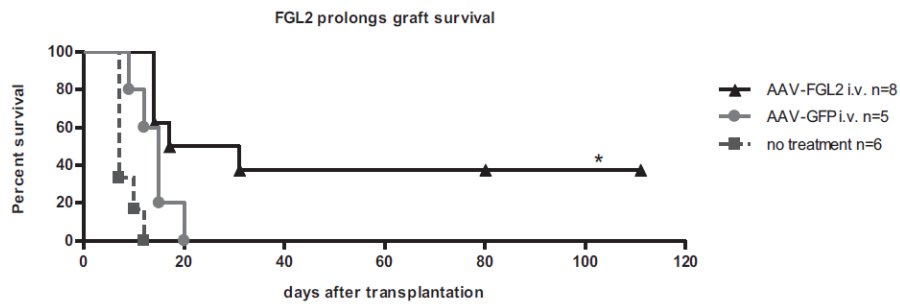


Figure 5. S. Bézie et al.

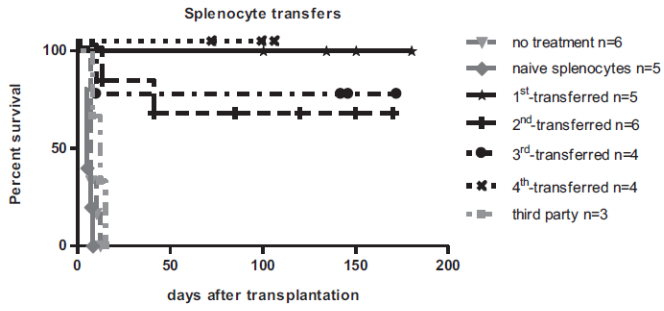


Figure 6. S. Bézie et al.

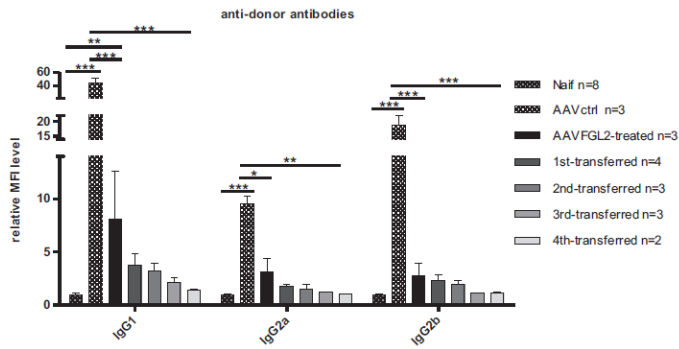
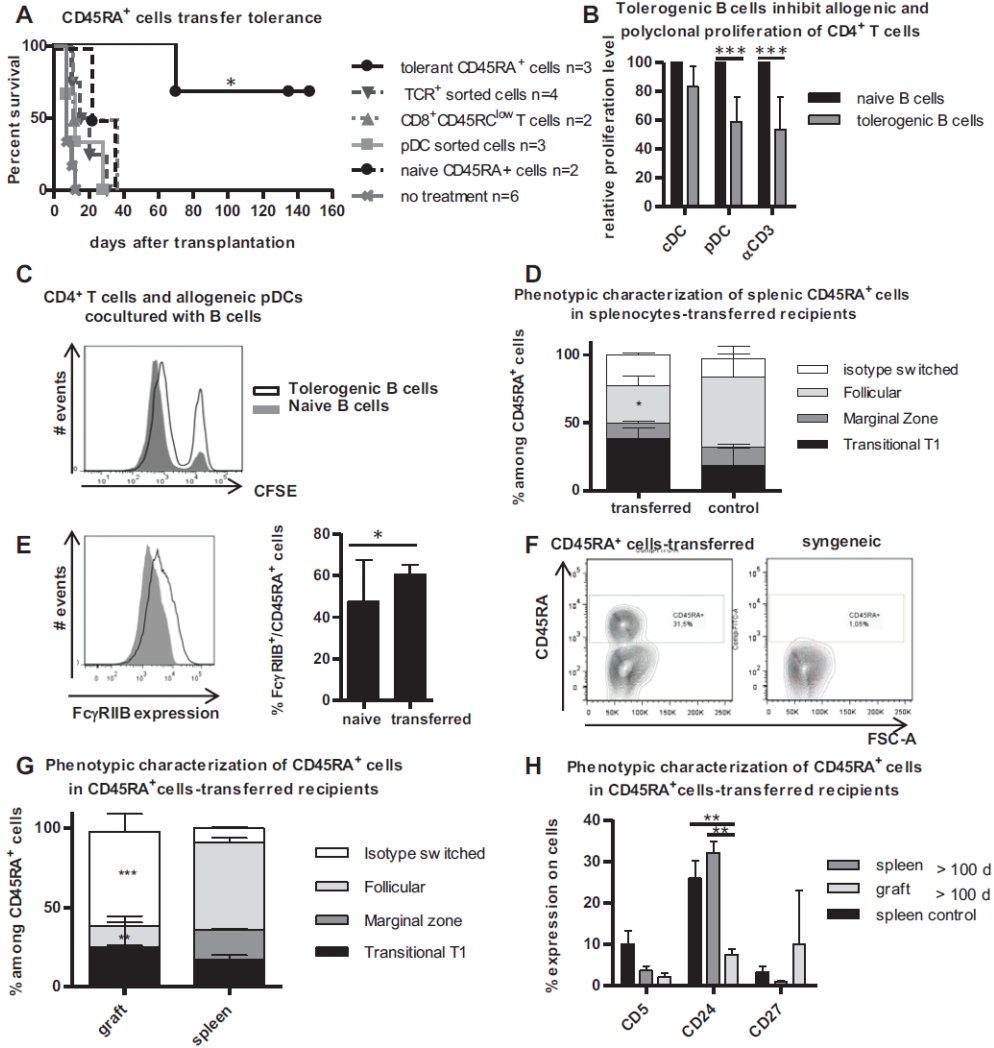
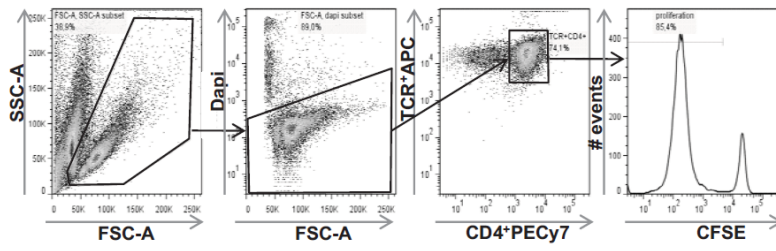


Figure 7. S. Bézie et al.

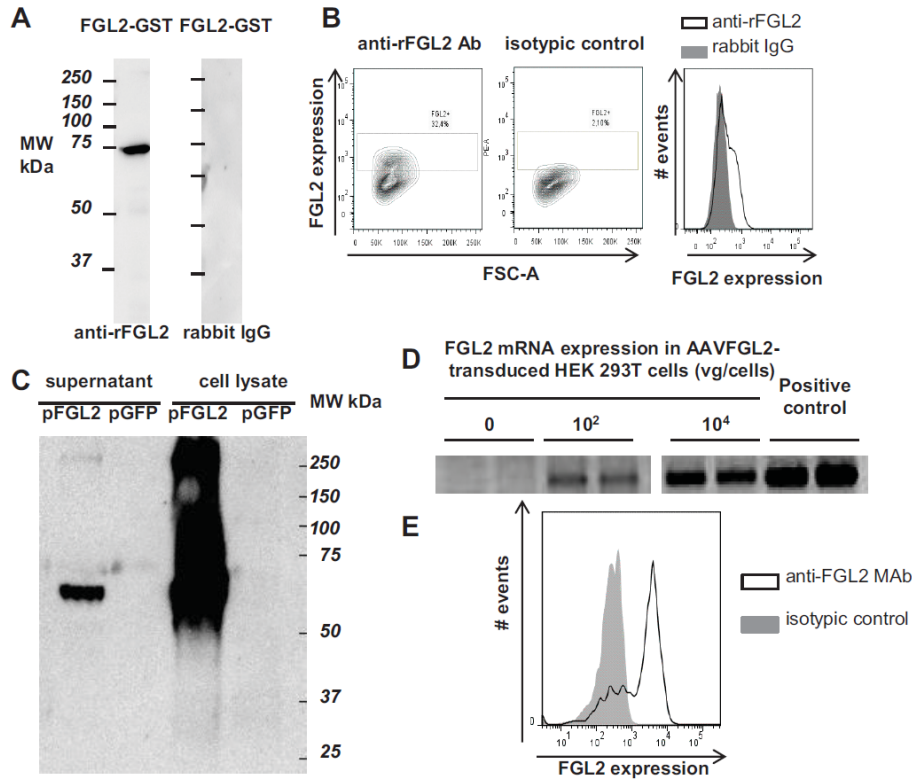


Supplemental Data 1. S. Bézie et al.



Supplemental Data 1: Gating strategy to evaluate CSFE-based CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation in an MLR in the presence of allogeneic pDCs and CD8⁺ Tregs based first on morphology (SSC-FSC), exclusion of DAPI by live cells, identification of TCR⁺ CD4⁺ T cells and analysis of CFSE.

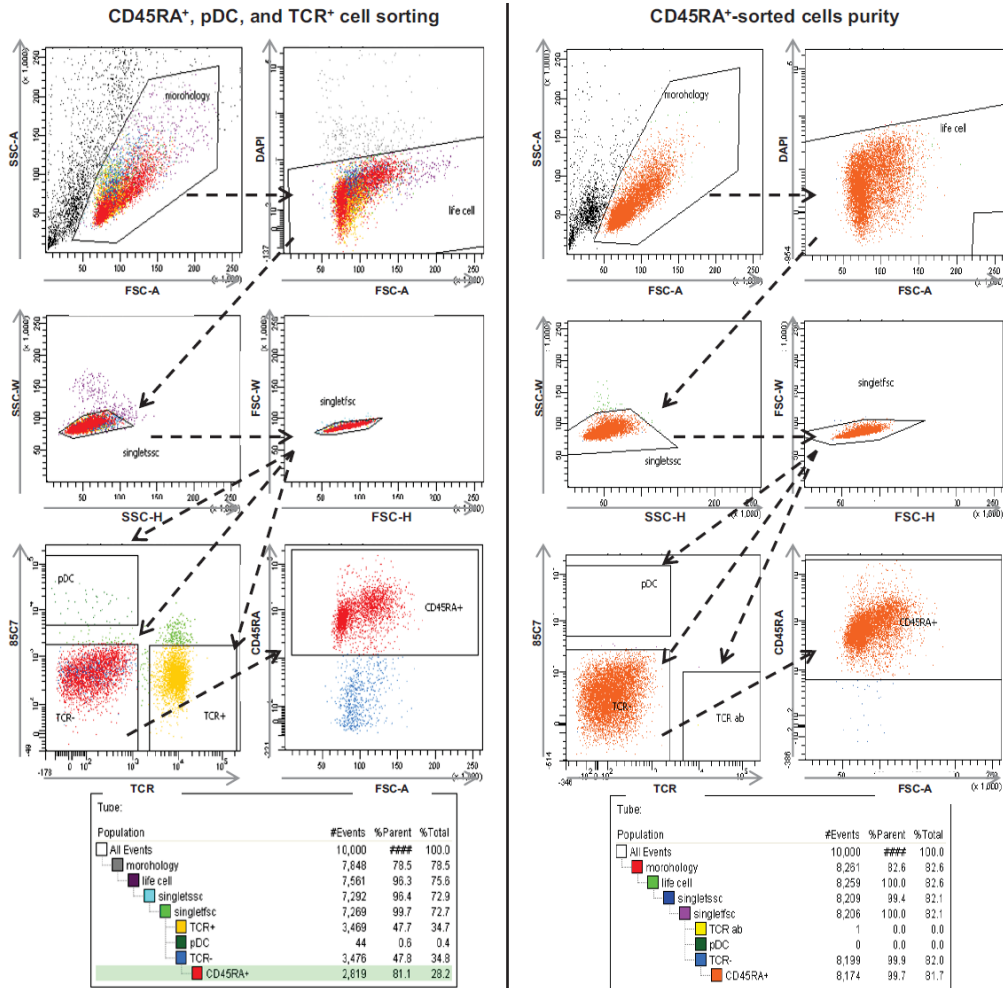
Supplemental Data 2. S. Bézie et al.



Supplemental Data 2: Development of a blocking anti-rat FGL2 antibody in suppression tests and validation of FGL2-recombinant plasmid and AAV vector.

A) Two rat FGL2 (rFGL2) peptide sequences were used to immunize rabbits and to affinity purify anti-rFGL2 antibodies from rabbit serum. Western blot analysis using denatured human recombinant FGL2-GST protein using anti-rFGL2 and as a control rabbit IgG from a non-immunized animal. **B)** HEK293T cells were transfected with FGL2-recombinant or with GFP-recombinant plasmid. Cytofluorimetry analysis of rat FGL2 protein expressed in HEK293 cells. The left contour plot and black line on histogram show FGL2⁺ cells using the novel anti-rFGL2 antibody. The right contour plot and filled grey on histogram show signals obtained with control non-immunized rabbit IgG. Data are representative of 3 independent experiments. **C)** FGL2 protein was detected by western blot in the cell lysate and supernatant of transfected cells (n=3). **D)** HEK293T cells were infected or not with FGL2-recombinant AAV at MOI 100 and 10000, and analyzed for *fgl2* mRNA expression by quantitative RT-PCR; the spleen was used as a positive control (duplicates, n=2), and **E)** FGL2 protein expression by FACS (black line : anti FGL2 MAb M02; filled grey: isotype control; n=2).

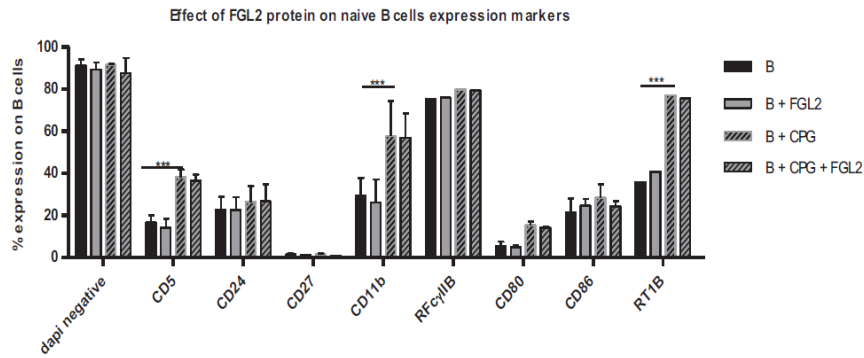
Supplemental Data 3. S. Bézie et al.



Supplemental Data 3: CD45RA⁺, TCR⁺, pDC cells sorting by FACS Aria

A) T cells and pDC were sorted by FACS Aria according to TCR expression and 85C7 Ab-binding respectively, and B cells were sorted by gating on TCR negative and CD45RA positive expression markers, among DAPI negative live cells. B) Purity was greater than 99%.

Supplemental Data 4. S. Bézie et al.



Supplemental Data 4 : phenotypic characterization of naïve B cells incubated with FGL2, with or without CPG

B CD45RA⁺ sorted cells from naïve non-treated rats were incubated for 24h with or without 1µg/ml CpG to induce a suboptimal maturation and with or without 10µg/ml FGL2, and analyzed for expression of CD5, CD24, CD27, CD11b, FcγIIb, CD80, CD86 and RT1B by FACS, (n=3), Two-Way ANOVA ****p* value <0.001, Bonferroni post-tests.

Résumé de l'article I

La production de FGL2 par les lymphocytes Tregs CD4⁺ a déjà été montrée. Nous avons récemment décrit la surexpression de FGL2 par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} permettant la tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le rat. Dans cet article, nous montrons que la surexpression de FGL2 *in vivo* par transfert de gène, sans traitement annexe, prévient du rejet d'allogreffe. Le transfert adoptif des splénocytes des rats traités par FGL2 présentant une survie du greffon supérieure à 120 jours, inhibe les rejets aigu et chronique, et induit une tolérance infectieuse spécifique du donneur sur plus de 4 transferts itératifs. La production d'anticorps dirigés contre le donneur est aussi inhibée. L'analyse des populations cellulaires spléniques montre que les lymphocytes B sont suffisants pour transférer adoptivement la tolérance. Ces lymphocytes B sont aussi capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ stimulés allogéniquement. La génération des cellules B régulatrices par FGL2 et leur capacité à induire la tolérance infectieuse sont ici décrites pour la première fois.

Résultats complémentaires

1. Le traitement des receveurs par un AAVFGL2 administré par voie intra-veineuse prolonge la survie de l'allogreffe, de façon plus efficace que par voie intra-musculaire.

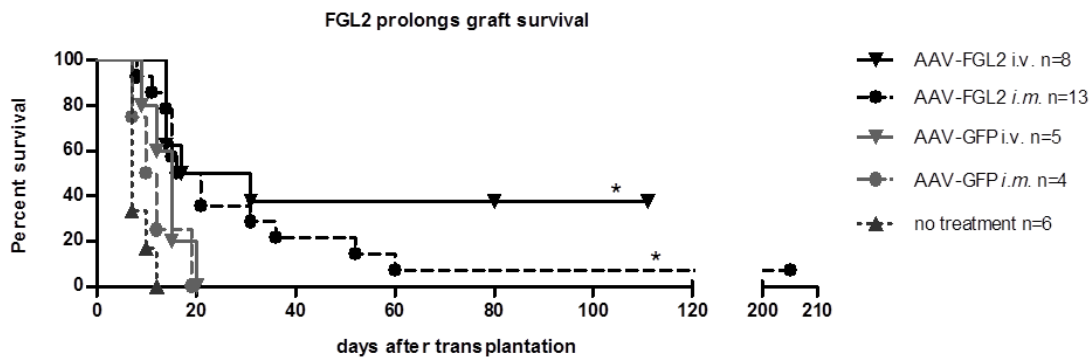


Figure 25. La surexpression de FGL2 in vivo prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat.

Les receveurs ont été infectés en i.m. ou en i.v. par 7.7×10^7 pi/rat d'AAV-FGL2 (● pointillés n=13 et ▼ ligne pleine n=8, respectivement) ou d'AAV-GFP (● pointillés n=4 and ▼ ligne pleine n=5 respectivement) et greffés 30 jours plus tard. La survie des greffon a été évaluée par palpation à travers la paroi abdominale. Log-rank (Mantel-Cox) Test p value: pour i.m vs AAV-GFP *p value =0.018 pour i.v.vs AAV-GFP * p value = 0.046).

L'injection i.m. de l'AAVFGL2 induit une prolongation significative de la survie d'allogreffe, avec une médiane de 18.5 jours vs 11 jours pour les rats traités par l'AAVGFP, et 1/13 des animaux présentant une survie à long terme (>120 jours). Nous avons aussi injecté l'AAVFGL2 par voie i.v. et avons observé une amélioration de la survie des greffons, avec une médiane de 24 jours vs 15 jours pour les rats contrôles, et 3/8 des receveurs présentant une survie à long terme du greffon. La différence i.m. vs i.v. n'est cependant pas statistiquement significative.

2. Le serum des rats traités par AAVFGL2 inhibe la réponse T allogénique in vitro.

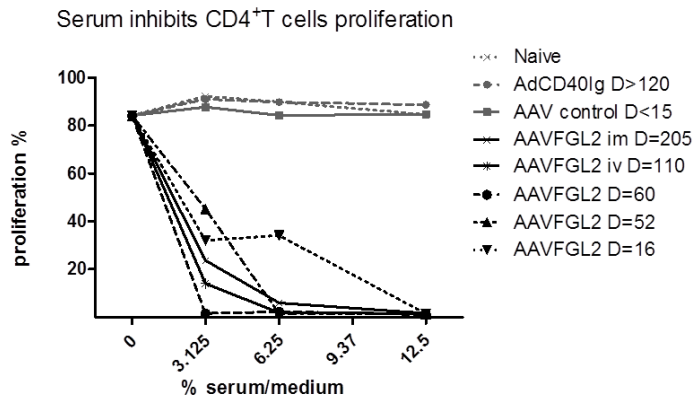


Figure 26. Le serum des rats traités par AAVFGL2 inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ en réponse aux pDC allogéniques vs le serum de rats naïfs, de rats traités par AdCD40Ig, ou par un AAV controle.

Cette inhibition est dose dépendante et suggère l'expression de la molécule suppressive FGL2 à partir de l'AAV, sa sécrétion par les cellules et sa circulation via le serum. De plus, l'efficacité de suppression de la prolifération par le serum tend à corrélérer avec la prolongation de survie du greffon.

3. La quantification anapathologique du degré de rejet chronique montre une amélioration de l'état du greffon chez les rats long-surviveurs par transfert de splénocytes ou de lymphocytes B vs traités par AAVFGL2.

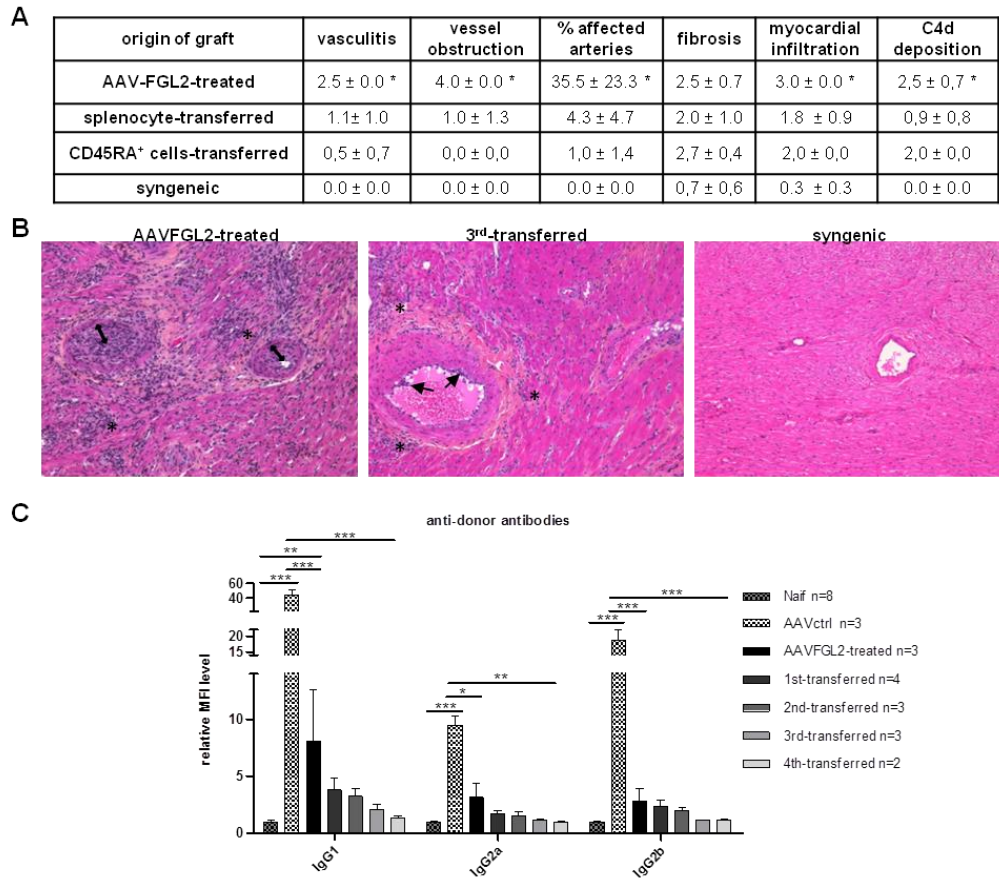


Figure 27. Quantification du degré de rejet chronique dans les greffons des rats traités par AAVFGL2 et transférés par des splénocytes.

A) Les greffons ont été prélevés plus de 100 jours après la transplantation et le traitement par AAVFGL2 ou par transfert adoptif. Les sections de tissus inclus en paraffine ont été colorées par hematoxilin-eosin-safran (HES) et la sévérité de chaque critère a été notée selon un système de score par l'anapathologiste Karine Renaudin. AAV-FGL2, n=2; transfert adoptif de splénocytes, n=8 (1^{er} transfert consécutif n=4, 2^{ème} n=5, 3^{ème} n=3, et 4^{ème} n=2); et syngénique, n= 3. Les dépôts de C4d ont été évalués à l'aide d'un anticorps anti-C4d. p value = 0.01 vs. greffons syngéniques, Kruskal Wallis + Dunn's post-test. B) Photos représentatives d'un greffon de rat traité par l'AAVFGL2, de rat transféré par des splénocytes de troisième génération, et de rat greffé syngéniquement. C) Le serum des rats traités par l'AAVFGL2 ou transférés par les splénocytes ont été prélevés plus de 100 jours après la transplantation. Le taux d'anticorps spécifiques du donneur de type IgG1, IgG2a, et IgG2b a été évalué par cytofluorométrie et normalisé au serum de rats naïfs (MFI / MFI naïf)-(MFI naïf). Two way anova, Bonferroni post test p value * <0.5 ; ** <0.01 ; ***<0.001.

4. La caractérisation phénotypique des splénocytes des rats traités par l'AAVFG2 ou transférés par des splénocytes ne montre pas d'augmentation de la population lymphocytaire B capable de tolérance infectieuse vs les rats non traités naïfs.

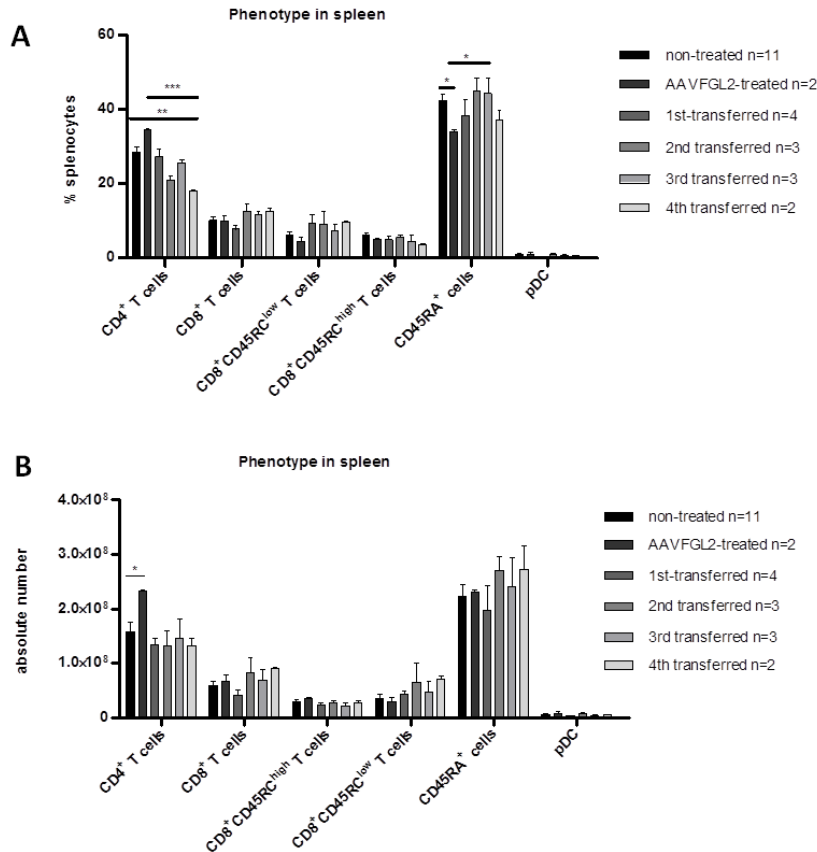


Figure 28. Caractérisation phénotypique des splénocytes des rats traités par l'AAVFG2 et transférés par les splénocytes tolérogènes.

Les splénocytes ont été prélevés des rats traités par AAVFG2 présentant une survie long-terme du greffon (≥ 120 jours) et transférés une première fois à des receveurs (1st-transferred), et itérativement à une 2nd (2nd-transferred rats), une 3^{ème}, et une 4^{ème} génération de receveurs. Les splénocytes de chaque génération ont été analysés selon les marqueurs indiqués. **A)** La proportion et **B)** le nombre absolu de lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, CD8⁺CD45RC^{low}, CD8⁺CD45RC^{high}, de lymphocytes B CD45RA⁺ et de pDCs dans la rate des rats traités par AAVFG2 (AAVFG2-treated rats, n=2) et après un 1^{er} (n=4), 2nd (n=3), 3^{ème} (n=3) et 4^{ème} (n=2) transfert de splénocytes vs. non-traités naïfs (n=11). Two-way ANOVA, Bonferroni p value <0.05, ** p value <0.01, *** p value < 0.0001

5. Des preuves indirectes montrent l'implication des lymphocytes B dans la tolérance infectieuse

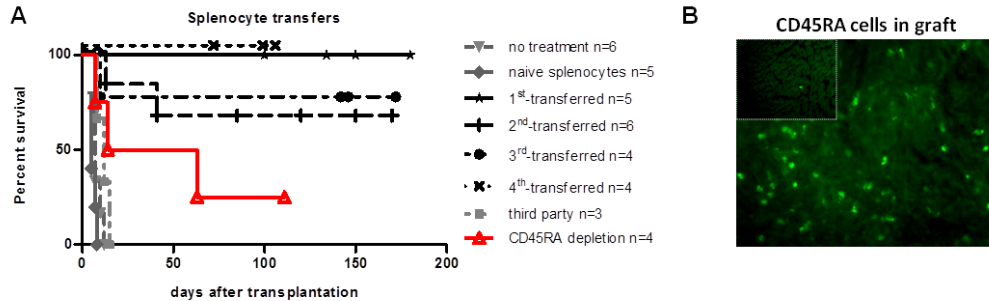


Figure 29. Les lymphocytes B sont impliqués dans la tolérance infectieuse et infiltrent le greffon chez les rats long-surviveurs.

A) Les splénocytes des rats traités par l'AAVFG2 sont capables de tolérance infectieuse (cf article 1). La déplétion des cellules CD45RA⁺ affecte la capacité des splénocytes à transmettre la survie long terme du greffon (courbe en rouge, n=4) vs non déplétés (en noir). B) Des cellules CD45RA⁺ ont été observées par immunohistochimie dans le greffon des rats transférés par des splénocytes tolérogènes, vs greffon syngénique (en haut, à gauche).

Discussion**1. FGL2 est impliquée dans la survie à long terme du greffon induite par le traitement par AdCD40Ig.**

- L'expression de FGL2 est augmentée dans les Tregs induits par CD40Ig

Plusieurs études associent l'expression de FGL2 au rejet d'allogreffe. Une augmentation de l'expression des transcrits FGL2 a notamment été observée dans les cellules mononucléées et les cellules endothéliales des microvaisseaux de l'allogreffe cardiaque chez la souris, la première semaine suivant la greffe, et corrélée au rejet (Qin Ning et al. 2005). Cependant, d'autres études ont associé l'expression de FGL2 à des mécanismes de tolérance. Une étude récente a mis en évidence la surexpression de FGL2 dans l'allogreffe cardiaque tolérée chez la souris traitée par la rapamycine, et dans l'allogreffe de foie tolérée spontanément (L. Xie et al. 2012). **Dans notre modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat, FGL2 est surexprimée par les lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low} induits par AdCD40Ig.** L'analyse du transcriptome par puces pangénomiques révèle une surexpression de FGL2, confirmée au niveau transcriptionnel par PCR quantitative, et protéique par cytométrie en flux. De plus, **la cinétique d'expression de FGL2 corrèle avec l'accumulation des Tregs dans le greffon la première semaine suivant la greffe.** En effet, l'expression de FGL2 est significativement augmentée dans le greffon les premiers jours suivant la greffe, vs non traités et non greffés. Cette expression retombe à l'état basal les mois suivants, alors que les lymphocytes Tregs migrent vers la rate. Cependant, alors qu'une augmentation de l'expression de FGL2 par les lymphocytes Tregs spléniques est constatée au niveau transcriptionnel et protéique 120 jours après la greffe chez les rats traités par AdCD40Ig vs. non traités naïfs, aucune variation n'est détectée dans la rate. A moins que la faible proportion de lymphocytes Tregs dans la rate et l'expression constitutive de FGL2 ne masquent une différence d'expression, ces résultats suggèrent **un rôle de FGL2 dans la prévention du rejet aigu** (mais pas chronique) par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Schéma bilan).

- FGL2 est impliquée dans la fonction des Tregs

Le blocage de FGL2 *in vivo* par l'injection d'anticorps, telles les stratégies utilisées par l'équipe pour l'IFN γ et IDO (Guillonau, Marcelo Hill, et al. 2007), permettraient d'étudier l'implication de FGL2 dans la prévention du rejet par les lymphocytes Tregs. Nous avons généré un anticorps polyclonal, par immunisation de lapins contre deux séquences situées de part et d'autre de la protéine FGL2 de rat. L'administration du serum de lapin immunisé chez

les rats traités par AdCD40Ig n'a pas abrogé la survie de l'allogreffe. Cependant, il est possible que la dose réelle d'anticorps administrée ait été limitante. De plus, le blocage de FGL2 peut être insuffisant pour anihiler tous les effets annexes du blocage de l'interaction CD40-CD40L par AdCD40Ig. Il serait donc plus judicieux de bloquer la protéine FGL2 chez les receveurs long-surviveurs par transfert adoptif de Tregs CD8⁺CD45RC^{low}. L'abrogation de la survie du greffon 120 jours après la greffe montrerait l'implication de FGL2 dans la prévention du rejet chronique par les Tregs, alors que le blocage de FGL2 dès le jour de la greffe préciserait l'importance de FGL2 quant à la prévention du rejet aigu par les Tregs. La persistance d'une tolérance reste cependant possible étant donnée la subsistance d'autres molécules impliquées dans la fonction des lymphocytes Tregs (IFN γ et IDO, ou IL-34). Nous pourrions par ailleurs affiner cette étude en bloquant uniquement la partie identifiée comme immunorégulatrice de la protéine (partie C Terminale). Enfin, le blocage de FGL2 ne devrait pas affecter la capacité des lymphocytes Tregs à transmettre la survie à long-terme du greffon lors d'un transfert à de nouveaux receveurs excepté si un rétro-contrôle positif par FGL2 est nécessaire au maintien de la fonction suppressive des lymphocytes Tregs.

- Rôle de l'IFN γ dans l'expression de FGL2

L'expression de FGL2 peut être induite par stimulation des macrophages et cellules endothéliales par l'IFN γ (Mingfeng Liu et al. 2006; Wayne W Hancock et al. 2004). Dans notre modèle, l'IFN γ est impliquée dans les fonctions suppressives des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} *in vivo* (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007) et *in vitro* (X. L. Li et al. 2010). En parallèle, le blocage de FGL2 abroge la suppression induite par les Tregs dans les expériences de coculture. L'ensemble de ces résultats suggère **une régulation de FGL2 par l'IFN γ** (Figure 30 : schéma bilan). En effet, l'expression de FGL2 par les lymphocytes Tregs est réduite lors du blocage de l'IFN γ . Ainsi, dans les tests *in vitro*, **l'IFN γ serait un régulateur des lymphocytes Tregs plutôt qu'un médiateur de leur fonction suppressive.**

Une étude montre que le contact des lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺ avec les T conventionnel CD4⁺ augmente la suppression par les lymphocytes Tregs et altère les mécanismes de suppression (Collison et al. 2009). En effet, en système de transwell, la suppression par les lymphocytes Tregs est indépendante de l'IFN γ et de FGL2 mais dépendante de IDO. Néanmoins, un lien entre IDO et FGL2 n'est pas exclu car l'expression de FGL2 par les Tregs a tendance à augmenter lors de l'inhibition de IDO en système de transwell (Figure 30, différence non significative). Elle reste cependant insuffisante pour

maintenir la suppression induite par les Tregs. De même *in vivo*, l'inhibition deIDO abroge la tolérance infectieuse par les lymphocytes Tregs, malgré l'expression de FGL2 et d'IFN γ , suggérant **la synergie et la nécessité de chacune des molécules impliquées.**

2. FGL2 est capable d'immunosuppression *in vitro*

Il a été montré que la protéine FGL2 est capable d'inhiber les réponses allogéniques T via l'inhibition de la maturation des DC, ainsi que les réponses T polyclonales par action directe via le Fc γ RIIB chez la souris. Par ailleurs, les souris FGL2^{-/-} présentent des lymphocytes T plus réactifs à la stimulation polyclonale et allogénique, polarisés vers un profil Th1, ainsi qu'une augmentation du nombre de pDC et de cDC (C. W. Y. Chan et al. 2003; Hao Liu et al. 2008; Itay Shalev et al. 2008). Nous avons montré que **la protéine FGL2 est suffisante pour inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ en réponse aux pDC allogéniques** dans les expériences de coculture (Figure 30). Toutefois, ses mécanismes de suppression diffèrent de ceux décrits chez la souris. **Nous avons confirmé l'expression du Fc γ RIIB par les pDC et les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ chez le rat.** Cependant, FGL2 ne peut agir sur l'état de maturation des cellules stimulatrices de la coculture, car les pDC ne mûrissent pas pendant la coculture avec les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques. La prolifération de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ observée pourrait résulter de la réaction croisée de la population T mémoire avec les antigènes allogéniques des pDC. De plus, le traitement des pDC par la protéine FGL2 ne permet pas d'inhiber leur maturation induite par une dose modérée de CpG (Bézie, en révision). Enfin, l'effet suppresseur de FGL2 nécessite la présence des pDC pendant toute la durée de la coculture, FGL2 **agirait simultanément sur les deux populations cellulaires**, car la préincubation des lymphocytes T CD4⁺ ou des pDC avec la protéine FGL2 est insuffisante pour empêcher la prolifération (Bézie, en révision).

3. FGL2 peut prolonger la survie d'allogreffe cardiaque chez le rat

De façon intéressante, l'expression d'un antigène au moyen d'un transgène n'induit pas de réponse immune (Walker et al. 2002). Les vecteurs AAV sont modifiés pour ne pas s'intégrer dans le génome de l'hôte, infecter les cellules quiescentes de façon stable, persister en épisode pendant plus d'un an (S. Song et al. 2001) (X Xiao et al. 1996), et induire une réponse minimale contre le virus et le produit du transgène (X Xiao et al. 1996). Nous avons validé l'expression de la protéine dans le surnageant et les cellules transfectées par le plasmide recombinant pour FGL2 utilisé pour la génération de l'AAV recombinant pour FGL2, par lequel les cellules transduites expriment la protéine. L'injection du vecteur a été

réalisée 30 jours avant la greffe, pour permettre l'expression maximale de FGL2 (Toromanoff et al. 2008; Le Guiner et al. 2007). **Le traitement des receveurs par AAVFGL2 par voie *im* prolonge la survie de l'allogreffe cardiaque plus de 120 jours avec une médiane de survie de 18.5 jours**, vs 11 jours chez les rats traités par AAVGFP, alors que les expériences réalisées par Liu ne montrent qu'une prolongation modérée (jusqu'à 15 vs 9 jours) de l'allogreffe de peau chez la souris (Hao Liu et al. 2008). Le choix de la voie d'administration d'un antigène influe sur la réponse immune. Il est montré par exemple que l'injection intra-veineuse d'un antigène induit l'anergie des lymphocytes T alors que par voie sous cutanée, les lymphocytes T deviennent hypersensibles à la stimulation antigénique *in vitro* (Kearney et al. 1994). **L'administration du vecteur par voie *iv* améliore la survie d'allogreffe avec une médiane de survie de 24 jours vs 15 jours chez les rats traités par AAVGFP**. En effet, l'infection systémique est plus efficace pour l'expression du gène. Des échantillons de foie, de rate et de greffon ont été prélevés afin d'analyser l'expression de FGL2 à partir du vecteur viral par PCR quantitative.

FGL2 permet d'empêcher le rejet aigu, cependant des lésions de rejet chronique (fibrose, nécrose, obstruction vasculaire) subsistent (Figure 27). Des marques de réponse immune cellulaire (infiltrat myocardique) et humorale (C4d, anticorps anti-donneur) sont observées. En effet, malgré la réduction significative du taux d'anticorps anti-donneur dans la circulation chez les rats traités par AAVFGL2 vs AAVcontrol, le marquage du C4d dans le greffon témoigne indirectement d'une réponse immune humorale. L'atténuation globale (indépendante des isotypes) des anticorps présents dans la circulation ne suggère pas de déviation immune vers un profil Th1 ou Th2 (Figure 30). Le profil IgG2 et IgG4 des anticorps infiltrant le greffon est associé à une meilleure survie (Heinemann et al. 2007). La caractérisation des immunoglobulines dans le greffon pourrait apporter des précisions quant au type de réponse immune subsistante, et pourrait renforcer notre compréhension des mécanismes d'action de FGL2 et orienter notre choix quant au type de suppression à associer au traitement. La génération d'un AAV recombinant pour la partie immunorégulatrice de la protéine pourrait aussi permettre une meilleure survie de l'allogreffe.

4. FGL2 induit des lymphocytes B tolérogènes capables de tolérance infectieuse.

Le transfert itératif de splénocytes permet de transférer la survie de l'allogreffe à des receveurs irradiés non traités (>120 jours vs le transfert de splénocytes de rats naïfs <9 jours).

Les lésions de rejet chronique sont fortement diminuées chez les rats transférés par les splénocytes tolérogènes. Le taux d'anticorps anti-donneur est réduit avec les transferts de splénocytes comparés aux rats traités par l'AAVFGL2. Ce phénomène d'amélioration a déjà été remarqué. Notamment, l'injection d'allopeptides de classe I du donneur dans le thymus génère des cellules régulatrices qui ne préviennent pas du rejet chronique les animaux traités, mais qui réduisent significativement les signes de rejet chronique lors d'un premier transfert adoptif, et préviennent totalement des rejets aigu et chronique les animaux transférés de troisième génération (Shirwan et al. 2003). Ce n'est cependant pas le cas du modèle AdCD40Ig dans lequel un rejet chronique persiste chez les rats transférés par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet, résultats non publiés). Ainsi, les rats transférés par des splénocytes issus de rats traités par AAVFGL2 ne peuvent être qualifiés de tolérants en raison des signes minimes de rejet chronique subsistants. L'amélioration de l'état du greffon des rats transférés par les splénocytes vs traités par AAVFGL2 suggère que la protéine FGL2 n'est pas suffisante pour inhiber les réponses immunes contre le greffon et suggère un développement tardif de la population tolérogène après la greffe. Le transfert des cellules régulatrices la veille de la greffe permet de prévenir les lésions du greffon plus précocément.

Les souris FGL2^{-/-} présentent des lymphocytes T plus réactifs à la stimulation polyclonale et allogénique, produisant de plus grandes quantités d'IFN γ et de moindres quantités d'IL-4 suggérant une polarisation Th1, une augmentation du nombre de pDC et de cDC qui s'explique par une moindre apoptose après stimulation par le LPS, et possèdent un plus grand nombre de lymphocytes B avec une forte quantité d'anticorps en réponse à un antigène, en accord avec les résultats obtenus *in vitro* (Itay Shalev et al. 2008). Nous avons analysé le phénotype des rats traités par l'AAVFGL2 et ayant reçu des splénocytes tolérogènes afin d'orienter les expériences visant à l'identification de la population cellulaire capable de transférer la survie à long-terme du greffon (Figure 28). Cependant, nous n'avons constaté aucun changement significatif quant à la proportion ou au nombre absolu de lymphocytes T CD8⁺, de lymphocytes T CD8⁺CD45RC^{low}, de lymphocytes T CD4⁺, de lymphocytes B CD45RA⁺, ni de pDC, vs non traités.

Le transfert de splénocytes déplétés en lymphocytes B réduit la survie d'allogreffe (médiane=38.5 jours) vs le transfert de splénocytes totaux (survie infinie) (Résultat complémentaire, Figure 29 A). La déplétion incomplète des lymphocytes B, la synergie d'autres populations régulées ou régulatrices, peuvent expliquer la légère prolongation de survie de l'allogreffe. Cependant, la stratégie de sélection négative a permis de souligner l'implication de la population B dans la tolérance infectieuse. Par ailleurs, nous avons observé, chez les rats transférés par des splénocytes tolérogènes, **l'infiltration du greffon par des lymphocytes B vs les greffons syngéniques** (Figure 29 B). Le contrôle le plus adapté aurait été l'analyse de l'infiltration des lymphocytes B dans le greffon de rats transférés par des splénocytes de rats naïfs, cependant, celui-ci est rejeté la première semaine suivant la greffe, et probablement infiltré par les lymphocytes B médiateurs du rejet humoral. La population tolérogène lymphocytaire B a été identifiée par sélection positive par FACS Aria. En effet, **les lymphocytes B tolérogènes transférés *in vivo* transmettent la survie à long terme de l'allogreffe chez deux tiers des receveurs** (Figure 30).

Les lymphocytes B tolérogènes purifiés et transférés présentent une augmentation de la proportion en IgD⁻ et une diminution des IgD⁺, soient **une augmentation des lymphocytes B immatures transitionnelles T1 et isotype-switched et une diminution des lymphocytes B folliculaires**. Après leur transfert, on observe **une infiltration du greffon par des lymphocytes B présentant un phénotype mature (isotype switched)** vs les lymphocytes B présents dans la rate, et une faible proportion de cellules CD24⁺. Nous n'avons pas pu analyser l'ensemble des marqueurs caractérisant la maturation des cellules B, en raison de l'indisponibilité des anticorps. Par ailleurs, il n'est pas possible de comparer directement les lymphocytes B du rat à ceux décrits chez la souris et l'Homme.

Les lymphocytes B des rats long-surviveurs sont aussi capables d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ *in vitro* en réponse aux pDC allogéniques, ou stimulés de façon polyclonale, vs les lymphocytes B de rats naïfs (schéma bilan). La capacité régulatrice des Bregs doit être confortée par de nouvelles expériences, et leur mécanismes de suppression identifiés. Les lymphocytes Bregs décrits peuvent agir via des cytokines, telles que l'IL-10 (Fillatreau et al. 2002; Mauri et al. 2003; P. A. Blair et al. 2010; Yohei Iwata et al. 2011; Atsushi Mizoguchi et al. 2002; B. Shi et al. 2011; S. Xiao et al. 2012; J. G. Evans et al. 2007; Carter et al. 2011). Cependant, la sécrétion d'IL-10 dans le surnageant de coculture (lymphocytes B/lymphocytes T CD4⁺/DC) par les lymphocytes B tolérogènes vs naïfs n'est pas augmentée. De même, les taux de TNF α et d'IFN γ dans le surnageant ne varient pas

significativement. Ces mécanismes d'action sont donc écartés. Plusieurs molécules dont l'implication dans la fonction des Bregs a déjà été montrée telles que le TGF β (J. Tian et al. 2001; Parekh et al. 2003), la galectin-1 (Zuñiga et al. 2001), ou FasL (Mauri & Bosma 2012) devraient être étudiées. Cependant, pour Pallier et al., les lymphocytes B des patients greffés rénaux tolérants n'ont pas de profil cytokinique distinctif (Annaick Pallier et al. 2010). Dans notre modèle, il n'est pas exclu que les lymphocytes Bregs soient responsables de ce rejet chronique via un mécanisme de régulation par cytotoxicité. Leurs mécanismes d'action restent en effet à élucider. L'analyse transcriptomique des Bregs permettrait d'expliquer leur potentiel tolérogène *in vivo*.

Les lymphocytes B CD45RA⁺ seraient ainsi la population cellulaire responsable de la tolérance infectieuse itérative sur 5 générations (4 transferts successifs de splénocytes suivis d'un transfert de lymphocytes B). Ces résultats suggèrent que **les lymphocytes Bregs ne sont pas seulement induits en réponse à la surexpression de FGL2 mais sont aussi capables d'éduquer de nouvelles cellules**. La tolérance infectieuse est jusqu'alors décrite comme une tolérance imposée aux lymphocytes T naïfs par les lymphocytes Tregs CD4⁺ (S. Qin et al. 1993) et CD8⁺ (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007), généralement via les DC (Kendal & Herman Waldmann 2010). Nous décrivons ainsi pour la première fois une tolérance infectieuse induite par des lymphocytes B régulateurs. De nombreuses études montrent l'interaction de DC tolérogènes avec les lymphocytes B. Les DC peuvent en effet réguler la migration des lymphocytes B (Dubois et al. 2001), et jouent un rôle important dans l'initiation et la régulation de la synthèse d'anticorps par les lymphocytes B (G. MacPherson et al. 1999), inhibant par exemple leur production en IgE via le TGF β , l'IFN γ ou par contact (Obayashi et al. 2007). De façon intéressante, une étude récente montre notamment le rôle de DC CD11b^{hi}Ia^{low} régulateurs, capables d'induire la différenciation de lymphocytes B spléniques en lymphocytes B régulateurs CD19^{hi}RFc γ IIB^{hi}IL10⁺, via l'IFN β et CD40L (L. Qian et al. 2012) (schema bilan).

Les lymphocytes Bregs associés à la tolérance en transplantation sont généralement décrits comme exprimant fortement le Fc γ RIIB (K. A. Newell et al. 2010; Sagoo et al. 2010; Annaick Pallier et al. 2010; L. Le Texier et al. 2011)(L. Qian et al. 2012). **Chez les rats traités par AAVFGL2, les lymphocytes B tolérogènes expriment plus fortement le Fc γ RIIB, qui est le récepteur connu de FGL2, suggérant une susceptibilité accrue à celle-ci** (Figure 30). Toutefois, l'effet de FGL2 sur les lymphocytes B chez le rat diffère de celui décrit chez la

souris. Il a été montré que les souris FGL2^{-/-} possèdent un plus grand nombre de lymphocytes B, et que FGL2 induit l'apoptose des lymphocytes B chez la souris (Itay Shalev et al. 2008). Cependant, l'incubation de lymphocytes B de rats naïfs avec la protéine FGL2 n'a pas induit leur apoptose ni inhibé leur maturation en réponse au CPG de type B (le CPG de type A stimule la production d'IFN I, en particulier l'IFN α , permet la maturation des pDC, et active fortement les cellules NK (Krug et al. 2001), alors que le CPG de type B stimule la maturation des cellules B et des monocytes humains mais faiblement la maturation des pDC et leur production d'IFN α (Krieg et al. 1995)). Les DC exprimant aussi le Fc γ RIIB (C. W. Y. Chan et al. 2003; Itay Shalev et al. 2008; Hao Liu et al. 2008), un effet de FGL2 sur les lymphocytes B via les DC n'est pas exclu (schema bilan), tel l'effet de FGL2 sur les lymphocytes T CD4⁺ via les pDC *in vitro*. Toutefois, les Bregs sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ stimulés de façon polyclonale.

Le transfert de splénocytes des rats traités par AAVFGL2 ne permet pas de prolonger la survie de l'allogreffe de cœur issu d'un rat Brown Norway RT1^{n/n}. La tolérance infectieuse est donc spécifique des antigènes du donneur, suggérant l'implication du BCR. Cependant, la stimulation du BCR induit logiquement la production d'anticorps. Or la réponse anticorps est inhibée chez les rats traités par AAVFGL2 ou transférés par les lymphocytes Bregs. De même, les patients greffés rénaux tolérants présentent de faibles taux d'anticorps (Sagoo et al. 2010). Néanmoins, il est montré que la co-ligation du BCR est nécessaire pour l'induction de signaux inhibiteurs par le Fc γ RIIB (Muta et al. 1994). **Il est possible que la reconnaissance des antigènes du donneur par le BCR combinée à la ligation de FGL2 à son récepteur stimulent l'expression de molécules suppressives et non la réponse anticorps.** En effet, la production d'anticorps est dissociée de la fonction régulatrice des lymphocytes B notamment dans les études de Deng et Matsumoto (Shaoping Deng et al. 2007; Matsumoto et al. 2011).

5. *Tregs vs Bregs*

Les Bregs sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Amu et al. 2010; Tadmor et al. 2011; Tu et al. 2008; L. C. Chen et al. 2009; J. Zheng et al. 2010) (Reichardt et al. 2007), de Tr1 (Sayi et al. 2011), ou de lymphocytes T CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (B. Wei et al. 2005). A l'inverse, dans notre modèle, **les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} pourraient induire des Bregs via l'expression de FGL2.**

Dans le modèle AdCD40Ig, la voie CD40 est inhibée. Alors que certaines populations de lymphocytes Bregs sont décrites comme immatures, d'autres études montrent l'importance de

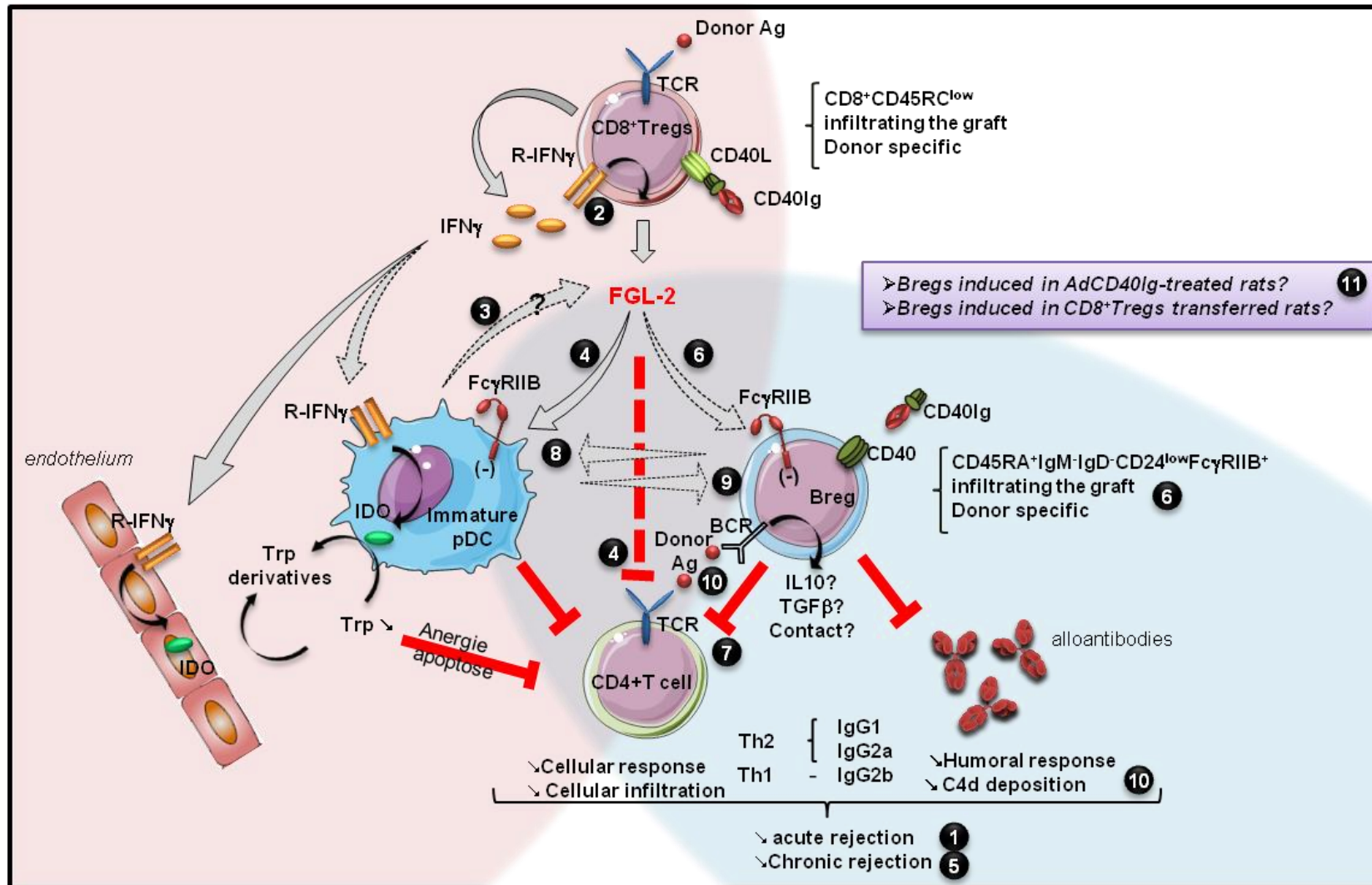
la signalisation CD40 pour le développement et la fonction de populations de Bregs (Mauri & Bosma 2012). L'expression de CD40 par les lymphocytes B est notamment associée à la différenciation des lymphocytes Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Tu et al. 2008), ainsi qu'à la tolérance tumorale (S. Inoue et al. 2006), à la survie d'allogreffe cardiaque chez le rat (Niimi et al. 1998), et à la tolérance opérationnelle chez les patients greffés rénaux (Annaick Pallier et al. 2010). L'équipe a montré que le transfert de cellules non T de rats traités par AdCD40Ig ne transmet pas la survie long terme du greffon (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). Il semble donc que le blocage de la voie CD40 inhibe le développement ou la fonction des lymphocytes Bregs induits par l'expression de FGL2 par les Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$.

Il serait donc intéressant d'étudier la population lymphocytaire B chez les rats transférés par les lymphocytes Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ chez lesquels la voie CD40 est intacte. Toutefois, la prolongation de survie de l'allogreffe établie par transfert adoptif de Tregs peut être abrogée par l'inhibition de IDO même 120 jours après la greffe (Guillonneau, Marcelo Hill, et al. 2007). Ceci suggère que la population de lymphocytes Bregs n'a pas été établie ou que leur fonction suppressive est dépendante de IDO.

Enfin, la déplétion en CD8 (par l'anticorps OX8) chez les receveurs traités par AdCD40Ig prévient du rejet aigu chez seulement 50% des animaux et induit une augmentation de la proportion de lymphocytes B dans la rate (mais pas les lymphocytes T ni des lymphocytes T $CD4^+$) vs les rats traités par AdCD40Ig et un contrôle isotypique (3G8). De plus, **le transfert de splénocytes des rats long surviveurs traités par AdCD40Ig et déplétés en CD8, transmet la tolérance, contrairement au transfert de lymphocytes T** (Guillonneau, non publié). La prolongation de survie d'allogreffe chez 50% des animaux traités pourrait être permise par le développement de lymphocytes Bregs. Il serait donc intéressant de tester les fonctions suppressives de la population B et d'analyser la réponse anticorps.

Figure 30. (ci-contre) Schéma bilan des mécanismes impliquant la protéine FGL2.

1. FGL2 sécrétée par les lymphocytes Tregs $CD8^+ CD45RC^{low}$ prévient du rejet aigu
2. $IFN\gamma$ induit l'expression de FGL2
3. IDO pourrait inhiber l'expression de FGL2
4. FGL2 inhibe la réponse des lymphocytes T $CD4^+$ aux pDC allogéniques en coculture, par une action simultanée sur les deux populations cellulaires
5. Les lésions de rejet chronique sont fortement diminuées chez les rats transférés par les lymphocytes Bregs.
6. Les lymphocytes B tolérogènes spléniques expriment fortement le $Fc\gamma RIIB$ et sont principalement immatures transitionnelles T1. Transférés in vivo, ils infiltrent le greffon sous un phénotype mature ($IgM^+ IgD^+ CD24^{low}$) et transmettent la survie à long terme de l'allogreffe chez 2/3 des receveurs.
7. Les lymphocytes Bregs inhibent la réponse des lymphocytes T $CD4^+$ aux pDC allogéniques, ou stimulés de façon polyclonale in vitro, par des mécanismes inconnus.
8. Les lymphocytes Bregs sont capables de tolérance infectieuse via probablement les DC.
9. FGL2 pourrait agir sur les lymphocytes B via les DC exprimant le $Fc\gamma RIIB$
10. L'implication du BCR pourrait expliquer la spécificité des Bregs au donneur.
11. Les Tregs $CD8^+ CD45RC^{low}$ pourraient induire des Bregs via l'expression de FGL2. Par ailleurs, le transfert de splénocytes non lymphocytes T des rats long-surviveurs traités par AdCD40Ig et déplétés en CD8 transmettant la tolérance suggère une population Bregs.



Projet II

Article II

Propriétés tolérogènes de l'IL-34 dans un modèle de transplantation d'organes.

Séverine Bézie, Elodie Picarda, Carole Guillonnet, Laurent Tesson, Claire Usal, Ignacio Anegón, Lise Caron.

Article en préparation

Titre original: Tolerogenic properties of Interleukin-34 in a model of organ allotransplantation

**Tolerogenic properties of IL-34 in a model of organ
allograft transplantation.**

Séverine Bézie, Elodie Picarda, Carole Guillonnet, Laurent Tesson, Claire Usal,
Ignacio Anegon^{1,2}, Lise Caron¹.

* INSERM UMR 1064-ITUN, 30, boulevard Jean Monnet, 44093, Centre Hospitalier
Universitaire de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

¹ both senior authors

² corresponding author: Ignacio.Anegon@inserm.fr. Fax: 33240087411. Telephone:
33240087415

Abstract

Induction of immune tolerance is a powerful tool to control immune responses responsible for pathological situations. Cytokines, enzymes controlling metabolic pathways and cell surface molecules capable of inducing tolerance have been described. Despite these findings, evidence for other non-identified mechanisms exist and is thus important to identify new mediators of immune tolerance. We have previously identified a CD8⁺ Treg population responsible in a rat model for long-term allograft survival and inhibition of CD4⁺ T cell proliferation in MLRs. In this manuscript we show that CD8⁺ Tregs express IL-34 and we explored the tolerogenic role of IL-34 in vitro and in vivo. We show that IL-34 produced by CD8⁺ Tregs mediated suppression of CD4⁺ T cells in MLRs since neutralization of IL-34 significantly increased CD4⁺ T cell proliferation. Furthermore, addition of IL-34 to an MLR inhibited CD4⁺ T cell proliferation. IL-34 produced by CD8⁺ Tregs signaled through M-CSFR since a blocking anti-M-CSFR antibodies reverted suppression of CD4⁺ T cells. Despite that addition of M-CSF to these MLRs inhibited CD4⁺ T cell proliferation, the presence of anti-M-CSF neutralizing antibody did not reverse CD8⁺ Treg inhibition of CD4⁺ T cell proliferation, indicating that CD8⁺ Tregs mediated suppression through M-CSF-R through production of IL-34 and not M-CSF. Finally, in vivo treatment with IL-34 by using a viral gene transfer vector of transplanted animals significantly prolonged allograft survival. In conclusion, we identified IL-34 as a new mediator of the suppression of CD4⁺ T cells by CD8⁺ Tregs and as tolerogenic cytokine able to inhibit allograft rejection.

Introduction

Organ transplantation has shown very significant improvements in both prevention and treatment of acute rejection but subclinical episodes and chronic graft dysfunction still heavily impact medium and long-term graft survival (1). Emerging therapeutic strategies, among them tolerance induction to donor antigens are moving into the clinics after years of experimental models work (2,3). Among natural mechanisms and tolerance inductive strategies, different types of regulatory cells are among the most promising ones (4). CD8⁺ regulatory T cells (CD8⁺ Tregs) in the transplantation field but also in other pathophysiological situations have been highlighted in recent years (5–7).

In a model of cardiac allograft in rats, we have previously shown that blocking of CD40-CD40L by CD40Ig treatment induces long term graft survival through generation of CD8⁺ Tregs (8). We showed that these CD8⁺ Tregs impose allogeneic tolerance partially through production of IFN γ and fibrinogen-like protein 2 (FGL2) (8)(9). A potential role for FGL2 as an immune tolerogenic mechanisms was first suspected when pan-genomic transcriptomic comparison of CD8⁺ Tregs from tolerant CD40Ig-treated vs. CD8⁺ Tregs from naïve rats showed increased FGL2 expression (9). The same transcriptomic analysis revealed that IL-34 was overexpressed in CD8⁺ Tregs from CD40Ig tolerant animals vs. the naïve ones.

IL-34 was identified recently (10), shares homology with M-CSF and acts at least through a common receptor, CD115 (10). However, spatial and temporal differences in their expression between IL-34 and M-CSF (11) or of binding to and signaling through CD115 (12) suggest a complementary rather than redundant role for these cytokines. IL-34 function has been mainly related until now with monocyte and macrophage (osteoclasts, microglia) as well as DC survival and function (11). Data on the expression of IL-34 in resting cells is partially overlapping since mice with GFP under the control of the IL-34 promoter showed positive

keratinocytes, hair follicles, neurons, proximal renal tubule cells and seminiferous tubule germ cells (11) whereas mRNA and protein analysis showed heart, brain, lung, liver, kidney, spleen, thymus, testicles, ovaries, prostate, colon, and small intestine, and abundant protein expression in spleen red pulp and osteoclast (10). Upon inflammation, other cells such as fibroblasts (13), osteoblasts (14) and articular synovial cells (13) express IL-34. Expression of IL-34 by other lymphoid cells and particularly T cells has not been yet described. Similarly, IL-34 has not been linked to effects on immune function of DCs or T cells since the decreased response to DTH antigens or CNS viral infections in IL-34-deficient mice is linked to paucity of Langerhan's and microglia, in skin and CNS respectively (11).

The objectives of this study were to confirm the expression and functional role of IL-34 produced by CD8⁺ Tregs and to evaluate the immunoregulatory role of IL-34 in an organ transplantation model.

We show that IL-34 expression is increased in tolerated grafts and in CD8⁺ Tregs from CD40Ig-treated tolerant animals. We also show for the first time the involvement of IL-34 in CD8⁺ Tregs suppressive function in vitro and we demonstrate that IL-34 has suppressive properties on allogeneic immune responses both in vitro and in vivo.

Materials and methods

Animals and cardiac transplantation models.

Heart allotransplantation was performed between whole MHC incompatible male LEW-1W (donors) and LEW-1A (recipients) rats as previously described (8). Heart survival was evaluated by palpation through the abdominal wall and heart beating was graded from +++ to -. The experiments were approved by the regional ethical committee for animal experimentation.

IL-34 quantitative RT-PCR.

The isolation and retrotranscription of mRNA as well as the quantification of specific mRNA levels using Taqman technology after normalization to HPRT values have been described (8). The probes sequences were for forward primer 5' CTGGCTGTCCTCTACCCCTGA 3' and for reverse primer 5' TGTCGTGGCAAGATATGGCAA 3'.

Monoclonal antibodies and flow cytometry.

The antibodies used for T cells (TCR $\alpha\beta$, clone R7/3), CD4⁺CD25⁻ T cells (clones OX35 and OX39), CD8⁺ T cells (clone OX8), CD8⁺CD45RC^{low} T cells (clones OX8 and OX22), and CD4⁺CD45R⁺85C7⁺ pDCs (clones His24, OX35 and 85C7) sorting were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, UK). All biotin-labelled mAbs were visualized using Streptavidin-PE-Cy7 (BD Biosciences) or Streptavidin-Alexa405. IL-34-Myc was detected using an anti-myc antibody (9E10, Sigma). IL-34, CD115, and MCSF were blocked with the anti-IL-34 (PAB16574, Abnova) anti-CD115 (MCA1898, Serotec) and anti-M-CSF (AB-416-NA, R and D system) antibodies. Antibodies against MHC-II (OX6), CD11b and CD45RA⁺ B cells (OX33) were analysed to characterize cell's phenotype. A Canto II cytometer (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence,

and data were analyzed using the FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Cells were first gated by their morphology excluding dead cells by selecting DAPI viable cells.

AAV generation and use in vitro and in vivo.

Complete cDNA sequence of rat IL-34 containing Q81 (10), or GFP as control, were positioned downstream a RSV promotor. Plasmids were first tested in HEK293T cells transfected with lipofectamine reagent (Life Technologies, Carlsbad, Nouveau-Mexique). Cells were analysed for GFP and IL-34-myc expression 48h later by FACS with anti-myc Ab. Then, plasmids were used to produce AAV vectors of serotype 8 (LTG platform, INSERM UMR 1089, Nantes). HEK293T cells were transduced with 10 000, 100 000 to 1 000 000 MOI vector genome copies/cell of AAV-IL-34 or AAV-GFP and 5 000 MOI AdLacZ. 24h later, cells were harvested and analysed for IL-34-Myc expression by FACS, and supernatant was tested for suppression activity on CD4⁺ T cells responding to allogeneic pDCs, at a 1/10 and 1/5 dilution. Recombinant AAV-IL-34 and AAV-GFP ($4.5 \cdot 10^{10}$, $1 \cdot 10^{12}$, and $2 \cdot 10^{12}$ vector genomes/rat) vectors were injected *i.v.* in 4-weeks-old rats one month before transplantation to allow optimal expression from AAV vectors (15) Blood samples were taken for donor allospecific antibodies quantification.

Mixed lymphocyte reaction.

Naïve Lewis 1A CD4⁺ T cells, naïve Lewis 1W pDC, and AdCD40Ig-treated Lewis 1A CD8⁺CD45RC^{low}Tregs subsets were sorted as previously described (9). Serum from AAV-IL-34-treated, AdCD40Ig-treated recipients and naïve rats were added in coculture to reach 3.12%, 6.25%, and 12.5% final concentration. Supernatant of transduced cells was added to CD4⁺T cells and pDC from 10% to 20% final concentration for suppressive activity test. IL-34, CD115 or M-CSF-blocking Ab or isotypic control were tested for blocking activity from 1.25 to 30µg/ml. M-CSF protein (ab56288, ABCAM) was tested from 0.1 to 2 µg/ml. Proliferation of CFSE-labelled CD4⁺CD25⁻ T cells was analyzed by flow cytometry 6 days

later, by gating on TCR⁺CD4⁺ cells (R7/3-APC, Ox35-PECY7) among living cells (DAPI negative).

Donor specific alloantibodies quantification.

Donor spleens were digested by collagenase D, stopped with 400µl EDTA 0.1mM, and red cells were lysed. Serum of recipients were added to donor splenocytes at a dilution 1/8, and incubated with either anti-rat IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Labs INC, Baltimore, USA), anti-rat IgG1 (MCA 194, Serotec), anti-rat IgG2a (MCA 278, Serotec), or anti-rat IgG2b (STAR114F, Serotec) and anti-Ms Ig-FITC(115-095-164, Jackson ImmunoResearch). A FACS Canto (BD Biosciences, Mountain View, CA) was used to measure fluorescence, and data were analyzed using the FLOWJO software (Tree Star, Inc. USA). Geometric mean of fluorescence (MFI) of tested sera was divided by mean of 5 naive Lewis 1A sera MFI as control.

Statistical analysis.

One Way ANOVA Kruskal Wallis test and Dunn's posttest was used for PCR and coculture experiments, Two-Way ANOVA test and Bonferroni posttests was applied for donor-directed antibodies, and splenocytes phenotype characterization, and Mantel Cox test was used to analyse survival curves.

Results

IL-34 is involved in CD8⁺ Treg-mediated suppression

DNA microarray highlighted IL-34 overexpression in CD8⁺ Tregs of AdCD40Ig-treated vs. naïve rats with a fold change of 4.05 (**data not shown**). We confirmed by qPCR a 11.25 fold higher expression of IL-34 mRNA in splenic CD8⁺ Tregs 120 days after graft and AdCD40Ig-treatment compared with naïve rats with a mean of 0.0009 and 0.011 UA respectively (**Fig 1 A**). As observed by Lin (16), IL-34 mRNA is expressed endogenously in spleen and heart of naïve rats (**Fig 1 B**). Correlating with the accumulation of CD8⁺ Tregs in the graft on the first week, IL-34 expression is 3.8 fold higher in AdCD40Ig-treated rat graft at day 5 compared with non-treated rats (mean: 0.1287 vs 0.03323 UA respectively), and then decreased with time (**Fig 1B**). Similar expression kinetic is observed in spleen (**data not shown**). This suggests a role for IL-34 in CD8⁺ Treg-mediated inhibition of graft rejection. Moreover, IL-34 expression kinetic suggests its involvement in establishment of a tolerance environment rather than in its maintenance.

CD8⁺ Tregs suppress proliferation of CD4⁺ T cells in response to allogeneic pDCs in vitro (2). To address whether IL-34 was involved in CD8⁺ Treg suppression of CD4⁺ T cell proliferation against allogeneic pDCs, we added to the MLR suppressive assay a neutralizing anti-IL-34 antibody at increasing concentrations. The presence of this anti-IL-34 antibody resulted in a dose response increased CD4⁺ proliferation resulting in up to 59 % reversal of the inhibition mediated by CD8⁺ Tregs (**Fig 2**). It is possible that the remaining suppression could be due to other molecules involved in this process, like IFN γ , IDO and FGL2 (9). To further analyze the suppressive activity of IL-34, and since rat IL-34 is not commercially available, we tested recombinant mouse IL-34 but we did not observe a suppressive effect (**data not shown**). Since the species restriction of IL-34 is not known, we used the

supernatant of cells transduced with AAV encoding for rat IL-34 and observed a significant inhibition of MLRs (see below).

M-CSF and CSF1-R involvement in IL-34-mediated suppression.

CSF1-R is the only receptor described until now for IL-34 and is shared with M-CSF (16,17). CSF1-R is expressed by monocytes/macrophages, cDCs and pDCs (18,19). CD8⁺ Tregs are able to suppress CD4⁺ cell proliferation exclusively when cDCs or pDCs are present and this suppression is more efficient with pDCs (9). Thus, we tested the involvement of CSF1-R in CD8⁺ Tregs mediated suppression by using an anti-CSF1-R-blocking Ab that has been previously shown to inhibit M-CSF actions in both rats and mice (20). Blocking of CSF1-R abrogated 33.2 % of CD8⁺ Treg-mediated suppression on CD4⁺ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs (**Fig 3A and B**).

Since the CSF1-R is shared between IL-34 and M-CSF (16,17), we tested whether M-CSF would also have a suppressive function. We observed that mouse M-CSF suppressed up to 93.5 % of CD4⁺ T cells proliferation in response to allogeneic pDCs (**Fig 3C and D**). This suggests that M-CSF-mediated suppression, as for IL-34, acts through pDCs expressing the CSF1-R (18,19). However, blocking of M-CSF in co-culture suppressive assays in the presence of CD8⁺ Tregs did not restore CD4⁺ T cell proliferation, indicating that M-CSF is not involved in CD8⁺ Treg-mediated suppression (**Fig 3E and F**).

IL-34 prolongs allograft survival

Given that IL-34 is involved in CD8⁺ Treg mediated suppression in vitro, and since rat IL-34 is not commercially available and difficult to produce for in vivo experiments, we generated an AAV vector recombinant for the rat IL-34 sequence in order to produce the IL-34 in vivo as we have done for other molecules in primates (15) and rats (21) to test the effect of IL-34 on cardiac allograft survival in rats. HEK293 cells transfected with IL-34-recombinant plasmid or transduced with AAV-IL-34 expressed IL-34 (**Fig 4A and B respectively**),

confirming AAV-IL-34 as a functional vector for the expression of IL-34 in vivo. Moreover, supernatant from AAVIL-34 -transduced cells inhibited 33.1 % of the proliferative response of CD4+ T cells to allogeneic pDCs vs. 6.8 % for GFP-control (**Fig 4C and D**). Thus, AAV-IL-34 is functional since IL-34 was detected in transduced cells and importantly supernatant from these cells suppresses an MLR.

To express IL-34 in vivo we injected intramuscularly AAV-IL-34. Reagents to detect rat IL-34 in serum are not available but this gene delivery method for secreted immunosuppressive molecules such as CTLA4Ig allows detection of transgenes from 1 week after gene transfer and a progressive increase up to 1 month and a plateau of several weeks or months followed by a progressive decline but with high levels still detectable years after gene transfer (15) . Intramuscular injection of AAV-IL-34 one month before transplantation without any further treatment of recipients resulted in a significant prolongation of mean survival time graft survival with a (32.6 ± 7.8 days vs. controls injected with AAV-GFP (14.2 ± 1.8 days) and non-treated animals (7.8 ± 0.6 days) (**Fig 5**).

Acknowledgments.

This work was in part funded by the Fondation Progreffe et la Société Francophone de Transplantation.

References

1. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL-S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N. Engl. J. Med.* 2003 déc 11;349(24):2326-33.
2. Srinivas TR, Kaplan B. Transplantation in 2011: New agents, new ideas and new hope. *Nat Rev Nephrol.* 2012 févr;8(2):74-5.
3. Londoño M-C, Danger R, Giral M, Souillou J-P, Sánchez-Fueyo A, Brouard S. A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* 2012 juin;12(6):1370-7.
4. Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(6):417-30.
5. Niederkorn JY. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2008 juin;20(3):327-31.
6. Picarda E, Anegón I, Guillonéau C. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy.* 2011 avr;3(4 Suppl):35-7.
7. Ménoret S, Guillonéau C, Bezié S, Caron L, Anegón I, Li X-L. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol. Biol.* 2011;677:63-83.
8. Guillonéau C, Hill M, Hubert F-X, Chiffolleau E, Hervé C, Li X-L, et al. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 2007 avr;117(4):1096-106.
9. Li XL, Ménoret S, Bezie S, Caron L, Chabannes D, Hill M, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* 2010 juill 15;185(2):823-33.
10. Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung Y-G, Yu W, Huang M, et al. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* 2010 sept;88(3):495-505.
11. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology* [Internet]. 2012 juin 24 [cité 2012 juin 28]; Available de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729249>
12. Chihara T, Suzu S, Hassan R, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Motoyoshi K, et al. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell Death Differ.* 2010 déc;17(12):1917-27.
13. Chemel M, Le Goff B, Brion R, Cozic C, Berreur M, Amiaud J, et al. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann. Rheum. Dis.* 2012 janv;71(1):150-4.
14. Baud'huin M, Renault R, Charrier C, Riet A, Moreau A, Brion R, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J. Pathol.* 2010 mai;221(1):77-86.

15. Toromanoff A, Chérel Y, Guilbaud M, Penaud-Budloo M, Snyder RO, Haskins ME, et al. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.* 2008 juill;16(7):1291-9.
16. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 2008 mai 9;320(5877):807-11.
17. Garceau V, Smith J, Paton IR, Davey M, Fares MA, Sester DP, et al. Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J. Leukoc. Biol.* 2010 mai;87(5):753-64.
18. Fancke B, Suter M, Hochrein H, O'Keeffe M. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood.* 2008 janv 1;111(1):150-9.
19. MacDonald KPA, Rowe V, Bofinger HM, Thomas R, Sasmono T, Hume DA, et al. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J. Immunol.* 2005 août 1;175(3):1399-405.
20. Gilmore GL, Shadduck RK. Inhibition of day-12 spleen colony-forming units by a monoclonal antibody to the murine macrophage/monocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 1995 mai 15;85(10):2731-4.
21. Texier LL, Thebault P, Carvalho-Gaspar M, Vignard V, Merieau E, Usal C, et al. Immunoregulatory Function of IL-27 and TGF- β 1 in Cardiac Allograft Transplantation. *Transplantation.* 2012 août 15;94(3):226-33.
22. Mizuno T, Doi Y, Mizoguchi H, Jin S, Noda M, Sonobe Y, et al. Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* 2011 oct;179(4):2016-27.
23. Sakurai T, Yamada M, Simamura S, Motoyoshi K. Recombinant human macrophage-colony stimulating factor suppresses the mouse mixed lymphocyte reaction. *Cell. Immunol.* 1996 juill 10;171(1):87-94.
24. Sakurai T, Wakimoto N, Yamada M, Shimamura S, Motoyoshi K. Effect of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on mouse immune responses in vivo. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1998 févr;20(1):79-102.
25. Guan Y, Yu S, Zhao Z, Ciric B, Zhang G-X, Rostami A. Antigen presenting cells treated in vitro by macrophage colony-stimulating factor and autoantigen protect mice from autoimmunity. *J. Neuroimmunol.* 2007 déc;192(1-2):68-78.
26. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J. Immunol.* 2008 nov 1;181(9):5829-35.
27. Doyle AG, Halliday WJ, Barnett CJ, Dunn TL, Hume DA. Effect of recombinant human macrophage colony-stimulating factor 1 on immunopathology of experimental brucellosis in mice. *Infect. Immun.* 1992 avr;60(4):1465-72.
28. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 2007 déc 15;110(13):4319-30.

29. Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan W-H, Leboeuf M, et al. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Exp. Med.* 2011 mai 9;208(5):1069-82.
30. Riquelme P, Tomiuk S, Kammler A, Fändrich F, Schlitt HJ, Geissler EK, et al. IFN- γ -induced iNOS Expression in Mouse Regulatory Macrophages Prolongs Allograft Survival in Fully Immunocompetent Recipients. *Mol. Ther.* 2012 août 28;
31. Milhaud G, Labat ML, Parant M, Damais C, Chedid L. Immunological defect and its correction in the osteopetrotic mutant rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977 janv;74(1):339-42.
32. Hochman N, Wahl LM, Sandberg AL. Coexistence of defective and normal immunologic functions in lymphocytes and macrophages from osteopetrotic (op) rats. *J. Immunol.* 1982 juill;129(1):278-81.
33. Evans SF, Nisbet NW, Marshall MJ, Catty D. A secondary immune deficiency in the Fatty/Orl-op rat. *Br J Exp Pathol.* 1985 avr;66(2):251-5.
34. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J. Leukoc. Biol.* 2000 juill;68(1):144-50.
35. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 juill;8(7):533-44.
36. Eda H, Zhang J, Keith RH, Michener M, Beidler DR, Monahan JB. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine.* 2010 déc;52(3):215-20.
37. Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood.* 2002 janv 1;99(1):111-20.
38. Hume DA, MacDonald KPA. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood.* 2012 févr 23;119(8):1810-20.
39. Jose MD, Le Meur Y, Atkins RC, Chadban SJ. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *Am. J. Transplant.* 2003 mars;3(3):294-300.
40. Ma X, Lin WY, Chen Y, Stawicki S, Mukhyala K, Wu Y, et al. Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure.* 2012 avr 4;20(4):676-87.
41. Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, Gu G, Väänänen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e18689.
42. Hubert F-X, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. 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.* 2004 juin 15;172(12):7485-94.

43. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2002 mars;2(3):151-61.
44. Kawai K, Tsuno NH, Matsuhashi M, Kitayama J, Osada T, Yamada J, et al. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2005 juill;116(1):192-7.
45. Rhein P, Mitlohner R, Basso G, Gaipa G, Dworzak MN, Kirschner-Schwabe R, et al. CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2010 mai 6;115(18):3763-71.

Figures legends

Figure 1. Increased IL-34 expression in grafts of animals treated with CD40Ig and in CD8+ Tregs from these animals.

IL-34 mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR **A.** Cardiac grafts from AdCD40Ig-treated recipients at day 5 (n=3) and 120 (n=7) after transplantation, compared with non-treated-recipients 5-days-old grafts (n=8) and hearts from naïve animals (non-grafted n=7) (One way ANOVA, Kruskal-Wallis test : **p value summary =0.003; Dunn's posttest). **B.** FACS Aria-sorted CD8+ Tregs from spleen of naïve and 120 days old AdCD40Ig-treated rats (n=6; Wilcoxon Signed Rank Test, p value= 0.03).

Figure 2. IL-34 is involved in CD8+ Treg-mediated suppression.

CD8+ Treg-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs was FACS-evaluated for CFSE dilution after 5 days of culture. **A.** Addition of an anti-IL-34-blocking Ab abrogated CD8+ Tregs-mediated suppression compared to isotypic control (n=4 in triplicates). Results are expressed as percentage of proliferation vs. proliferation in the absence of CD8+ Tregs (100 %). **B.** Representative histogram of 1 experiment; filled grey: proliferation of CD4⁺T cells cocultured with pDC; black line: with CD8+ Tregs. One way anova, Kruskal-Wallis *p value summary=0.04; Dunn's Multiple Comparison posttest.

Figure 3. CD8+ Tregs mediate suppression through CD115 but not through production of M-CSF.

CD8+ Treg-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs was FACS-evaluated for CFSE dilution after 5 days of culture. **A.** Addition of an anti-CD115-blocking Ab abrogated CD8+ Treg-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cells proliferation in response to allogeneic pDCs when added at from 1.25 to 10 µg/ml, compared to 10 µg/ml of isotypic control (n=4 in triplicates). Results are expressed as percentage of proliferation vs. proliferation in the absence of CD8+ Tregs (100 %). One way anova, Kruskal-Wallis p value summary=0.04; Dunn's Multiple Comparison posttest. **B.** Representative histogram of 1 experiment; filled grey: proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells cocultured with pDCs; black line: with CD8+ Tregs. **C.** MCSF protein was tested for suppression activity, from 0.1 to 2 µg/ml final concentration. CD8+ Tregs were used as positive control of suppression. n=3 in triplicates. Results are expressed as percentage of proliferation vs. proliferation in the absence of CD8+ Tregs (100 %). One way ANOVA, Kruskal-Wallis **p value summary=0.0073, Dunn's posttest. **D.** Representative histogram of 1 experiment; filled grey: proliferation of CD4⁺T cells cocultured with pDC without MCSF protein; black line : with MCSF. **E.** MCSF-blocking Ab do not abrogate CD8+ Tregs-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻Tcells proliferation in response to allogeneic pDCs when added at from 1.25 to 30µg/ml, compared to 30µg/ml of isotypic control (n=3 in triplicates). Results are expressed as percentage of proliferation vs. proliferation in the absence of CD8+ Tregs (100 %). One way anova, Kruskal-Wallis p value summary ns; Dunn's Multiple Comparison posttest. **F.** Representative histogram of 1 experiment; filled grey: proliferation of CD4⁺T cells cocultured with pDC; black line: with CD8+ Tregs.

Figure 4. Rat IL-34 produced after cell transduction using an AAV-IL-34 is immunosuppressive in vitro.

HEK293T cells were used to express rat IL-34 tagged with a Myc epitope. **A.** Cells were transfected with the IL-34 plasmid used to generate the AAV-IL-34 vector and IL-34 was detected by FACS 48 h later (black line : anti Myc Ab; filled grey: isotypic control, one representative experiment out of 3 performed). **B.** Cells were transduced with AAV-IL-34 or GFP-recombinant at the indicated MOI; cells were analyzed for IL-34 expression by FACS with anti-Myc Ab (filled grey: AAV-GFP MOI 100 000; grey line: AAV-IL-34 MOI 10 000; black line: AAV-IL-34 MOI 100 000; one representative experiment out of 4 performed). **C.** Supernatant of AAV-IL-34 and AAV-GFP-transduced cells were tested for suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs and FACS-evaluated for CFSE dilution after 5 days of culture. Supernatants were diluted at 1/10 and 1/5 final concentration. CD8⁺ Tregs were used as positive control of suppression. n=3 in duplicates; Results are expressed as percentage of proliferation vs. proliferation in the absence of CD8⁺ Tregs (100 %). Two way ANOVA, ***p value <0.0001, *p value <0.05, Bonferroni posttest. **D.** Representative histogram of 1 experiment; filled grey: proliferation of CD4⁺T cells cocultured with pDC with 20% AAVGFP-transduced cell supernatant; black line : with 20% AAV-IL-34-transduced cells supernatant.

Figure 5. IL-34 gene transfer prolongs allograft survival.

Recipients received intravenously 10¹² vg/rat of AAV-IL-34 or AAV-GFP and were grafted 30 days later. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Log-rank (Mantel-Cox) Test, ***p value summary <0.0001; for 1.10¹²-treated .

Figure 1. S. Bézie et al.

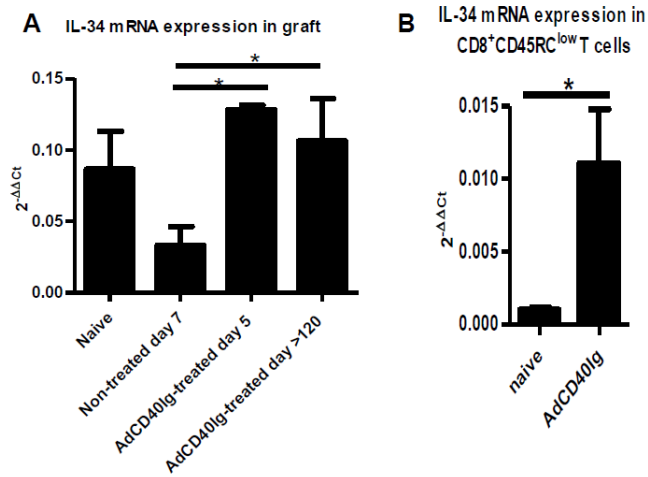


Figure 2. S. Bézie et al.

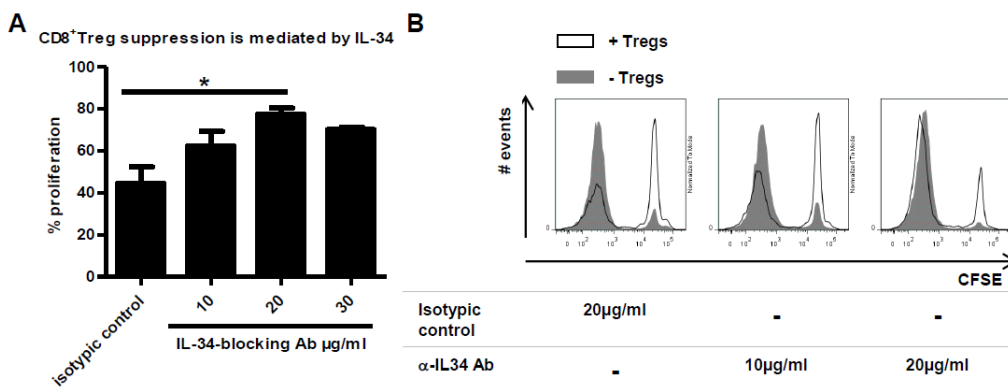


Figure 3. S. Bézie et al.

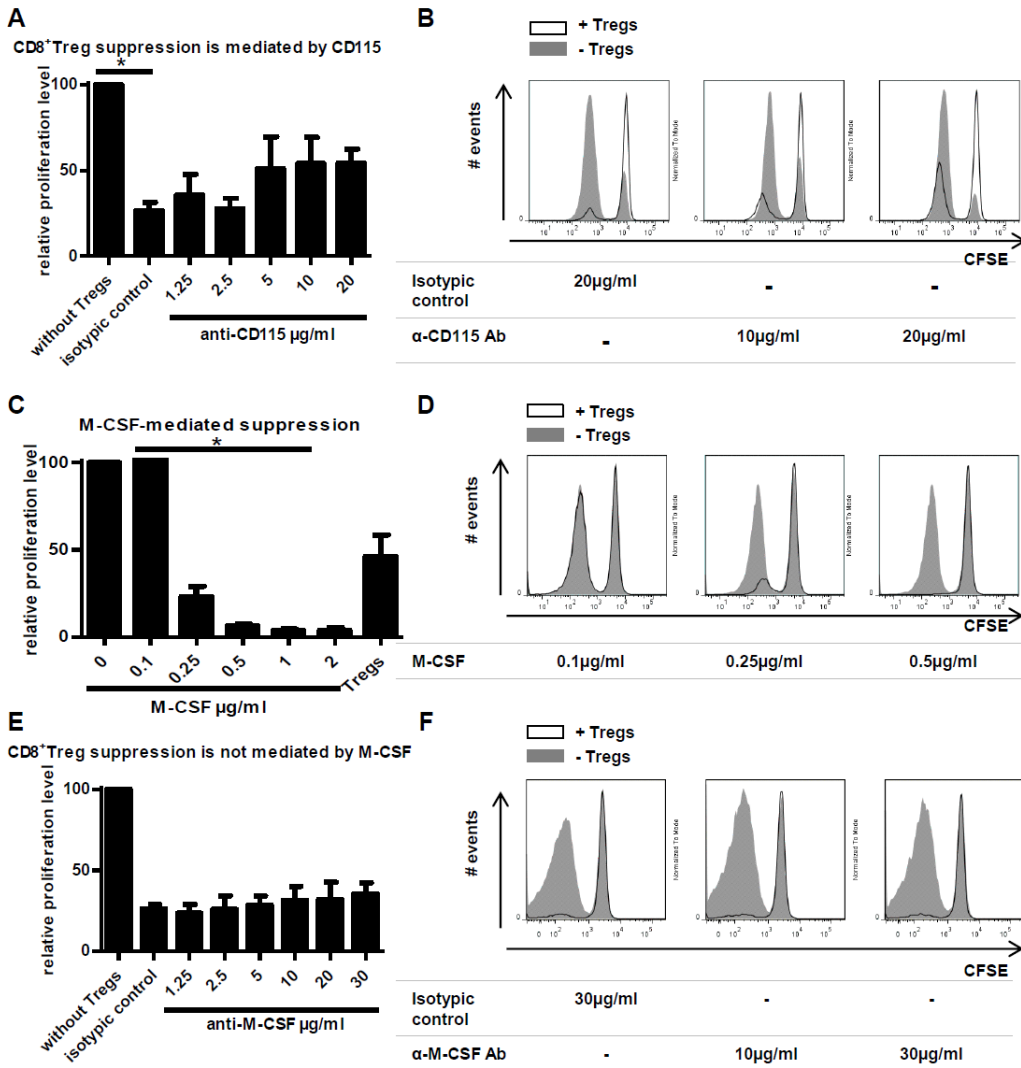


Figure 4. S. Bézie et al.

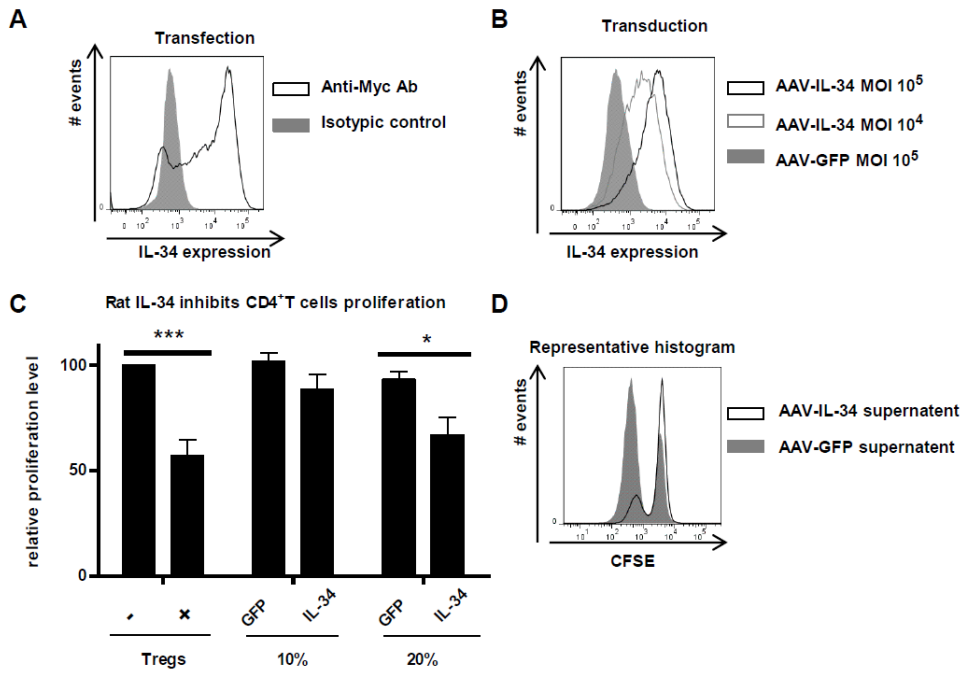
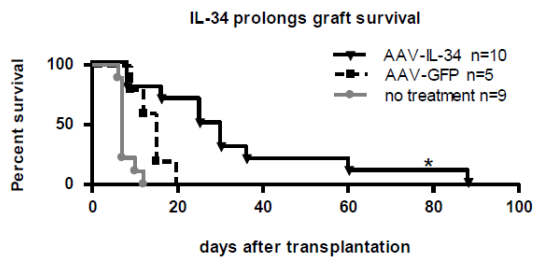


Figure 5. S. Bézie et al.



Résumé de l'article II

L'induction de la tolérance immune est un outil puissant pour contrôler les réponses immunes responsables de situations pathologiques. Des cytokines, des enzymes contrôlant les voies métaboliques et des molécules exprimées à la membrane des cellules capables d'induire la tolérance ont été décrites. Malgré ces découvertes, d'autres mécanismes encore non identifiés existent, et il est important d'identifier de nouveaux médiateurs de tolérance immune. Nous avons précédemment identifié une population de lymphocytes T régulateurs CD8⁺ responsable de la survie à long-terme de l'allogreffé chez le rat et capable d'inhiber la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ stimulés de façon allogénique. Dans cet article, nous montrons que les Tregs CD8⁺ expriment l'IL-34 et nous explorons le rôle de l'IL-34 *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons que l'IL-34 produite par les Tregs CD8⁺ inhibe la réponse T CD4⁺ *in vitro*, étant donné que le blocage de l'IL-34 augmente la prolifération des cellules T CD4⁺ de façon significative. De plus, l'ajout d'IL-34 dans les cocultures inhibe la prolifération des cellules T CD4⁺. Les Tregs CD8⁺ induisent un signal via le récepteur au M-CSF (CD115), car le blocage du CD115 par des anticorps abroge la suppression exercée sur les cellules T CD4⁺. Alors que l'ajout de protéine M-CSF inhibe la prolifération des cellules T CD4⁺, la présence d'anticorps neutralisant M-CSF n'abroge pas l'inhibition de la prolifération des cellules T CD4⁺ par les Tregs CD8⁺, suggérant que la suppression induite par les Tregs CD8⁺ via le CD115 est due à l'IL-34 et pas au M-CSF. Enfin, le traitement des animaux transplantés par l'IL-34 *in vivo* par transfert de gène via un vecteur viral prolonge significativement la survie de l'allogreffé. En conclusion, nous avons identifié l'IL-34 comme un nouveau médiateur de la suppression des cellules T CD4⁺ par les Tregs CD8⁺ et comme une cytokine tolérogène capable d'inhiber le rejet d'allogreffé.

Discussion

1. *IL-34 est impliquée dans la suppression exercée par les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low}.*

La comparaison du transcriptome des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de rats traités par AdCD40Ig vs Tregs naturels par puces pangénomiques a mis en évidence la surexpression de l'IL-34 par les Tregs induits, avec un fold change de 4,05. Ces résultats ont été confirmés par PCR quantitative. De plus, l'expression de l'IL-34 est augmentée dans le greffon la première semaine suivant la greffe chez les rats traités par AdCD40Ig vs greffés non-traités, corrélant avec l'infiltration du greffon par les Tregs. Cette expression est légèrement diminuée 120 jours après la greffe. Aucune différence significative n'est observée dans la rate. Ces résultats suggèrent **l'implication de l'IL-34 dans la fonction suppressive des Tregs, principalement dans la prévention du rejet aigu** (Figure 31 n°1).

La protéine IL-34 est capable d'inhiber la réponse T CD4⁺ aux pDC allogéniques (Figure 31 n°2). De plus, **le blocage de l'IL-34 par des anticorps abroge une partie de la suppression** de la réponse T aux pDC allogéniques par les Tregs dans les expériences de coculture. L'IL-34 est donc impliquée dans leur fonction suppressive. Alors que les blocages de FGL2 et de l'IFN γ abrogent la totalité de la suppression, le blocage d'IL-34, par des anticorps ajoutés en excès, ne permet de lever que 60% de la suppression. Ces résultats confortent l'implication des autres molécules suppressives, qui agiraient en synergie avec l'IL-34, et suggère une moindre efficacité *in vivo* de l'expression de l'IL-34 que l'expression de FGL2 ou que les Tregs dans la prévention du rejet d'allogreffe. En effet, la quantité de vecteur AAVIL-34 administrée est deux fois supérieure à celle de l'AAVFGL2 pour obtenir une survie comparable. De plus, le blocage de l'IL-34 *in vivo* chez les receveurs transférés par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} serait probablement insuffisant pour abroger la survie de l'allogreffe. Nous avons cependant généré un anticorps dirigé contre deux séquences de la protéine IL-34 de rat. L'affinité de l'anticorps pour la protéine et sa capacité de blocage de l'IL-34 doivent être testées *in vitro* dans un premier temps.

Il serait intéressant d'étudier les relations entre les différentes molécules impliquées dans la suppression induite par les Tregs. Nous avons déjà montré que l'IFN γ a un rôle clé dans la régulation de FGL2 et IDO. Il serait intéressant d'analyser l'expression de l'IL-34 par les lymphocytes Tregs naturels et induits, avec ou sans blocage de l'IFN γ .

2. *L'IL-34 permet de prolonger la survie de l'allogreffe cardiaque chez le rat*

Etant donné que la protéine IL-34 soluble, produite par transduction de cellules HEK293T par un vecteur AAV recombinant, est suffisante pour inhiber la réponse T allogénique *in vitro*, l'efficacité du vecteur dans la prévention du rejet de l'allogreffe cardiaque a été testée *in vivo*.

L'expression de la protéine à partir de l'AAV est effective *in vivo*, car le sérum des rats traités par 1.10^{12} vg/rat d'AAVIL-34 inhibe la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ en réponse aux pDC allogéniques, vs le sérum de rats naïfs et de rats traités par l'AdCD40Ig.

L'infection des receveurs par 1.10^{12} vg/rat ($6,66.10^{12}$ vg/kg) d'AAVIL-34 30 jours avant la greffe induit une prolongation de la survie de l'allogreffe avec une médiane de 27,5 jours vs 15 jours pour les rats traités par l'AAVGFP, allant jusqu'à 88 jours. **Il semble donc que la protéine IL-34 intervienne dans la prévention du rejet aigu d'allogreffe**, en accord avec la cinétique d'expression du transcrit IL-34 observée dans le greffon des rats traités par AdCD40Ig (Figure 31 n°1). Le traitement par l'AAVIL-34 n'a cependant pas permis d'empêcher le rejet chronique. On détecte notamment une forte quantité d'anticorps anti-donneur dans le sérum des rats traités par l'AAVIL-34, quelle que soient la dose administrée et la survie du greffon, principalement de type IgG1, et une fibrose généralisée dans tout le greffon.

Comme évoquée précédemment, la médiane de survie de l'allogreffe est comparable à celle du traitement par l'AAVFGL2 pour une dose deux fois moindre. Le traitement par une dose inférieure d'AAVIL-34 ($4,5.10^{10}$ vg/rat soit $3,0.10^{11}$ vg/kg) est insuffisant pour affecter le rejet. Une dose deux fois supérieure (2.10^{12} vg/rat ($1,3.10^{13}$ vg/kg) n'a pas amélioré la survie de l'allogreffe, mais de façon inattendue, a anihilé la protection observée pour une dose de 1.10^{12} vg/rat. L'augmentation de la dose d'AAV recombinant peut stimuler la réponse immune contre le vecteur et le produit du transgène.

3. *L'association du traitement par l'AAVIL-34 à un immunosuppresseur*

L'association du traitement par l'AAVIL-34 à des doses sous-optimales d'immunosuppresseurs pourrait aider à établir une tolérance périphérique. La rapamycine semble être un bon candidat.

La rapamycine est un inhibiteur de la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin). Elle peut aider à induire des cellules suppressives. Par exemple, la rapamycine aide les lymphocytes Tregs à prolonger la survie de l'allogreffe cardiaque chez la souris,

contrairement au tacrolimus ou à la ciclosporine A (A. Ma et al. 2009). Elle favorise l'expansion des lymphocytes Tregs naturels du primate non humain (Singh, Horvath, et Mohiuddin 2009) et humains (Battaglia, Stabilini, Migliavacca, Horejs-Hoeck, et al. 2006), et inhibe l'expansion des lymphocytes T non-régulateurs plus sensibles à l'apoptose (Game, Hernandez-Fuentes, et Lechler 2005)(Strauss et al. 2007)(Keever-Taylor et al. 2007). Des études montrent que la rapamycine n'a pas d'effet sur l'expression de Foxp3 contrairement aux inhibiteurs de la calcineurine (cyclosporine et au tacrolimus) (Baan et al. 2005), mais ne l'induit pas non plus dans une culture de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Keever-Taylor et al. 2007). D'autre part, la rapamycine associée à l'IL-10, induit la génération de lymphocytes régulateurs Tr1 permettant la tolérance infectieuse à la greffe d'îlots pancréatiques chez la souris diabétique (Battaglia, Stabilini, Migliavacca, Horejs-Hoeck, et al. 2006) (Valmori et al. 2006). Elle pourrait aussi agir via les DC, qui, après un avoir été traitées par la rapamycine, induisent la survie infinie d'une allogreffe cardiaque via les lymphocytes Tregs CD4⁺Foxp3⁺ (Turnquist et al. 2007). De plus, la rapamycine agit sur la sécrétion de cytokines. Elle réduit la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Game, Hernandez-Fuentes, et Lechler 2005), et augmente la production de TGF β (Dodge et al. 2000). La rapamycine agit aussi sur la réponse humorale en inhibant la production d'IgM et d'IgG par les lymphocytes B pré-activés en réponse à l'IL-2/6 (Hornung et al. 1993), et en inhibant la prolifération, la différenciation IgM^{hi}/IgD^{low}, et la prévention de l'apoptose des lymphocytes B spléniques induits par anti-CD40 (Sakata et al. 1999), et plus efficacement que le tacrolimus ou la ciclosporine A (Sebastiaan Heidt et al. 2008).

La rapamycine pourrait ainsi aider au développement d'une population tolérogène induite par le traitement par l'AAVIL-34, et nous permettrait de mieux définir les mécanismes d'action et molécules responsables de la prolongation de la survie du greffon induite par l'IL-34.

4. Mécanismes d'action de l'IL-34

- L'effet supprimeur de l'IL-34 implique le CD115

Le récepteur identifié d'IL-34 est le CD115 (Haishan Lin et al. 2008; Garceau et al. 2010). Il est exprimé par les pDC matures (MacDonald et al. 2005; Fancke et al. 2008) ou par les précurseurs myéloïdes. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression du CD115 par les pDC purifiées de rats naifs utilisées comme cellules stimulatrices dans les cocultures. Il est cependant possible que la sensibilité de la technique de détection soit insuffisante, alors qu'une faible expression du récepteur suffit à induire une réponse (Takashima et al.

1995)(Tagoh et al. 2002). En effet, **le blocage du CD115 abroge une partie de la suppression induite par les Tregs** confortant l'expression du CD115 par les pDC et l'implication de l'IL-34 dans la suppression induite par les Tregs (Figure 31 n°4). Toutefois, nous avons montré que la protéine M-CSF est suffisante pour inhiber la réponse T *in vitro*, contrairement aux conclusions de Sakurai (Sakurai et al. 1996) (Sakurai et al. 1998). Le M-CSF pourrait donc être responsable d'une partie de la suppression induite via le CD115. Cependant **l'ajout d'anticorps bloquant le M-CSF jusqu'à 30µg/ml n'affecte pas la suppression** exercée par les Tregs en coculture (Figure 31 n°4). L'ensemble de ces résultats suggère une suppression par les Tregs via l'IL-34 et sa liaison au récepteur CD115.

Des outils sont disponibles pour confirmer *in vivo* l'implication du CD115, par abrogation de la prolongation de la survie du greffon induite par l'AAVIL-34 par des anticorps, par un inhibiteur spécifique tel que le GW2580 (Eda et al. 2010; Conway et al. 2005) ou par un récepteur soluble (Strockbine et al. 1998). D'autre part, une étude montre que l'acide aminé Q81 est important pour la liaison de l'IL-34 au récepteur (S. Wei et al. 2010). Une alternative serait de générer un vecteur viral recombinant pour l'IL-34 délété de cet acide aminé afin d'étudier l'importance de la liaison de l'IL-34 au CD115 dans la protection de l'allogreffe (Figure 31 n°5). Le maintien de la survie du greffon malgré l'inhibition de la voie IL-34/CD115 suggérerait l'existence d'un second récepteur à l'IL-34 (Figure 31 n°6).

D'après les expériences de coculture, le blocage du CD115 est moins efficace que le blocage de l'IL-34 pour abroger la suppression induite par les Tregs. Cette différence pourrait s'expliquer par l'implication d'un second récepteur à l'IL-34 (Figure 21 et Figure 31 n°6). La présence de défauts chez des animaux IL-34^{-/-} non observés chez des animaux CD115^{-/-} témoignerait d'un second récepteur à l'IL-34. Cependant, l'analyse réalisée par Wang et al. chez la souris IL-34^{-/-} ne permet pas de répondre à cette question, les défauts présentés par la souris IL-34^{-/-} étant retrouvés chez les souris CD115^{-/-} (Yaming Wang et al. 2012).

➤ L'IL-34 induit-elle des cellules régulatrices ?

La liaison du M-CSF au récepteur favorise la prolifération et l'infiltration des macrophages dans le greffon, entraînant le rejet d'allogreffe rénale (Jose et al. 2003). L'affinité de l'IL-34 pour le CD115 est moindre que celle du M-CSF, cependant l'interaction IL-34/CD115 est plus stable (Xiaolei Ma et al. 2012)(Heli Liu et al. 2012). **Chez les rats traités par l'AAVIL-34, l'excès d'IL-34 pourrait entrer en compétition avec le M-CSF pour sa liaison au récepteur, et induire une signalisation différente.** Les macrophages sont particulièrement

connus pour leur grande plasticité. Chihara a montré que l'IL-34 et le M-CSF induisent des macrophages de morphologies différentes (Chihara et al. 2010). De façon intéressante, nous avons aussi observé **une augmentation de la population CD11b/c⁺ dans la rate du rat traité par l'AAVIL-34 présentant une prolongation de survie de l'allogreffe significative vs les rats naïfs** (Figure 31 n°8). Les animaux traités par l'AAVIL-34 rejetant l'allogreffe de façon précoce présentent une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ caractéristique du rejet mais aucun changement significatif concernant les populations CD11b/c⁺. Ce résultat est en accord avec ceux de Chen qui a observé une augmentation du nombre de cellules CD11b⁺ chez les souris injectées en systémique avec la protéine IL-34 (Zhi Chen et al. 2011). Le CD11b est un marqueur des cellules myéloïdes, exprimé notamment par les cDC CD4⁺ et CD4⁻ (Francois-Xavier Hubert et al. 2004; Shortman & Naik 2007), les macrophages, mais aussi par les lymphocytes B mémoires (K. Kawai et al. 2005; Rhein et al. 2010) et des lymphocytes T. Une expérience préliminaire montre qu'**une large proportion de cellules infiltrant le greffon du rat dont la survie est prolongée sont CD11b/c⁺**. Ces cellules CD11b/c⁺ pourraient être impliquées dans la protection du greffon. Il serait donc intéressant d'étudier le potentiel tolérogène des cellules CD11b⁺ et la capacité de l'IL-34 à dévier les macrophages vers un profil régulateur AAM (Figure 31 n°7). Il pourrait aussi être intéressant de quantifier la population CD11b⁺ parmi les splénocytes des rats traités par AdCD40Ig vs les rats naïfs, chez lesquels l'IL-34 est surexprimée par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, mais certes en moindre quantité que les rats traités par l'AAVIL-34.

Commentaire [b5]: Trop avancé ?

Un premier transfert adoptif des splénocytes du rat IL-34 J88 n'a pas permis de transmettre la survie long terme de l'allogreffe aux rats naïfs irradiés. Ce résultat n'est que préliminaire et l'expérience nécessite d'être réitérée. D'autre part, nous analyserons les mécanismes de régulation chez les rats traités par AAVIL-34 combiné à un traitement par la rapamycine à une dose sous-optimale.

- L'IL-34 interagit-elle avec d'autres molécules immunorégulatrices?

IL-34 pourrait réguler positivement l'expression de la molécule suppressive HO-1 (Figure 31 n°9). En effet, l'injection de la protéine IL-34 dans le cerveau induit l'augmentation de l'expression de l'enzyme de dégradation de l'amyloïde- β oligomérique et augmente l'expression de HO-1 par les cellules de la microglie (macrophages-like), permettant la diminution du stress oxydatif et une meilleure survie des neurones (Mizuno et al. 2011). Or, les propriétés suppressives de HO-1 ont largement été décrites (M P Soares et al. 2001)(Otterbein et al. 2003). Notamment, le traitement par un AdHO-1 prolonge la survie

de l'allogreffe cardiaque d'un rat de souche Lewis 1W chez le rat Lewis 1A (C Braudeau et al. 2004). D'autre part, l'infection du receveur par un AAVHO-1 prolonge la survie de l'allogreffe hépatique chez le rat, réduit l'infiltration du greffon par les lymphocytes T effecteurs et augmente celle des Tregs (L. Sun et al. 2011). L'expression de HO-1 par les DC inhibe leur maturation et la réponse proinflammatoire (Christine Chauveau et al. 2005) et est importante pour la fonction régulatrice des lymphocytes T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (James F George et al. 2008). Dans notre modèle AdCD40Ig, HO-1 est surexprimée sur le lieu de l'inflammation, à savoir dans le greffon, tel un mécanisme effecteur des Tregs (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). L'implication de HO-1 dans la fonction suppressive des Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$, comme celle de IDO, reste à explorer. D'autre part, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'IL-34 sur l'expression de HO-1 par les CPA, notamment par les cellules $CD11b^+$ (Zhi Chen et al. 2011). D'ailleurs, l'AAV de serotype 2/8 permet une expression efficace de la GFP dans le cerveau (Taymans et al. 2007). L'inhibition du stress oxydatif dans un modèle d'inflammation (Alzheimer) et l'augmentation de l'expression HO-1 (impliqué dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les cellules souches neurales de rat) (Bonnamain et al. 2012), par IL-34 pourrait être bénéfique en transplantation intracérébrale.

De même, **l'IL-34 régule positivement le TGF β** dans le cerveau (D. Ma et al. 2012). Néanmoins, alors que l'expression du TGF β par les lymphocytes T $CD8^+CD45RC^{low}$ spléniques des rats traités par AdCD40Ig est augmentée vs les Tregs naturels, les tests réalisés par l'équipe excluent un rôle du TGF β dans la prévention des réponses immunes contre le greffon par les Tregs (X. L. Li et al. 2010). De plus, contrairement aux molécules jusqu'alors démontrées comme impliquées dans la protection du greffon par les Tregs, le TGF β n'est pas surexprimé dans l'allogreffe des rats traités par AdCD40Ig (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Le TGF β ne semble donc pas induit en réponse à l'IL-34 sécrété par les Tregs. Toutefois, la quantité d'IL-34 produite par les Tregs est très inférieure à celle induite par l'AAV recombinant. Il est donc plus probable d'observer une augmentation de l'expression du TGF β dans le greffon des rats traités par l'AAVIL-34. Dans ce cas, son implication dans la suppression exercée par l'IL-34 devra être étudiée.

Dans le modèle AdCD40Ig, une boucle de régulation positive IL-34 /CD115/M-CSF est probable. Il est montré que l'IL-34 diminue l'expression du récepteur (Chihara et al. 2010),

que la déficience en CD115 augmente le M-CSF circulant (X.-M. Dai et al. 2002), et que le M-CSF régulerait positivement l'expression de l'IL-34 (S. Wei et al. 2010) (Figure 31 n°10).

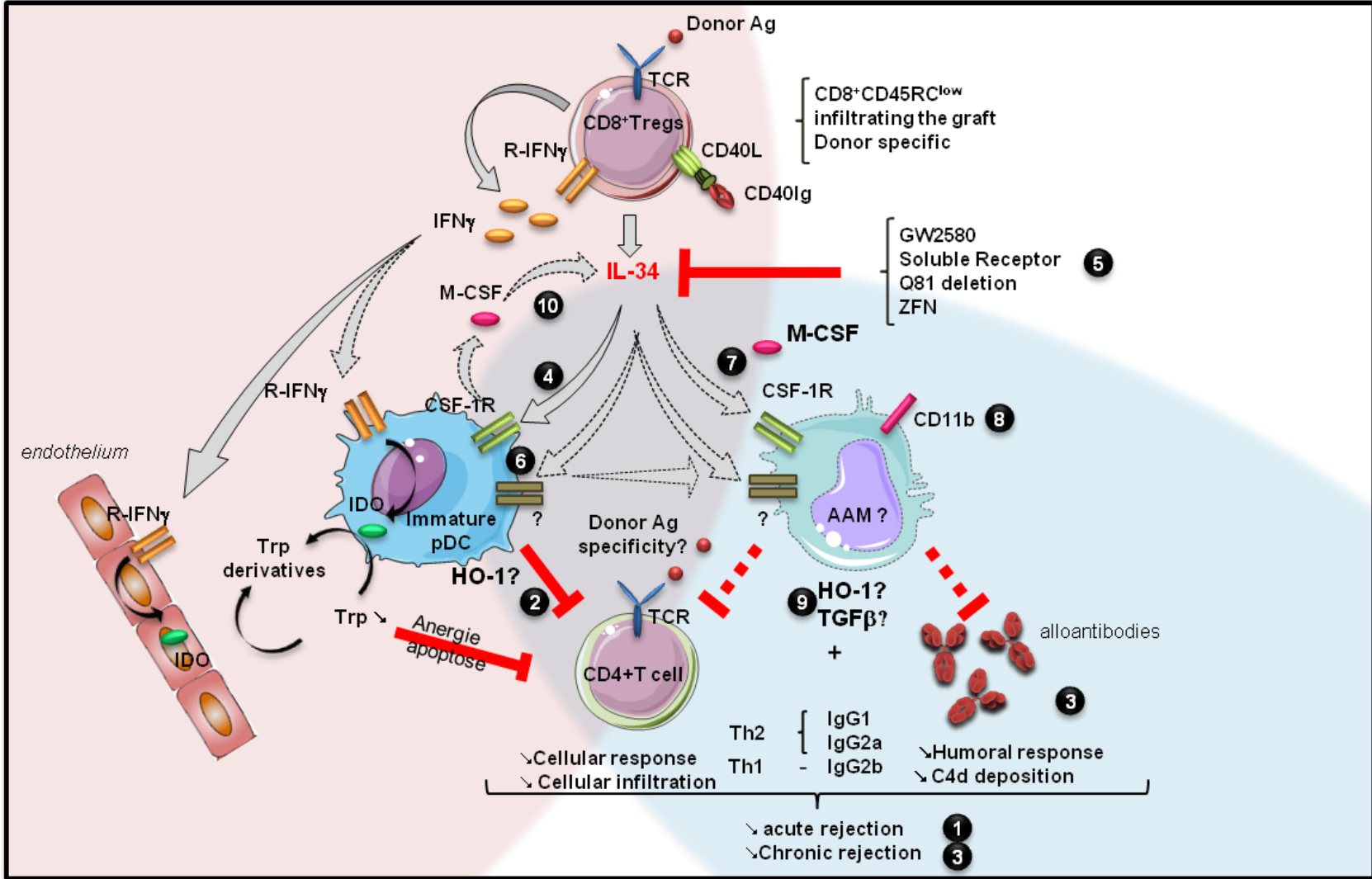
L'interaction de l'IL-34 avec l'IFN γ n'a pas encore été décrite, il est prévu d'analyser l'expression de l'IL-34 par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en fonction du blocage de l'IFN γ en coculture. De même, sa relation avec IDO pourra être évaluée.

5. Génération d'un nouveau modèle d'étude : les rats IL34^{-/-}

La génération de rats IL-34^{-/-} par la méthode des ZFN (Zinc Finger Nucleases) est en cours de développement. Cette méthode repose sur la reconnaissance spécifique d'une séquence ADN cible par une chaîne de protéine "zinc finger" et son clivage par le domaine nucléase de FokI (Geurts et al. 2010). Le processus de réparation NHEJ (non-homologous end joining) résulte en la délétion du gène. La caractérisation phénotypique des rats IL-34^{-/-}, par comparaison aux phénotypes des rats tl/tl, des souris CD115^{-/-} et des souris op/op, permettra de **confirmer l'interaction de l'IL-34 avec ce récepteur, l'exclusivité de l'IL-34 envers le récepteur ou, au contraire, la mise en évidence d'un second récepteur, et les fonctions propres de l'IL-34 qui ne peuvent être restaurées par le M-CSF**. L'importance de l'IL-34 dans la prolongation de survie de l'allogreffe induite par le traitement AdCD40Ig, dans la génération et la fonction suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, et dans d'autres modèles de tolérance pourra être étudiée.

Figure 31. Hypothèse des mécanismes impliquant l'IL-34.

1. L'IL-34 a un rôle dans la prévention du rejet aigu de l'allogreffe dans les modèles AdCD40Ig et AAVIL-34
2. L'IL-34 peut inhiber la réponse des lymphocytes T CD4⁺ aux pDC allogéniques
3. L'association du traitement par AAVIL-34 a un immunosuppresseur pourrait permettre de diminuer le rejet chronique
4. Le CD115, exprimé par les pDC, est impliqué dans la suppression induite par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, alors que le M-CSF n'est pas surexprimé par les Tregs.
5. L'importance de la liaison IL-34/CD115 peut être mise en évidence par des inhibiteurs, compétiteurs, ou par modification biochimique de l'IL-34.
6. L'existence d'un second récepteur à l'IL-34 est envisagée.
7. L'IL-34 pourrait induire des macrophages régulateurs (AAM).
8. L'IL-34 pourrait induire une population régulatrice CD11b⁺.
9. L'IL-34 pourrait agir via l'induction de HO-1 ou TGFβ.
10. La liaison de l'IL-34 au CD115 induit son internalisation et l'augmentation de M-CSF circulant, régulant possiblement et positivement l'expression de l'IL-34.



CONCLUSION/ PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} en étudiant les propriétés immunorégulatrices de deux molécules, FGL2 et IL-34, dans les réponses immunes contre le greffon. Ce travail a également permis de mettre en évidence une nouvelle population régulatrice lymphocytaire B chez le rat, capable de transférer la tolérance de manière itérative.

L'IFN γ est une molécule clé du modèle AdCD40Ig (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007)(X. L. Li et al. 2010). Toutefois, la protéine IFN γ seule ne supprime pas la réponse T allogénique *in vitro* (X. L. Li et al. 2010). Ceci suggère **l'implication de l'IFN γ dans la fonction suppressive des Tregs, non pas en tant qu'effecteur, mais en tant que stimulateur de leur potentiel tolérogène par l'expression de molécules suppressives.** Dans un autre modèle de tolérance par blocage de la voie CD137, la suppression par une population de CD8⁺Tregs est dépendante de l'IFN γ , alors que la protéine IFN γ elle-même est incapable de suppression (Myers et al. 2005). L'IFN- γ exercerait une suppression indirecte via l'induction de l'expression de la molécule suppressive TGF β (Myers et al. 2005). Bien que le TGF β soit surexprimé par les lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} des rats traités par AdCD40Ig vs naïfs (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007), et corrèle avec l'expression de FGL2 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe hépatique spontanée (L. Xie et al. 2012) et par les lymphocytes T CD8⁺ $\alpha\alpha$ (Denning et al. 2007), il ne semble pas impliqué de façon directe dans la fonction suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (Emmanuel Xystrakis, Cavailles, et al. 2004) (X. L. Li et al. 2010). En effet, le blocage du TGF β par des anticorps n'altère pas la suppression induite par les Tregs, ni *in vitro*, ni *in vivo* (X. L. Li et al. 2010). En revanche, Guillonnet a montré l'induction de l'expression deIDO dans les cellules endothéliales en réponse à l'IFN- γ produit par les Tregs (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). L'IDO est une enzyme impliquée dans la voie de dégradation du tryptophane et est suffisante pour prévenir du rejet aigu d'allogreffe chez le rat (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007). Les DC tolérogènes peuvent exprimer la moléculeIDO, suite à l'interaction avec une cellule Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Andrew L Mellor & David H Munn 2004), dépendamment du TGF et des IFN du microenvironnement (Maria L Belladonna et al. 2009). Cependant, dans notre modèle,IDO est impliquée dans la suppression induite par les Tregs, uniquement en absence de contact Tregs/Teffecteurs, alors que la suppression dépendante de l'IFN γ nécessite un contact (X. L. Li et al. 2010). L'altération des mécanismes de suppression en fonction du contact des Tregs CD4⁺CD25⁺ avec les lymphocytes T conventionnels CD4⁺ avait

Commentaire [b6]: Pas précisé dans l'article ?

déjà été montrée (Collison et al. 2009). Ainsi, l'IDO n'est pas induite dans les DC en réponse à l'IFN γ , les mécanismes de suppression par l'IFN γ *in vitro* dépendent d'une autre molécule. Comme nous l'avons montré dans cette thèse, l'expression de FGL2 par les lymphocytes Tregs des rats traités par AdCD40Ig est régulée par l'IFN γ . La capacité de FGL2 à inhiber la réponse T et son importance dans la suppression par les Tregs expliquent le mécanisme d'action de l'IFN γ *in vitro*.

L'étude des lymphocytes Tregs a permis de mettre en évidence les capacités immunorégulatrices de l'IL-34 pour la première fois. Ses mécanismes de suppression et la régulation de son expression sont encore peu connus. La génération de rats IL-34^{-/-} permettra d'approfondir l'implication de l'IL-34 dans la tolérance à l'allogreffe. L'inhibition de 80% de l'expression de l'IL-34 par des shRNA chez la souris adulte (Nakamichi et al. 2012) et la délétion du gène par Wang et al. chez la souris montrent que l'extinction de l'expression de l'IL-34 n'est pas létale (Yaming Wang et al. 2012). De plus, les souris sont fertiles, et n'ont pas de complications ostéopérotiques. Bien que des souris FGL2^{-/-} ont d'ores et déjà permis l'étude de l'implication de la molécule dans la prévention du rejet d'allogreffe, la génération de rats FGL2^{-/-} est envisagée.

La stratégie du transfert de gène permet l'analyse des effets de la surexpression de molécules immunorégulatrices sur la balance rejet/tolérance et des effets potentiellement délétères de ces molécules sur l'organisme. Malgré un rejet chronique subsistant, les traitements appliqués par l'AAVFGL2 et l'AAVIL-34 ont permis de protéger du rejet aigu le greffon. Afin de comparer l'efficacité des différents traitements dans la protection du greffon, les critères majeurs observés dans chacun des modèles sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 11).

modèle	survie	médiane de survie	rejet chronique	taux d'anticorps anti donneur	tolérance transférable	spécificité du donneur
AdCD40Ig	93% >120 jours	indéfinie	+++	+	oui/ LT CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	
Transfert adoptif de Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	100% >120 jours	indéfinie	++	+	oui/itératif	oui
AAVFGL2 im	40% >80 jours	18,5 vs 11	+++	++	oui/ LBregs	
AAVFGL2 iv	7% >200 jours	31 vs 15				
Transfert adoptif de splénocytes FGL2	85% >120 jours	indéfinie vs 7	++	+	oui/itératif	oui
Transfert adoptif de Bregs FGL2	66% >120 jours	indéfinie vs 29				
AAVIL-34	≤88jours	27,5 vs 15	+++	+++	?	

Tableau 11. Bilan des différents modèles testés durant cette thèse

Les voies de signalisation des récepteurs identifiés de FGL2 et IL-34, FcγRIIB et le CD115 respectivement, restent à caractériser. Alors que la liaison de FGL2 au FcγRIIB n'induit pas les mécanismes d'apoptose et d'inhibition de maturation dans les lymphocytes B et les DC décrits chez la souris par l'équipe du Dr Levy, des doutes subsistent quant à l'exclusivité de l'IL-34 pour le CD115. Des stratégies d'inhibition ou de blocage de ces récepteurs sont envisagées.

Le modèle CD40Ig est probablement plus complexe. Dans les modèles de traitement par AAVFGL2 ou AAVIL-34, nous avons observé l'établissement d'une population de lymphocytes Bregs et une augmentation de la population CD11b⁺ respectivement. Or, le CD11b est aussi exprimé par les lymphocytes B mémoires (K. Kawai et al. 2005; Rhein et al. 2010), et le FcγRIIB par les macrophages CD11b⁺. Les deux molécules pourraient donc agir à la fois sur les lymphocytes B et sur les macrophages. De plus, les deux molécules FGL2 et IL-34 pourraient agir en synergie via les pDC. L'association des deux molécules par double traitement pour améliorer la survie du greffon est envisageable.

Commentaire [b7]: Trop hypothétique ?

La validation des propriétés suppressives des molécules FGL2 et IL-34 dans d'autres modèles animaux est nécessaire. Un intérêt particulier sera porté à l'implication de la molécule FGL2 dans le modèle de tolérance à l'allogreffe induit par le traitement par le LF15-0195 via des lymphocytes Bregs. Le LF15-0195 permet de bloquer la maturation des DC (Jinming Yang et al. 2003), induit l'expansion de lymphocytes Tregs (Elise Chiffolleau et al.

2002), et la génération de lymphocytes Bregs (L. Le Texier et al. 2011). Bien que phénotypiquement immatures, la forte expression du Fc γ RIIB par les Bregs suggère une susceptibilité accrue à FGL2. Par ailleurs, l'étude de ces molécules chez les patients greffés rénaux opérationnellement tolérants vs en rejet chronique est possible par collaboration avec l'équipe de Sophie Brouard au laboratoire. Il serait en effet intéressant d'analyser l'expression de FGL2 chez les patients transplantés dont la tolérance opérationnelle corrèle avec l'augmentation du nombre de lymphocytes B (Annaick Pallier et al. 2010). Nous pourrions aussi conforter le rôle de ces molécules dans la prévention du rejet dans des modèles d'allogreffe de peau chez la souris, et de rein chez le rat puis chez le primate non humain.

D'autres molécules potentiellement immunosuppressives valent d'être étudiées. Notamment, la molécule **Klrg1** (*killer cell lectin-like receptor G1*) dont l'expression est augmentée par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} des rats traités par AdCD40Ig vs naïfs, et corrèle avec la surexpression de FGL2 dans un modèle de tolérance à l'allogreffe cardiaque chez le murin traité par la rapamycine et à l'allogreffe hépatique spontanée (L. Xie et al. 2012). D'autres molécules sont prometteuses, notamment la Butyrophiline **BTN**, ou le **CD137L**.

Ces molécules sont plus susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs en transplantation afin d'adapter les traitements immunosuppresseurs des patients, ainsi que dans le cas de maladies auto-immunes, que d'être utilisées pour une application clinique.

En conclusion, le schéma bilan suivant met en évidence les différents mécanismes d'action des Tregs aujourd'hui identifiés et le potentiel immunorégulateur de FGL2 et IL34 en transplantation.

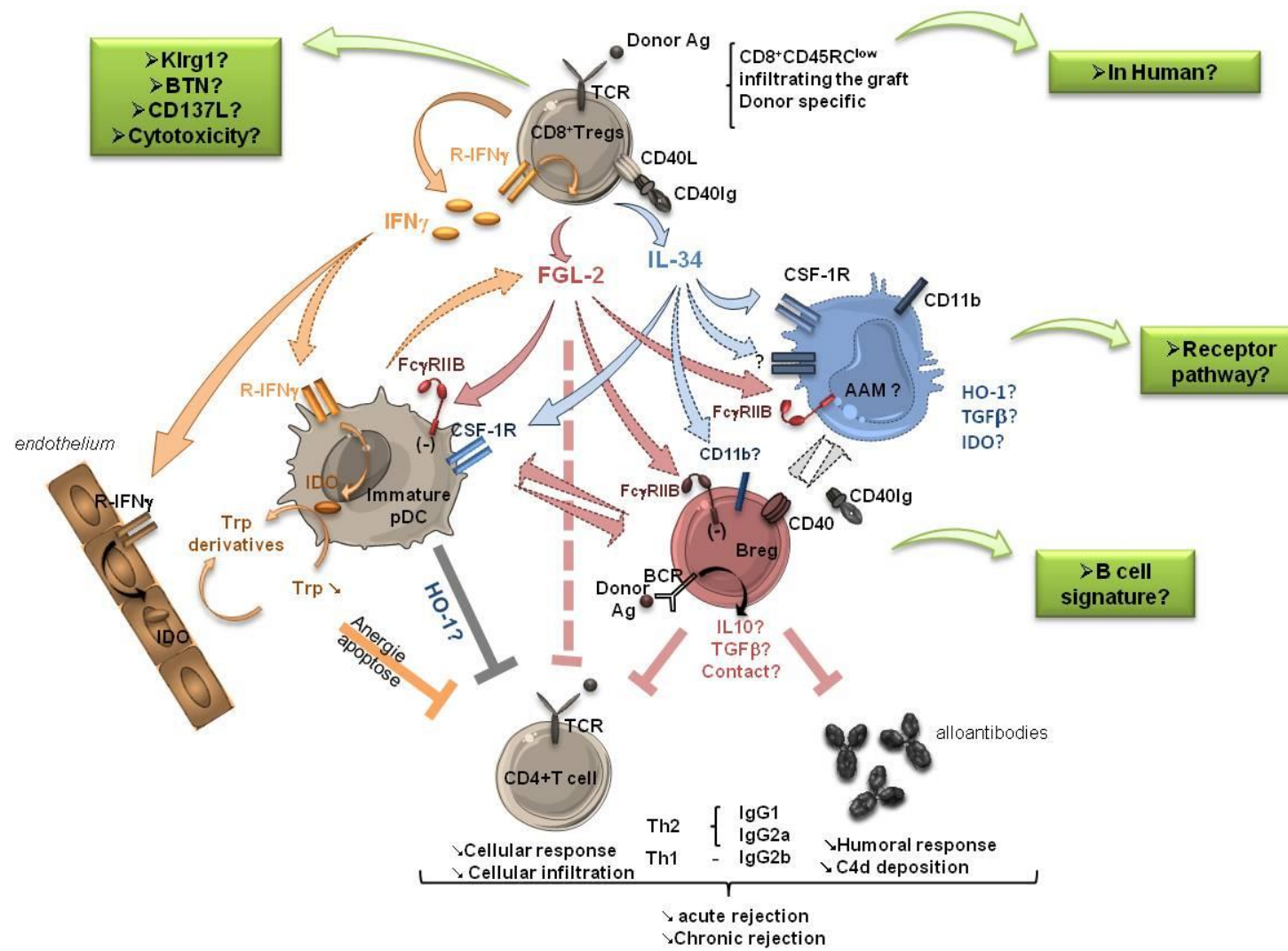


Figure 32. Schéma bilan des mécanismes d'action des lymphocytes Tregs CD8⁺CD45RC^{low} mis en évidence jusqu'à ce jour.

En orange : Voie dépendante de l'IFN γ et de IDO. La sécrétion d'IFN γ par les Tregs induit l'expression de IDO par les cellules endothéliales du greffon et pourrait induire l'expression de IDO par les pDC in vivo (Guillonnet, Marcelo Hill, et al. 2007).

En rouge : Voie dépendante de FGL2. L'expression de FGL2 par les Tregs tend à être augmentée par l'IFN γ et diminuée par IDO. FGL2 inhibe la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ dirigés contre les cellules du donneur par l'induction d'un signal inhibiteur dans les pDC via le Fc γ RIIB. FGL2 pourrait agir directement sur les lymphocytes T CD4⁺, par l'induction de Bregs Fc γ RIIB⁺, ou sur les cellules CD11b⁺ Fc γ RIIB⁺ afin de contenir la réponse contre le greffon. Des interactions Bregs/pDC sont possibles (Bézie, en révision).

En bleu : Voie dépendante de l'IL-34. L'expression de l'IL-34 par les Tregs inhibe la réponse des lymphocytes T CD4⁺ aux pDC allogéniques via le CD115. L'IL-34 pourrait aussi agir sur les cellules CD11b⁺ de type macrophages AAM, ou sur les lymphocytes B CD11b⁺ mémoires, et augmenter l'expression de HO-1, TGF β ou IDO. La liaison de l'IL-34 à un second récepteur reste à définir (Bézie, en préparation).

En vert : Perspectives. Plusieurs molécules ont déjà été écartées de la fonction suppressive des Tregs. La BTN, le Klr1, le CD137L ou encore la capacité de cytotoxicité des Tregs restent à définir. La caractérisation des Tregs par l'étude des cellules humaines est en cours. La caractérisation des Bregs induits par FGL2 reste à définir.

BIBLIOGRAPHIE

-
- Adams, A.B. et al., 2005. Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(1), p.542-550.
- Albert, M L, Jegathesan, M. & Darnell, R.B., 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature immunology*, 2(11), p.1010-1017.
- Albert, M L, Sauter, B. & Bhardwaj, N., 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392(6671), p.86-89.
- De Albuquerque, N. et al., 2006. Murine hepatitis virus strain 1 produces a clinically relevant model of severe acute respiratory syndrome in A/J mice. *Journal of virology*, 80(21), p.10382-10394.
- Alexander, R.J. et al., 1995. Expression of growth factor receptor-encoded mRNA by colonic epithelial cells is altered in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, 40(3), p.485-494.
- Alexander-Miller, M.A. et al., 1996. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), p.485-492.
- Allen, C.D.C. et al., 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5811), p.528-531.
- Amarnath, S. et al., 2011. Host-based Th2 cell therapy for prolongation of cardiac allograft viability. *PloS one*, 6(4), p.e18885.
- Amu, S. et al., 2010. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(5), p.1114-1124.e8.
- Anderson, C.L. et al., 1990. Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *The Journal of experimental medicine*, 171(4), p.1333-1345.
- Anderson, G., Partington, K.M. & Jenkinson, E.J., 1998. Differential effects of peptide diversity and stromal cell type in positive and negative selection in the thymus. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(12), p.6599-6603.
- Anderson, M.S. et al., 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5597), p.1395-1401.
- Andersson, J. et al., 2008. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *The Journal of experimental medicine*, 205(9), p.1975-1981.
- André, P. et al., 2002. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nature medicine*, 8(3), p.247-252.
- Angin, M. et al., 2012. Gene transfer of human CD40Ig does not prevent rejection in a non-human primate kidney allotransplantation model. *Transplant immunology*.
- Anon, 1997. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nature genetics*, 17(4), p.399-403.
-

-
- Antoine, C., 2008. [Transplantation strategies in immunized and hyperimmunized patients]. *Néphrologie & thérapeutique*, 4 Suppl 3, p.S174-178.
- Arslan, F. et al., 2010. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators of inflammation*, 2010, p.704202.
- Aschenbrenner, K. et al., 2007. Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature immunology*, 8(4), p.351-358.
- Ashton-Chess, Joanna et al., 2007. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation*, 84(10), p.1215-1219.
- Asselin-Paturel, C. et al., 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology*, 2(12), p.1144-1150.
- Auchincloss, H., Jr et al., 1993. The role of « indirect » recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), p.3373-3377.
- Baan, C.C. et al., 2005. Differential effect of calcineurin inhibitors, anti-CD25 antibodies and rapamycin on the induction of FOXP3 in human T cells. *Transplantation*, 80(1), p.110-117.
- Baeten, D. et al., 2006. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(1), p.294-304.
- Baiu, D.C. et al., 1999. Modulation of the humoral immune response by antibody-mediated antigen targeting to complement receptors and Fc receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(6), p.3125-3130.
- Baker, A.H. et al., 1993. Expression of the colony-stimulating factor 1 receptor in B lymphocytes. *Oncogene*, 8(2), p.371-378.
- Baldwin, William M, 3rd et al., 2004. Antithymocyte globulin is associated with complement deposition in cardiac transplant biopsies. *Human immunology*, 65(11), p.1273-1280.
- Banchereau, J & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), p.245-252.
- Bankovich, A.J. et al., 2007. Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5822), p.291-294.
- Baratin, M., Bonin, K. & Daniel, C., 2004. Frontline: Peripheral priming of alloreactive T cells by the direct pathway of allorecognition. *European journal of immunology*, 34(12), p.3305-3314.
- Barendrecht, M.M. et al., 2002. Susceptibility to cyclosporin A-induced autoimmunity: strain differences in relation to autoregulatory T cells. *Journal of autoimmunity*, 18(1), p.39-48.
- Barreda, D.R., Hanington, P.C. & Belosevic, M., 2004. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Developmental and comparative immunology*, 28(5), p.509-554.
-

-
- Barrett, T.B., Shu, G. & Clark, E.A., 1991. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 146(6), p.1722-1729.
- Bartel, G. et al., 2007. Determinants of the complement-fixing ability of recipient presensitization against HLA antigens. *Transplantation*, 83(6), p.727-733.
- Bartlett, A.S.R. et al., 2003. Intra-graft gene and protein expression in rat liver allografts treated with costimulatory blockade alone or in combination with CyA. *The Journal of surgical research*, 115(1), p.1-8.
- Bashuda, H. et al., 2005. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation*, 115(7), p.1896-1902.
- Battaglia, M. et al., 2006. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(12), p.8338-8347.
- Baud'huin, M. et al., 2010. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *The Journal of pathology*, 221(1), p.77-86.
- Beck, A.H. et al., 2009. The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(3), p.778-787.
- Belladonna, Maria L et al., 2009. TGF-beta and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends in molecular medicine*, 15(2), p.41-49.
- Benham, A.M., Sawyer, G.J. & Fabre, J.W., 1995. Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation*, 59(7), p.1028-1032.
- Benichou, G., 1999. Direct and indirect antigen recognition: the pathways to allograft immune rejection. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 4, p.D476-480.
- van den Berg, R.H. et al., 1998. The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(12), p.6924-6930.
- Bestard, O. et al., 2007. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(7), p.4901-4909.
- Beverly, B. et al., 1992. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *International immunology*, 4(6), p.661-671.
- BILLINGHAM, R.E., BRENT, L. & MEDAWAR, P.B., 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172(4379), p.603-606.
- Bindon, C.I. et al., 1988. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *The Journal of experimental medicine*, 168(1), p.127-142.
- Bjorndahl, J.M. et al., 1989. Human T cell activation: differential response to anti-CD28 as compared to anti-CD3 monoclonal antibodies. *European journal of immunology*, 19(5), p.881-887.
-

-
- Blair, P.A. et al., 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 32(1), p.129-140.
- Blair, P.J. et al., 2000. CD40 ligand (CD154) triggers a short-term CD4(+) T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *The Journal of experimental medicine*, 191(4), p.651-660.
- Bolland, S. & Ravetch, J.V., 2000. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*, 13(2), p.277-285.
- Bolling, S.F. et al., 1994. The effect of combination cyclosporine and CTLA4-Ig therapy on cardiac allograft survival. *The Journal of surgical research*, 57(1), p.60-64.
- Bonnemain, V. et al., 2012. Expression of heme oxygenase-1 in neural stem/progenitor cells as a potential mechanism to evade host immune response. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(10), p.2342-2353.
- Borsellino, G. et al., 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), p.1225-1232.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P. & Bousso, P., 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, 13(6), p.829-840.
- Bradley, L.M. et al., 1999. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(5), p.2511-2520.
- Braud, C. et al., 2008. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of cellular biochemistry*, 103(6), p.1681-1692.
- Braudeau, C et al., 2004. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene therapy*, 11(8), p.701-710.
- Braun, M Y et al., 1993. Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation*, 55(1), p.177-182.
- Brauner, R. et al., 1997. Intracoronary adenovirus-mediated transfer of immunosuppressive cytokine genes prolongs allograft survival. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 114(6), p.923-933.
- Brenan, M. & Rees, D.J., 2000. Sequence analysis of rat integrin alphaE1 and alphaE2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph. *European journal of immunology*, 30(6), p.1527-1537.
- Brocker, T, Riedinger, M. & Karjalainen, K., 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 185(3), p.541-550.

- Broichhausen, C. et al., 2012. Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation*, 17(4), p.332-342.
- Brouard, S et al., 2012. The Natural History of Clinical Operational Tolerance After Kidney Transplantation Through Twenty-Seven Cases. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.
- Brouard, Sophie et al., 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), p.15448-15453.
- Buckwalter, M.R. & Albert, Matthew L, 2009. Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Current biology: CB*, 19(9), p.R355-361.
- Budhu, A. et al., 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer cell*, 10(2), p.99-111.
- Buer, J. et al., 1998. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 187(2), p.177-183.
- Bühler, L.H. et al., 2002. Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease. *Transplantation*, 74(10), p.1405-1409.
- Buhlmann, J.E. et al., 1995. In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity*, 2(6), p.645-653.
- Campbell, K.A. et al., 1996. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity*, 4(3), p.283-289.
- Campos, E.F. et al., 2006. Post-transplant anti-HLA class II antibodies as risk factor for late kidney allograft failure. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(10), p.2316-2320.
- Carter, N.A. et al., 2011. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(10), p.5569-5579.
- Carvalho-Gaspar, M. et al., 2008. Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(10), p.6640-6648.
- Caux, C. et al., 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *The Journal of experimental medicine*, 184(2), p.695-706.
- Celli, S., Albert, Matthew L & Bousso, Philippe, 2011. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nature medicine*, 17(6), p.744-749.

-
- Chai, J G et al., 1998. T:T antigen presentation by activated murine CD8+ T cells induces anergy and apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(8), p.3655-3665.
- Chan, C.W.Y. et al., 2002. Kinetic analysis of a unique direct prothrombinase, fgl2, and identification of a serine residue critical for the prothrombinase activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(10), p.5170-5177.
- Chan, C.W.Y. et al., 2003. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibroleukin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(8), p.4036-4044.
- Chang, C.C. et al., 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nature immunology*, 3(3), p.237-243.
- Chang, M.D. et al., 1993. Mouse placental macrophages have a decreased ability to present antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), p.462-466.
- Chaturvedi, V. et al., 2011. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), p.6661-6666.
- Chauveau, Christine et al., 2002. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(7), p.581-592.
- Chauveau, Christine et al., 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*, 106(5), p.1694-1702.
- Chemel, M. et al., 2012. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Annals of the rheumatic diseases*, 71(1), p.150-154.
- Chen, B. et al., 2007. Adeno-associated viral vector-mediated interleukin-10 prolongs allograft survival in a rat kidney transplantation model. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(5), p.1112-1120.
- Chen, D. et al., 2006. CD4+ CD25+ regulatory T-cells inhibit the islet innate immune response and promote islet engraftment. *Diabetes*, 55(4), p.1011-1021.
- Chen, L.C. et al., 2009. Direct expansion of human allospecific FoxP3+CD4+ regulatory T cells with allogeneic B cells for therapeutic application. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(6), p.4094-4102.
- Chen, Xiaoyan et al., 2008. Structure of macrophage colony stimulating factor bound to FMS: diverse signaling assemblies of class III receptor tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), p.18267-18272.
- Chen, Y.-K. et al., 2012. Immunological tolerance of human hepatocyte xenograft induced by adenovirus vector-mediated CTLA4Ig gene transfer. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 11(2), p.148-153.
- Chen, Zhi et al., 2011. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PloS one*, 6(4), p.e18689.
-

-
- Chen, Zongyou et al., 2003. Prolonged survival of heart allografts transduced with AAV-CTLA4lg. *Microsurgery*, 23(5), p.489-493.
- Chiffolleau, Elise et al., 2002. Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(10), p.5058-5069.
- Chihara, T. et al., 2010. IL-34 and M-CSF share the receptor Fms but are not identical in biological activity and signal activation. *Cell death and differentiation*, 17(12), p.1917-1927.
- Chikuma, S. et al., 2009. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(11), p.6682-6689.
- Chitu, V. & Stanley, E Richard, 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion in immunology*, 18(1), p.39-48.
- Choi, B.K. et al., 2006. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine*, 34(5-6), p.233-242.
- Chomarat, P. et al., 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(5), p.2262-2269.
- Chung, J.B. et al., 2003. Incomplete activation of CD4 T cells by antigen-presenting transitional immature B cells: implications for peripheral B and T cell responsiveness. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(4), p.1758-1767.
- Chung, Y. et al., 2011. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine*, 17(8), p.983-988.
- Ciubotariu, R. et al., 2001. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Human immunology*, 62(1), p.15-20.
- Ciubotariu, R. et al., 1998. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(10), p.5193-5202.
- Clark, D A et al., 1998. Cytokine-dependent abortion in CBA x DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase [correction of prothombinase]. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(2), p.545-549.
- Clark, D A et al., 2001. Procoagulants in fetus rejection: the role of the OX-2 (CD200) tolerance signal. *Seminars in immunology*, 13(4), p.255-263.
- Clipstone, N.A. & Crabtree, G.R., 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357(6380), p.695-697.
- Coates, P.T. et al., 2001. Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin-10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice. *Gene therapy*, 8(16), p.1224-1233.
-

- Coenen, J.J.A. et al., 2006. CTLA-4 engagement and regulatory CD4+CD25+ T cells independently control CD8+-mediated responses under costimulation blockade. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(9), p.5240-5246.
- Cole, D.J. et al., 1994. Phase I trial of recombinant human macrophage colony-stimulating factor administered by continuous intravenous infusion in patients with metastatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(1), p.39-45.
- Collins, T. et al., 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(15), p.4917-4921.
- Collison, L.W. et al., 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182(10), p.6121-6128.
- Collison, L.W. et al., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), p.566-569.
- Conway, J.G. et al., 2005. Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), p.16078-16083.
- Coombes, J.L. et al., 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 204(8), p.1757-1764.
- Cowan, P.J. et al., 2002. Protective effects of recombinant human antithrombin III in pig-to-primate renal xenotransplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2(6), p.520-525.
- Crocker, B.P. et al., 1996. Macrophages and chronic renal allograft nephropathy. *Kidney international. Supplement*, 57, p.S42-49.
- Cupp, J.S. et al., 2007. Translocation and expression of CSF1 in pigmented villonodular synovitis, tenosynovial giant cell tumor, rheumatoid arthritis and other reactive synovitides. *The American journal of surgical pathology*, 31(6), p.970-976.
- Cyster, J G, Hartley, S.B. & Goodnow, C C, 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*, 371(6496), p.389-395.
- D'Elia, M.M. et al., 1997. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts. *Kidney international*, 51(6), p.1876-1884.
- Dai, H. et al., 2010. Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(2), p.803-807.
- Dai, X.-M. et al., 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*, 99(1), p.111-120.

-
- Dalmaso, A.P. et al., 1991. Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation*, 52(3), p.530-533.
- David, A. et al., 2000. Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. *Gene therapy*, 7(6), p.505-510.
- DeBruyne, L.A. et al., 1998. Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. *Gene therapy*, 5(8), p.1079-1087.
- Degermann, S. et al., 1994. B7 expression on thymic medullary epithelium correlates with epithelium-mediated deletion of V beta 5+ thymocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(7), p.3254-3263.
- Deng, Shaoping et al., 2007. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6028-6032.
- Denning, T.L. et al., 2007. Mouse TCRalpha+CD8alphaalpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(7), p.4230-4239.
- Desai, D.D. et al., 2007. Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6217-6226.
- Dhein, J. et al., 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature*, 373(6513), p.438-441.
- Dhodapkar, M.V. et al., 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 193(2), p.233-238.
- Ding, J W et al., 1998. Expression of the fgl2 and its protein product (prothrombinase) in tissues during murine hepatitis virus strain-3 (MHV-3) infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 440, p.609-618.
- Ding, Q. et al., 2011. Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 121(9), p.3645-3656.
- Ding, Yanping et al., 2010. Expression and significance of fgl2 prothrombinase in cardiac microvascular endothelial cells of rats with type 2 diabetes. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 30(5), p.575-581.
- Dobbins, D.E. et al., 2002. Mutation of macrophage colony stimulating factor (Csf1) causes osteopetrosis in the tl rat. *Biochemical and biophysical research communications*, 294(5), p.1114-1120.
- Dodge, I.L. et al., 2000. Rapamycin induces transforming growth factor-beta production by lymphocytes. *Transplantation*, 70(7), p.1104-1106.
-

- Doherty, P.C. & Bennink, J.R., 1979. Patterns of virus-immune T-cell responsiveness. Comparison of (H-2k X H-2b) leads to H-2b radiation chimeras and negatively selected H-2b lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 150(5), p.1187-1194.
- Doyle, A.G. et al., 1992. Effect of recombinant human macrophage colony-stimulating factor 1 on immunopathology of experimental brucellosis in mice. *Infection and immunity*, 60(4), p.1465-1472.
- Dubois, B., Massacrier, C. & Caux, C., 2001. Selective attraction of naive and memory B cells by dendritic cells. *Journal of leukocyte biology*, 70(4), p.633-641.
- Duddy, M. et al., 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6092-6099.
- Dudler, J. et al., 2006. Gene transfer of programmed death ligand-1.Ig prolongs cardiac allograft survival. *Transplantation*, 82(12), p.1733-1737.
- Duluc, D. et al., 2007. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood*, 110(13), p.4319-4330.
- Dumoutier, L. et al., 2000. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), p.10144-10149.
- Durie, F.H. et al., 1994. Antibody to the ligand of CD40, gp39, blocks the occurrence of the acute and chronic forms of graft-vs-host disease. *The Journal of clinical investigation*, 94(3), p.1333-1338.
- Durie, F.H. et al., 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5126), p.1328-1330.
- Dzionic, A. et al., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(11), p.6037-6046.
- Eda, H. et al., 2010. Macrophage-colony stimulating factor and interleukin-34 induce chemokines in human whole blood. *Cytokine*, 52(3), p.215-220.
- Edgington, T.S., Curtiss, L.K. & Plow, E.F., 1985. A linkage between the hemostatic and immune systems embodied in the fibrinolytic release of lymphocyte suppressive peptides. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 134(1), p.471-477.
- Endharti, A.T. et al., 2011. CD8+CD122+ regulatory T cells (Tregs) and CD4+ Tregs cooperatively prevent and cure CD4+ cell-induced colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(1), p.41-52.
- Endharti, A.T. et al., 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(11), p.7093-7097.
- Ensminger, S.M. et al., 2000. CD8+ T cells contribute to the development of transplant arteriosclerosis despite CD154 blockade. *Transplantation*, 69(12), p.2609-2612.

-
- Eschbach, C. et al., 2011. Efficient generation of B lymphocytes by recognition of self-antigens. *European journal of immunology*, 41(8), p.2397-2403.
- van Essen, D., Kikutani, H. & Gray, D., 1995. CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function. *Nature*, 378(6557), p.620-623.
- Evans, J.G. et al., 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(12), p.7868-7878.
- Everly, M.J. et al., 2010. Protective immunity remains intact after antibody removal by means of proteasome inhibition. *Transplantation*, 90(12), p.1493-1498.
- Fallarino, F et al., 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation*, 9(10), p.1069-1077.
- Fancke, B. et al., 2008. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood*, 111(1), p.150-159.
- Fangmann, J., Dalchau, R. & Fabre, J.W., 1992. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *The Journal of experimental medicine*, 175(6), p.1521-1529.
- Fanslow, W.C. et al., 1992. Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 149(2), p.655-660.
- Feng, S. et al., 1999. Prolonged xenograft survival of islets infected with small doses of adenovirus expressing CTLA4lg. *Transplantation*, 67(12), p.1607-1613.
- Ferber, I. et al., 1994. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science (New York, N.Y.)*, 263(5147), p.674-676.
- Figura, M. et al., 2009. Blockade of K(ATP) channels reduces endothelial hyperpolarization and leukocyte recruitment upon reperfusion after hypoxia. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(4), p.687-696.
- Fillatreau, S. et al., 2002. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature immunology*, 3(10), p.944-950.
- Fleury, S et al., 2006. Gene transfer of RANTES and MCP-1 chemokine antagonists prolongs cardiac allograft survival. *Gene therapy*, 13(14), p.1104-1109.
- Flores-Romo, L. et al., 1997. CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 185(2), p.341-349.
- Foerster, K. et al., 2010. The novel immunoregulatory molecule FGL2: a potential biomarker for severity of chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 53(4), p.608-615.
- Forman, D. et al., 2002. Viral abrogation of stem cell transplantation tolerance causes graft rejection and host death by different mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(12), p.6047-6056.
-

-
- Förster, I. et al., 1995. Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity*, 2(6), p.573-585.
- Förster, R et al., 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1), p.23-33.
- Fournié, G J et al., 2001. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunological reviews*, 184, p.145-160.
- Fowell, D. & Mason, D., 1993. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *The Journal of experimental medicine*, 177(3), p.627-636.
- Franchimont, D., 2004. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, p.124-137.
- Fu, F. et al., 1996. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation*, 62(5), p.659-665.
- Fuleihan, R. et al., 1994. Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation*, 93(3), p.1315-1320.
- Fung, L S et al., 1991. Monoclonal antibody analysis of a unique macrophage procoagulant activity induced by murine hepatitis virus strain 3 infection. *The Journal of biological chemistry*, 266(3), p.1789-1795.
- Gallegos, A.M. & Bevan, Michael J, 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine*, 200(8), p.1039-1049.
- Game, D.S., Hernandez-Fuentes, M.P. & Lechler, Robert I, 2005. Everolimus and basiliximab permit suppression by human CD4+CD25+ cells in vitro. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(3), p.454-464.
- Gao, S. et al., 2010. Dual interference with novel genes mfgl2 and mTNFR1 ameliorates murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis in BALB/cJ mice. *Human gene therapy*, 21(8), p.969-977.
- Garceau, V. et al., 2010. Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *Journal of leukocyte biology*, 87(5), p.753-764.
- Gauchat, J.F. et al., 1995. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *European journal of immunology*, 25(3), p.863-865.
- Gauld, S.B. et al., 2005. Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nature immunology*, 6(11), p.1160-1167.
-

-
- Gavanescu, I. et al., 2007. Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11), p.4583-4587.
- Geissmann, F. et al., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), p.656-661.
- George, James F et al., 2008. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *The American journal of pathology*, 173(1), p.154-160.
- Gerritse, K. et al., 1996. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(6), p.2499-2504.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), p.723-737.
- Geurts, A.M. et al., 2010. Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 597, p.211-225.
- Ghanekar, A. et al., 2004. Endothelial induction of fgl2 contributes to thrombosis during acute vascular xenograft rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), p.5693-5701.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. & Fleit, H.B., 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *The Journal of biological chemistry*, 269(12), p.8878-8884.
- Gillan, V., Lawrence, R.A. & Devaney, E., 2005. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*. *International immunology*, 17(4), p.373-382.
- Gimmi, C.D. et al., 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14), p.6586-6590.
- Ginhoux, F. et al., 2006. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology*, 7(3), p.265-273.
- Goldrath, A.W. & Bevan, M J, 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 402(6759), p.255-262.
- Gong, N. et al., 2007. Effects of local and systemic viral interleukin-10 gene transfer on corneal allograft survival. *Gene therapy*, 14(6), p.484-490.
- Goodnow, C C et al., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184), p.676-682.
- Goodnow, Christopher C et al., 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology*, 11(8), p.681-688.
- Goswami, R. et al., 2012. STAT6-dependent regulation of Th9 development. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), p.968-975.
-

-
- Gould, D.S. & Auchincloss, H., Jr, 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunology today*, 20(2), p.77-82.
- Graca, L et al., 2000. Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(9), p.4783-4786.
- Graca, Luis, Thompson, S., et al., 2002. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(11), p.5558-5565.
- Graca, Luis, Cobbold, Stephen P & Waldmann, Herman, 2002. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *The Journal of experimental medicine*, 195(12), p.1641-1646.
- Grammer, A.C. et al., 1999. Expression, regulation, and function of B cell-expressed CD154 in germinal centers. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(8), p.4150-4159.
- Grammer, A.C. et al., 1995. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(10), p.4996-5010.
- Gray, M. et al., 2007. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), p.14080-14085.
- Greenwald, R.J. et al., 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*, 14(2), p.145-155.
- Grewal, I.S. & Flavell, R A, 1996. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunology today*, 17(9), p.410-414.
- Grimm, P.C. et al., 2001. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *The New England journal of medicine*, 345(2), p.93-97.
- Grohmann, U et al., 2001. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(1), p.277-283.
- Grohmann, Ursula et al., 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology*, 3(11), p.1097-1101.
- Grossman, W.J. et al., 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*, 21(4), p.589-601.
- Guillonnet, C., Séveno, C., et al., 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(12), p.8164-8171.
- Guillonnet, C., Hill, Marcelo, et al., 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(4), p.1096-1106.
- Guillonnet, C. et al., 2005. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation*, 80(4), p.546-554.

-
- Guillonnet, C. et al., 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(3), p.1619-1629.
- Guillonnet, C., Picarda, E. & Aneon, Ignacio, 2010. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881498> [Consulté août 14, 2012].
- Guillot, C et al., 2000. Tolerance to cardiac allografts via local and systemic mechanisms after adenovirus-mediated CTLA4lg expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(10), p.5258-5268.
- Guillot, Cécile et al., 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(4), p.1600-1609.
- Le Guiner, C. et al., 2007. Immune responses to gene product of inducible promoters. *Current gene therapy*, 7(5), p.334-346.
- Haanstra, K.G. et al., 2005. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts. *Transplantation*, 79(11), p.1623-1626.
- Haanstra, K.G. et al., 2006. No synergy between ATG induction and costimulation blockade induced kidney allograft survival in rhesus monkeys. *Transplantation*, 82(9), p.1194-1201.
- Hall, B M et al., 1985. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. Mediation of specific suppression by T helper/inducer cells. *The Journal of experimental medicine*, 162(5), p.1683-1694.
- Hall, B M, Jelbart, M.E. & Dorsch, S.E., 1984. Suppressor T cells in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. *Transplantation*, 37(6), p.595-600.
- Halloran, Philip F, 2004. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England journal of medicine*, 351(26), p.2715-2729.
- Hamilton, J.A., 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), p.533-544.
- Han, G. et al., 2007. Suppressor role of rat CD8+CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *Journal of neuroimmunology*, 183(1-2), p.81-88.
- Han, Meifang et al., 2008. Hepatitis B virus-induced hFGL2 transcription is dependent on c-Ets-2 and MAPK signal pathway. *The Journal of biological chemistry*, 283(47), p.32715-32729.
- Hancock, W W et al., 1996. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), p.13967-13972.
- Hancock, W.H. et al., 1993. Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation*, 56(3), p.643-650.
-

-
- Hancock, Wayne W et al., 2004. Intact type 1 immunity and immune-associated coagulative responses in mice lacking IFN gamma-inducible fibrinogen-like protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), p.3005-3010.
- Hargreaves, M. & Bell, E.B., 1997. Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC+ « revertant » memory and CD45RC+ naive CD4 T cells. *Immunology*, 91(3), p.323-330.
- Hashimoto, D. et al., 2011. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *The Journal of experimental medicine*, 208(5), p.1069-1082.
- Hayashi, M. et al., 1995. Expression of cytokines and immune mediators during chronic liver allograft rejection. *Transplantation*, 60(12), p.1533-1538.
- Hecker, A. et al., 2009. Expression of interleukin-21, interleukin-21 receptor alpha and related type I cytokines by intravascular graft leukocytes during acute renal allograft rejection. *Immunobiology*, 214(1), p.41-49.
- Heidt, S et al., 2012. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naïve B cells. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(7), p.1784-1792.
- Heidt, Sebastiaan et al., 2008. Effects of immunosuppressive drugs on purified human B cells: evidence supporting the use of MMF and rapamycin. *Transplantation*, 86(9), p.1292-1300.
- Heinemann, F.M. et al., 2007. Immunoglobulin isotype-specific characterization of anti-human leukocyte antigen antibodies eluted from explanted renal allografts. *Human immunology*, 68(6), p.500-506.
- Hemesath, T.J., Marton, L.S. & Stefansson, K., 1994. Inhibition of T cell activation by the extracellular matrix protein tenascin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(11), p.5199-5207.
- Henn, V. et al., 1998. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391(6667), p.591-594.
- Herman, A.E. et al., 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(11), p.1479-1489.
- Hermiston, M.L., Xu, Z. & Weiss, A., 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*, 21, p.107-137.
- Herrera, O.B. et al., 2004. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(8), p.4828-4837.
- Herzog, S. & Jumaa, H., 2012. Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells. *Current opinion in immunology*, 24(2), p.166-172.
- Hill, M et al., 2011. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *American*
-

journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 11(10), p.2036-2045.

- Hofstetter, W. et al., 1992. Detection of transcripts for the receptor for macrophage colony-stimulating factor, c-fms, in murine osteoclasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(20), p.9637-9641.
- Hogquist, K.A. & Bevan, M J, 1996. The nature of the peptide/MHC ligand involved in positive selection. *Seminars in immunology*, 8(2), p.63-68.
- Hollenbaugh, D et al., 1995. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *The Journal of experimental medicine*, 182(1), p.33-40.
- Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A. & Oliver, J., 1988. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *The Journal of experimental medicine*, 167(2), p.262-274.
- Holzknacht, Z.E. et al., 2002. Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection. *Circulation research*, 91(12), p.1135-1141.
- Honey, K, Cobbold, S P & Waldmann, H, 1999. CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(9), p.4805-4810.
- Hornick, P.I. et al., 2000. Significant frequencies of T cells with indirect anti-donor specificity in heart graft recipients with chronic rejection. *Circulation*, 101(20), p.2405-2410.
- Hornung, N. et al., 1993. Responsiveness of preactivated B cells to IL-2 and IL-6. Effect of cyclosporine and rapamycin. *Transplantation*, 56(4), p.985-990.
- Hoves, S. et al., 2006. Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(4), p.2691-2698.
- Hsieh, Y.-H. et al., 2010. Candidate genes associated with susceptibility for SARS-coronavirus. *Bulletin of mathematical biology*, 72(1), p.122-132.
- Hu, B.T. et al., 1997. Telomerase is up-regulated in human germinal center B cells in vivo and can be re-expressed in memory B cells activated in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(3), p.1068-1071.
- Huang, F.P. et al., 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 191(3), p.435-444.
- Huang, J.F. et al., 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5441), p.952-954.
- Huang, Xiaolun et al., 2008. Inhibition of ICAM-1/LFA-1 interactions prevents B-cell-dependent anti-CD45RB-induced transplantation tolerance. *Transplantation*, 85(5), p.675-680.
- Hubert, Francois-Xavier et al., 2004. 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. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 172(12), p.7485-7494.
- Hume, D A et al., 1988. The effect of human recombinant macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) on the murine mononuclear phagocyte system in vivo. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 141(10), p.3405-3409.
- Hume, David A & MacDonald, K.P.A., 2012. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood*, 119(8), p.1810-1820.
- Hutchinson, J.A. et al., 2011. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 187(5), p.2072-2078.
- Illigens, B.M. et al., 2009. Dual effects of the alloresponse by Th1 and Th2 cells on acute and chronic rejection of allotransplants. *European journal of immunology*, 39(11), p.3000-3009.
- Imai, A. et al., 2007. A novel fully human anti-CD40 monoclonal antibody, 4D11, for kidney transplantation in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 84(8), p.1020-1028.
- Inaba, T. et al., 1992. Platelet-derived growth factor induces c-fms and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 267(18), p.13107-13112.
- Inoue, S. et al., 2006. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer research*, 66(15), p.7741-7747.
- Inwald, D.P. et al., 2003. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circulation research*, 92(9), p.1041-1048.
- Iwakoshi, N.N. et al., 2000. Treatment of allograft recipients with donor-specific transfusion and anti-CD154 antibody leads to deletion of alloreactive CD8+ T cells and prolonged graft survival in a CTLA4-dependent manner. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 164(1), p.512-521.
- Iwata, Yohei et al., 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 117(2), p.530-541.
- Jarvinen, L.Z. et al., 2003. CD154 on the surface of CD4+CD25+ regulatory T cells contributes to skin transplant tolerance. *Transplantation*, 76(9), p.1375-1379.
- Jenkins, M K & Schwartz, R H, 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 165(2), p.302-319.
- Jiang, A. et al., 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity*, 27(4), p.610-624.
- Jiang, H, Zhang, S.I. & Pernis, B., 1992. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5060), p.1213-1215.
- Jiang, S et al., 1998. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Human immunology*, 59(11), p.690-699.

-
- Jiang, Shuiping, Herrera, O. & Lechler, Robert I, 2004. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Current opinion in immunology*, 16(5), p.550-557.
- Jin, Y.-P. et al., 2002. Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(11), p.5415-5423.
- Jin, Y.-Z. & Xie, S.-S., 2003. Bicistronic adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4Ig gene and CD40Ig gene result in indefinite survival of islet xenograft. *Transplantation proceedings*, 35(8), p.3165-3166.
- Jones, N D et al., 2000. CD40-CD40 ligand-independent activation of CD8+ T cells can trigger allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(2), p.1111-1118.
- Jonuleit, H. et al., 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 192(9), p.1213-1222.
- Jose, M.D. et al., 2003. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(3), p.294-300.
- Josien, R, Douillard, P., et al., 1998. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(11), p.1920-1926.
- Josien, R, Heslan, M, et al., 1998. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood*, 92(12), p.4539-4544.
- Josien, R et al., 1995. Graft-infiltrating T helper cells, CD45RC phenotype, and Th1/Th2-related cytokines in donor-specific transfusion-induced tolerance in adult rats. *Transplantation*, 60(10), p.1131-1139.
- Kägi, D. et al., 1994. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5171), p.528-530.
- Kanaya, K. et al., 2003. Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model. *Transplantation*, 75(3), p.275-281.
- Kapessidou, P. et al., 2008. Interleukin-22 deficiency accelerates the rejection of full major histocompatibility complex-disparate heart allografts. *Transplantation proceedings*, 40(5), p.1593-1597.
- Kapessidou, Y. et al., 2006. The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ T cells. *Transplantation*, 82(4), p.582-591.
- Karczewski, J. et al., 2008. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplantation proceedings*, 40(10), p.3390-3392.
-

-
- Kato, M. et al., 2003. Complement fragment C4d deposition in peritubular capillaries in acute humoral rejection after ABO blood group-incompatible human kidney transplantation. *Transplantation*, 75(5), p.663-665.
- Katz, S.I., Parker, D. & Turk, J.L., 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature*, 251(5475), p.550-551.
- Kawabe, T. et al., 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*, 1(3), p.167-178.
- Kawai, K. et al., 2005. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116(1), p.192-197.
- Kawai, T et al., 1995. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys. *Transplantation*, 59(2), p.256-262.
- Kawai, T et al., 2000. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nature medicine*, 6(2), p.114.
- Kawai, Tatsuo et al., 2008. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *The New England journal of medicine*, 358(4), p.353-361.
- Ke, B. et al., 2003. Interleukin-13 gene transfer protects rat livers from antigen-independent injury induced by ischemia and reperfusion. *Transplantation*, 75(8), p.1118-1123.
- Kearney, E.R. et al., 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity*, 1(4), p.327-339.
- Keever-Taylor, C.A. et al., 2007. Rapamycin enriches for CD4(+) CD25(+) CD27(+) Foxp3(+) regulatory T cells in ex vivo-expanded CD25-enriched products from healthy donors and patients with multiple sclerosis. *Cytotherapy*, 9(2), p.144-157.
- Kehry, M.R., 1996. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(7), p.2345-2348.
- Keino, H. et al., 2006. CD8+ T regulatory cells use a novel genetic program that includes CD103 to suppress Th1 immunity in eye-derived tolerance. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(4), p.1533-1542.
- Kendal, A.R. et al., 2011. Sustained suppression by Foxp3+ regulatory T cells is vital for infectious transplantation tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 208(10), p.2043-2053.
- Kendal, A.R. & Waldmann, Herman, 2010. Infectious tolerance: therapeutic potential. *Current opinion in immunology*, 22(5), p.560-565.
- Kenyon, N S, Fernandez, L.A., et al., 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154. *Diabetes*, 48(7), p.1473-1481.
- Kenyon, N S, Chatzipetrou, M., et al., 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), p.8132-8137.

-
- Kessel, A. et al., 2011. Human CD19(+)/CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmunity Reviews*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155204> [Consulté mars 23, 2012].
- Khattari, R. et al., 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature immunology*, 4(4), p.337-342.
- Kienle, K. et al., 2005. Expression of BCL-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation proceedings*, 37(1), p.439-441.
- Kirk, A D et al., 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), p.8789-8794.
- Kirk, A D et al., 1999. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nature medicine*, 5(6), p.686-693.
- Kissmeyer-Nielsen, F. et al., 1966. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 2(7465), p.662-665.
- Kita, Y. et al., 1999. Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene. *Transplantation*, 68(6), p.758-766.
- Kleijwegt, F.S. et al., 2011. Transfer of regulatory properties from tolerogenic to proinflammatory dendritic cells via induced autoreactive regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(12), p.6357-6364.
- Klein, L et al., 2000. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nature medicine*, 6(1), p.56-61.
- Knackstedt, M.K. et al., 2003. Th1 cytokines and the prothrombinase fgl2 in stress-triggered and inflammatory abortion. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 49(4), p.210-220.
- Koch, S.D. et al., 2008. Alloantigen-induced regulatory CD8+CD103+ T cells. *Human immunology*, 69(11), p.737-744.
- Koh, D.R. et al., 1992. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5060), p.1210-1213.
- Kohei, N. et al., 2012. Chronic antibody-mediated rejection is reduced by targeting B-cell immunity during an introductory period. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(2), p.469-476.
- van Kooten, C & Banchereau, J, 1997. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Current opinion in immunology*, 9(3), p.330-337.
- Korecka-Polak, A. et al., 2011. Human peripheral blood CD8+ CD28- T cells of renal allograft recipients do not express FOXP3 protein. *Transplantation proceedings*, 43(8), p.2917-2921.
-

- Koshiba, T. et al., 2003. Regulatory cell-mediated tolerance does not protect against chronic rejection. *Transplantation*, 76(3), p.588-596.
- Koyama, I. et al., 2004. Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in nonhuman primates. *Transplantation*, 77(3), p.460-462.
- Koyama, T. et al., 1987. Structure of a cytotoxic T-lymphocyte-specific gene shows a strong homology to fibrinogen beta and gamma chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(6), p.1609-1613.
- Kreisel, D. et al., 2002. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nature medicine*, 8(3), p.233-239.
- Krieg, A.M. et al., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), p.546-549.
- Krug, A. et al., 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *European journal of immunology*, 31(7), p.2154-2163.
- Krummel, M.F. & Allison, J.P., 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of experimental medicine*, 182(2), p.459-465.
- Kurosaki, Tomohiro, 2010. The study of B cells and antibodies in Japan: a historical perspective. *International immunology*, 22(4), p.217-226.
- Kurts, C. et al., 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *The Journal of experimental medicine*, 188(2), p.409-414.
- Lafuse, W.P. et al., 1995. The cytotoxic T lymphocyte gene FIBLP with homology to fibrinogen beta and gamma subunits is also induced in mouse macrophages by IFN-gamma. *Cellular Immunology*, 163(2), p.187-190.
- Lakkis, F.G. et al., 2000. Immunologic « ignorance » of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature medicine*, 6(6), p.686-688.
- Lampropoulou, V. et al., 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(7), p.4763-4773.
- Langford, G.A. et al., 1994. Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplantation proceedings*, 26(3), p.1400-1401.
- Larsen, C P, Alexander, D.Z., et al., 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation*, 61(1), p.4-9.
- Larsen, C P, Elwood, E.T., et al., 1996. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature*, 381(6581), p.434-438.

-
- Larsen, C P, Morris, P.J. & Austyn, J.M., 1990. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *The Journal of experimental medicine*, 171(1), p.307-314.
- Laufer, T.M. et al., 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature*, 383(6595), p.81-85.
- Laumonier, Thomas et al., 2003. CTLA4lg adenoviral gene transfer induces long-term islet rat allograft survival, without tolerance, after systemic but not local intragraft expression. *Human gene therapy*, 14(6), p.561-575.
- Lechler, R I et al., 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunology today*, 11(3), p.83-88.
- Lee, R.S. et al., 1994. Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 179(3), p.865-872.
- Lee, W.C. et al., 2000. Contrasting effects of myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding interleukin-10 on organ allograft and tumour rejection. *Immunology*, 101(2), p.233-241.
- Lee, Y.-H. et al., 2008. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(2), p.825-832.
- Lenschow, D.J. et al., 1992. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5071), p.789-792.
- Leonard, E.P., Cotton, W.R. & Keene, H.J., 1974. Morphological and histochemical observations on the lack of osteoclasts in the « tl » strain of rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 147(3), p.596-598.
- Lerut, J & Sanchez-Fueyo, A, 2006. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(8), p.1774-1780.
- Levy, G A et al., 2000. Molecular and functional analysis of the human prothrombinase gene (HFGL2) and its role in viral hepatitis. *The American journal of pathology*, 156(4), p.1217-1225.
- Levy, G A, Leibowitz, J L & Edgington, T.S., 1981. Induction of monocyte procoagulant activity by murine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice. *The Journal of experimental medicine*, 154(4), p.1150-1163.
- Li, C. et al., 1992. Monoclonal antiprothrombinase (3D4.3) prevents mortality from murine hepatitis virus (MHV-3) infection. *The Journal of experimental medicine*, 176(3), p.689-697.
- Li, Jianping et al., 2006. Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 29(5), p.779-783.
- Li, Q. et al., 2009. Microarray analysis of lymphatic tissue reveals stage-specific, gene expression signatures in HIV-1 infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(3), p.1975-1982.
-

-
- Li, W & Stanley, E R, 1991. Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *The EMBO journal*, 10(2), p.277-288.
- Li, X C et al., 1999. Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(5), p.2500-2507.
- Li, X.L. et al., 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(2), p.823-833.
- Li, X.-L. et al., 2008. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allotransplantation. *Transplantation*, 86(1), p.10-15.
- Li, Xian Chang, 2010. The significance of non-T-cell pathways in graft rejection: implications for transplant tolerance. *Transplantation*, 90(10), p.1043-1047.
- Li, Y et al., 1999. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nature medicine*, 5(11), p.1298-1302.
- Liang, B. et al., 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), p.5916-5926.
- Libetta, C. et al., 2007. The effect of sirolimus- or cyclosporine-based immunosuppression effects on T-cell subsets in vivo. *Kidney international*, 72(1), p.114-120.
- Lichanska, A.M. et al., 1999. Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood*, 94(1), p.127-138.
- Lin, H.-H. et al., 2005. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 201(10), p.1615-1625.
- Lin, Haishan et al., 2008. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5877), p.807-811.
- Lindahl, K.F. & Wilson, D.B., 1977. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *The Journal of experimental medicine*, 145(3), p.508-522.
- Liu, G. et al., 2011. An instructive role of donor macrophages in mixed chimeras in the induction of recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cells. *Immunology and cell biology*, 89(8), p.827-835.
- Liu, Hao et al., 2008. The FGL2-FcγRIIB pathway: a novel mechanism leading to immunosuppression. *European Journal of Immunology*, 38(11), p.3114-3126.
- Liu, Heli et al., 2012. The mechanism of shared but distinct CSF-1R signaling by the non-homologous cytokines IL-34 and CSF-1. *Biochimica et biophysica acta*, 1824(7), p.938-945.
- Liu, Kang et al., 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5925), p.392-397.
-

-
- Liu, Mingfeng et al., 2006. Cytokine-induced hepatic apoptosis is dependent on FGL2/fibroleukin: the role of Sp1/Sp3 and STAT1/PU.1 composite cis elements. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(11), p.7028-7038.
- Liu, Mingfeng et al., 2003. Gene transcription of fgl2 in endothelial cells is controlled by Ets-1 and Oct-1 and requires the presence of both Sp1 and Sp3. *European journal of biochemistry / FEBS*, 270(10), p.2274-2286.
- Liu, Weihong et al., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine*, 203(7), p.1701-1711.
- Liu, Y et al., 2007. The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplantation proceedings*, 39(10), p.3396-3403.
- Liu, Y.-J., 2009. TSLP in epithelial cell and dendritic cell cross talk. *Advances in immunology*, 101, p.1-25.
- Liu, Yanling et al., 2010. The FGL2/fibroleukin prothrombinase is involved in alveolar macrophage activation in COPD through the MAPK pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), p.555-561.
- Liu, Z et al., 1996. Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *The Journal of clinical investigation*, 98(5), p.1150-1157.
- Liu, Z et al., 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *International immunology*, 10(6), p.775-783.
- Locke, J.E. et al., 2009. The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(1), p.231-235.
- Loong, C.-C. et al., 2002. Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. *The Journal of pathology*, 197(3), p.322-332.
- Lu, L et al., 1999. Adenoviral delivery of CTLA4Ig into myeloid dendritic cells promotes their in vitro tolerogenicity and survival in allogeneic recipients. *Gene therapy*, 6(4), p.554-563.
- Lu, Ling et al., 2009. CD8(+)CD103(+) regulatory T cells in spontaneous tolerance of liver allografts. *International immunopharmacology*, 9(5), p.546-548.
- Ludewig, B. et al., 1996. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4+ CD45RA+ T cells with dendritic cells. *European journal of immunology*, 26(12), p.3137-3143.
- Lutz, M B et al., 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *European journal of immunology*, 30(7), p.1813-1822.
- Ma, A. et al., 2009. Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice. *International immunopharmacology*, 9(5), p.553-563.
-

-
- Ma, D. et al., 2012. TGF- β induced by interleukin-34-stimulated microglia regulates microglial proliferation and attenuates oligomeric amyloid β neurotoxicity. *Neuroscience letters*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22985514> [Consulté septembre 27, 2012].
- Ma, Xiaolei et al., 2012. Structural Basis for the Dual Recognition of Helical Cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure (London, England: 1993)*, 20(4), p.676-687.
- MacDonald, K.P.A. et al., 2010. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*, 116(19), p.3955-3963.
- MacDonald, K.P.A. et al., 2005. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(3), p.1399-1405.
- Mach, F. et al., 1997. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), p.1931-1936.
- MacPherson, G., Kushnir, N. & Wykes, M., 1999. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunological reviews*, 172, p.325-334.
- Mahnke, K. et al., 2003. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*, 101(12), p.4862-4869.
- Makrigiannakis, A. et al., 2001. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nature immunology*, 2(11), p.1018-1024.
- Malik, N. et al., 1996. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(10), p.3952-3960.
- Manavalan, John S et al., 2004. Alloantigen specific CD8+CD28- FOXP3+ T suppressor cells induce ILT3+ ILT4+ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *International immunology*, 16(8), p.1055-1068.
- Manavalan, John S et al., 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant immunology*, 11(3-4), p.245-258.
- Mann, M.K. et al., 2007. B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(6), p.3447-3456.
- Manrique, S.Z. et al., 2011. Foxp3-positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor growth. *The Journal of experimental medicine*, 208(7), p.1485-1499.
- Mao, Q. et al., 2007. Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(4), p.864-871.
-

- Marazzi, S. et al., 1998. Characterization of human fibroleukin, a fibrinogen-like protein secreted by T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(1), p.138-147.
- Markees, T G et al., 1998. Long-term survival of skin allografts induced by donor splenocytes and anti-CD154 antibody in thymectomized mice requires CD4(+) T cells, interferon-gamma, and CTLA4. *The Journal of clinical investigation*, 101(11), p.2446-2455.
- Marks, S.C., Jr et al., 1992. Administration of colony stimulating factor-1 corrects some macrophage, dental, and skeletal defects in an osteopetrotic mutation (toothless, tl) in the rat. *Bone*, 13(1), p.89-93.
- Marks, S.C., Jr, 1977. Osteopetrosis in the toothless (t1) rat: presence of osteoclasts but failure to respond to parathyroid extract or to be cured by infusion of spleen or bone marrow cells from normal littermates. *The American journal of anatomy*, 149(2), p.289-297.
- Marks, S.C., Jr & Lane, P.W., 1976. Osteopetrosis, a new recessive skeletal mutation on chromosome 12 of the mouse. *The Journal of heredity*, 67(1), p.11-18.
- Marsden, Philip A et al., 2003. The Fgl2/fibroleukin prothrombinase contributes to immunologically mediated thrombosis in experimental and human viral hepatitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(1), p.58-66.
- Martínez-Llordella, M et al., 2007. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(2), p.309-319.
- Martínez-Llordella, Marc et al., 2008. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *The Journal of clinical investigation*, 118(8), p.2845-2857.
- Masaoka, T. et al., 1990. Double-blind test of human urinary macrophage colony-stimulating factor for allogeneic and syngeneic bone marrow transplantation: effectiveness of treatment and 2-year follow-up for relapse of leukaemia. *British journal of haematology*, 76(4), p.501-505.
- Masunaga, T. et al., 2005. Dimeric but not monomeric soluble CD40 prolongs allograft survival and generates regulatory T cells that inhibit CTL function. *Transplantation*, 80(11), p.1614-1622.
- Matsuda, M. et al., 1996. Glomerular expression of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with various forms of glomerulonephritis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 75(3), p.403-412.
- Matsumoto, M. et al., 2011. The calcium sensors STIM1 and STIM2 control B cell regulatory function through interleukin-10 production. *Immunity*, 34(5), p.703-714.
- Matsushita, T. et al., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*, 118(10), p.3420-3430.
- Matzinger, P, 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*, 12, p.991-1045.
- Maiyyedi, S. & Colvin, Robert B, 2002. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 11(6), p.609-618.

-
- Mauri, C. et al., 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*, 197(4), p.489-501.
- Mauri, C. & Blair, P.A., 2010. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(11), p.636-643.
- Mauri, C. & Bosma, A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology*, 30, p.221-241.
- van Maurik, Andre van et al., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8+ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(10), p.5401-5404.
- McCarthy, G.P. & Roberts, I.S.D., 2002. Diagnosis of acute renal allograft rejection: evaluation of the Banff 97 Guidelines for Slide Preparation. *Transplantation*, 73(9), p.1518-1521.
- McLellan, A.D. et al., 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *European journal of immunology*, 26(6), p.1204-1210.
- Mellor, Andrew L & Munn, David H, 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology*, 4(10), p.762-774.
- Melnyk, M.C. et al., 2011. The prothrombinase activity of FGL2 contributes to the pathogenesis of experimental arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, 40(4), p.269-278.
- Mendicino, M. et al., 2005. Targeted deletion of Fgl-2/fibroleukin in the donor modulates immunologic response and acute vascular rejection in cardiac xenografts. *Circulation*, 112(2), p.248-256.
- Mengel, M. et al., 2012. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(3), p.563-570.
- Menke, J. et al., 2009. Circulating CSF-1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(12), p.2581-2592.
- Ménoret, S. et al., 2011. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 677, p.63-83.
- Metzler, B. et al., 2004. Combinations of anti-LFA-1, everolimus, anti-CD40 ligand, and allogeneic bone marrow induce central transplantation tolerance through hemopoietic chimerism, including protection from chronic heart allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(11), p.7025-7036.
- Miller, J.C. et al., 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology*, 13(9), p.888-899.
- MILLER, J.F., 1961. Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2(7205), p.748-749.
- Minagawa, R. et al., 2004. The critical role of Fas-Fas ligand interaction in donor-specific transfusion-induced tolerance to H-Y antigen. *Transplantation*, 78(6), p.799-806.
-

- Miyamoto, T. et al., 2005. Prolonged skin allograft survival by IL-10 gene-introduced CD4 T cell administration. *International immunology*, 17(6), p.759-768.
- Mizoguchi, Atsushi et al., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16(2), p.219-230.
- Mizoguchi, Atsushi & Bhan, Atul K, 2006. A case for regulatory B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(2), p.705-710.
- Mizoguchi, E et al., 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *International immunology*, 12(5), p.597-605.
- Mizuno, T. et al., 2011. Interleukin-34 selectively enhances the neuroprotective effects of microglia to attenuate oligomeric amyloid- β neurotoxicity. *The American journal of pathology*, 179(4), p.2016-2027.
- Mohan, C. et al., 1995. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(3), p.1470-1480.
- Mohanakumar, T. et al., 1981. Potentiating effect of HLA matching and blood transfusion on renal allograft survival. *Transplantation*, 32(3), p.244-247.
- Molano, A. et al., 2008. Modulation of invariant natural killer T cell cytokine responses by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunology letters*, 117(1), p.81-90.
- Monk, N.J. et al., 2003a. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nature medicine*, 9(10), p.1275-1280.
- Monk, N.J. et al., 2003b. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nature medicine*, 9(10), p.1275-1280.
- Moreau, Aurélie et al., 2008. Superiority of bone marrow-derived dendritic cells over monocyte-derived ones for the expansion of regulatory T cells in the macaque. *Transplantation*, 85(9), p.1351-1356.
- Morris, A. & Möller, G., 1968. Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 101(3), p.439-445.
- Moulin, V. et al., 2000. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *The Journal of experimental medicine*, 192(4), p.475-482.
- Moutier, R. et al., 1976. Three recessive genes for congenital osteopetrosis in Norway rat. *The Journal of heredity*, 67(3), p.189-190.
- Mues, B. et al., 1989. Phenotypic characterization of macrophages in human term placenta. *Immunology*, 67(3), p.303-307.
- Munn, D H, Garnick, M.B. & Cheung, N.K., 1990. Effects of parenteral recombinant human macrophage colony-stimulating factor on monocyte number, phenotype, and antitumor cytotoxicity in nonhuman primates. *Blood*, 75(10), p.2042-2048.

-
- Muta, T. et al., 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, 368(6466), p.70-73.
- Myers, L. et al., 2005. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN-gamma to elaborate TGF-beta-based suppression. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(12), p.7625-7632.
- Nadazdin, O. et al., 2011. Contributions of direct and indirect alloresponses to chronic rejection of kidney allografts in nonhuman primates. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(9), p.4589-4597.
- Nakamichi, Y. et al., 2012. Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in osteopetrotic op/op mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(25), p.10006-10011.
- Nakashima, S. et al., 2002. Membrane attack complex contributes to destruction of vascular integrity in acute lung allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(8), p.4620-4627.
- Nanji, S.A. et al., 2006. Costimulation blockade of both inducible costimulator and CD40 ligand induces dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*, 55(1), p.27-33.
- Nankivell, Brian J et al., 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New England journal of medicine*, 349(24), p.2326-2333.
- Nankivell, Brian J & Kuypers, D.R.J., 2011. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*, 378(9800), p.1428-1437.
- Nanni-Costa, A. et al., 1996. ELISA anti-HLA antibody screening identifies non-complement-fixing antibodies responsible for acute graft rejection. A case report. *European journal of immunogenetics: official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 23(5), p.383-387.
- Nemazee, D.A. & Bürki, K., 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*, 337(6207), p.562-566.
- Neta, R. & Salvin, S.B., 1974. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 113(6), p.1716-1725.
- Neves, P. et al., 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*, 33(5), p.777-790.
- Newell, K.A. et al., 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), p.1836-1847.
- Nickeleit, Volker et al., 2002. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(1), p.242-251.
- Niimi, M. et al., 2001. Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation*, 72(9), p.1556-1562.

-
- Niimi, M. et al., 1998. The role of the CD40 pathway in alloantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(10), p.5331-5337.
- Ning, Q et al., 1999. The nucleocapsid protein of murine hepatitis virus type 3 induces transcription of the novel fgl2 prothrombinase gene. *The Journal of biological chemistry*, 274(15), p.9930-9936.
- Ning, Qin et al., 2005. Role of fibrinogen-like protein 2 prothrombinase/fibroleukin in experimental and human allograft rejection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(11), p.7403-7411.
- Noelle, R J et al., 1992. A 39-kDa protein on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), p.6550-6554.
- Noh, J. et al., 2010. Presence of Foxp3-expressing CD19(+)CD5(+) B Cells in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Human CD19(+)CD5(+)Foxp3(+) Regulatory B Cell (Breg). *Immune network*, 10(6), p.247-249.
- Nomura, M. et al., 2002. Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40lg gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation*, 73(9), p.1403-1410.
- Noorchashm, H. et al., 2006. B cell-mediated antigen presentation is required for the pathogenesis of acute cardiac allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(11), p.7715-7722.
- Notarangelo, L.D. et al., 1996. CD40lbase: a database of CD40L gene mutations causing X-linked hyper-IgM syndrome. *Immunology today*, 17(11), p.511-516.
- O'Garra, A. & Howard, M., 1992. IL-10 production by CD5 B cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 651, p.182-199.
- Obata, F. et al., 2005. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells and interferon-gamma to the progress of chronic rejection of kidney allografts: the Th1 response mediates both acute and chronic rejection. *Transplant immunology*, 14(1), p.21-25.
- Obayashi, K., Doi, T. & Koyasu, S., 2007. Dendritic cells suppress IgE production in B cells. *International immunology*, 19(2), p.217-226.
- Obst, R. et al., 2000. The role of peptides in T cell alloreactivity is determined by self-major histocompatibility complex molecules. *The Journal of experimental medicine*, 191(5), p.805-812.
- Ochando, J.C. et al., 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology*, 7(6), p.652-662.
- Ohashi, P.S. et al., 1991. Ablation of « tolerance » and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, 65(2), p.305-317.
- Ohl, L. et al., 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2), p.279-288.
-

- Ohnmacht, C. et al., 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), p.549-559.
- Okazaki, Tatsuma et al., 2007. Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. *The American journal of pathology*, 171(4), p.1093-1103.
- Olson, G.E. et al., 2004. Region-specific expression and secretion of the fibrinogen-related protein, fgl2, by epithelial cells of the hamster epididymis and its role in disposal of defective spermatozoa. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), p.51266-51274.
- Olthoff, K.M. et al., 1997. Adenovirus-mediated gene transfer of CTLA4lg to liver allografts results in prolonged survival and local T-cell anergy. *Transplantation proceedings*, 29(1-2), p.1030-1031.
- Ordonez, L. et al., 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One*, 4(4), p.e5287.
- Ormonde, D.G. et al., 1999. Banff schema for grading liver allograft rejection: utility in clinical practice. *Liver transplantation and surgery: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 5(4), p.261-268.
- Otterbein, L.E. et al., 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology*, 24(8), p.449-455.
- Ouabed, A. et al., 2008. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), p.5862-5870.
- Owen, R.D., 1945. IMMUNOGENETIC CONSEQUENCES OF VASCULAR ANASTOMOSES BETWEEN BOVINE TWINS. *Science (New York, N.Y.)*, 102(2651), p.400-401.
- Paantjens, A.W.M. et al., 2011. The Induction of IgM and IgG Antibodies against HLA or MICA after Lung Transplantation. *Pulmonary medicine*, 2011, p.432169.
- Pallier, Annaick et al., 2010. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney international*, 78(5), p.503-513.
- Pandiyan, P. et al., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature immunology*, 8(12), p.1353-1362.
- Pantenburg, B. et al., 2002. T cells primed by *Leishmania major* infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(7), p.3686-3693.
- Papapetropoulos, A. et al., 1999. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(2), p.213-223.

- Parekh, V.V. et al., 2003. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(12), p.5897-5911.
- Parker, D.C. et al., 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), p.9560-9564.
- Parr, R.L. et al., 1995. Association of mouse fibrinogen-like protein with murine hepatitis virus-induced prothrombinase activity. *Journal of virology*, 69(8), p.5033-5038.
- Pascual, M. et al., 2002. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England journal of medicine*, 346(8), p.580-590.
- Pearl, J.P. et al., 2007. CD154 blockade, sirolimus, and donor-specific transfusion prevents renal allograft rejection in cynomolgus monkeys despite homeostatic T-cell activation. *Transplantation*, 83(9), p.1219-1225.
- Pêche, H. et al., 2006. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(7), p.1541-1550.
- Peng, W. et al., 2011. Dendritic cells transfected with PD-L1 recombinant adenovirus induces T cell suppression and long-term acceptance of allograft transplantation. *Cellular immunology*, 271(1), p.73-77.
- Peng, X. et al., 1996. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. *European journal of immunology*, 26(7), p.1621-1627.
- Pietra, B.A. et al., 2000. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *The Journal of clinical investigation*, 106(8), p.1003-1010.
- Pinchuk, L.M. et al., 1996. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 157(10), p.4363-4370.
- Pober, J.S. & Cotran, R.S., 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50(4), p.537-544.
- Pope, M. et al., 1995. Pattern of disease after murine hepatitis virus strain 3 infection correlates with macrophage activation and not viral replication. *Journal of virology*, 69(9), p.5252-5260.
- Popov, I.A. et al., 1995. Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation. *Transplantation*, 60(12), p.1621-1624.
- Porcheray, F. et al., 2009. B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(9), p.2126-2135.

-
- PORTER, K.A., 1965. MORPHOLOGICAL ASPECTS OF RENAL HOMOGRAFT REJECTION. *British medical bulletin*, 21, p.171-175.
- Poston, R.S. et al., 1999. Antisense oligodeoxynucleotides prevent acute cardiac allograft rejection via a novel, nontoxic, highly efficient transfection method. *Transplantation*, 68(6), p.825-832.
- Potiron, N. et al., 2005. Adenovirus-mediated CTLA4Ig or CD40Ig gene transfer delays pancreatic islet rejection in a rat-to-mouse xenotransplantation model after systemic but not local expression. *Cell transplantation*, 14(5), p.263-275.
- Powrie, F & Mason, D., 1990. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *The Journal of experimental medicine*, 172(6), p.1701-1708.
- Pratt, J.R., Basheer, S.A. & Sacks, S.H., 2002. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nature medicine*, 8(6), p.582-587.
- Preston, E.H. et al., 2005. IDEC-131 (anti-CD154), sirolimus and donor-specific transfusion facilitate operational tolerance in non-human primates. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 5(5), p.1032-1041.
- Pyonteck, S.M. et al., 2012. Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene*, 31(11), p.1459-1467.
- Qasim, F.J. et al., 1995. The time course and characterization of mercuric chloride-induced immunopathology in the brown Norway rat. *Journal of autoimmunity*, 8(2), p.193-208.
- Qian, L. et al., 2012. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcyIIbhi regulatory B cells through IFN- β and CD40L. *Blood*, 120(3), p.581-591.
- Qin, L. et al., 1995. Multiple vectors effectively achieve gene transfer in a murine cardiac transplantation model. Immunosuppression with TGF-beta 1 or vIL-10. *Transplantation*, 59(6), p.809-816.
- Qin, L. et al., 1996. Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(6), p.2316-2323.
- Qin, S. et al., 1993. « Infectious » transplantation tolerance. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5097), p.974-977.
- Quezada, S.A. et al., 2005. Analysis of the underlying cellular mechanisms of anti-CD154-induced graft tolerance: the interplay of clonal anergy and immune regulation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 175(2), p.771-779.
- Radi, Z.A. et al., 2011. Increased serum enzyme levels associated with kupffer cell reduction with no signs of hepatic or skeletal muscle injury. *The American journal of pathology*, 179(1), p.240-247.
- Rafei, M. et al., 2009. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nature medicine*, 15(9), p.1038-1045.
-

-
- Ranheim, E.A. & Kipps, T.J., 1993. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *The Journal of experimental medicine*, 177(4), p.925-935.
- Rathmell, J.C. et al., 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, 87(2), p.319-329.
- Ratzinger, G. et al., 2002. Matrix metalloproteinases 9 and 2 are necessary for the migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells from human and murine skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(9), p.4361-4371.
- Ravetch, J.V. & Bolland, S., 2001. IgG Fc receptors. *Annual Review of Immunology*, 19, p.275-290.
- Rehman, K.K. et al., 2007. Immunomodulation by adenoviral-mediated SCD40-Ig gene therapy for mouse allogeneic islet transplantation. *Transplantation*, 84(3), p.301-307.
- Reichardt, P. et al., 2007. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood*, 110(5), p.1519-1529.
- Reis e Sousa, C. et al., 1997. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *The Journal of experimental medicine*, 186(11), p.1819-1829.
- Rhein, P. et al., 2010. CD11b is a therapy resistance- and minimal residual disease-specific marker in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115(18), p.3763-3771.
- Richards, D.M. et al., 2004. Indirect minor histocompatibility antigen presentation by allograft recipient cells in the draining lymph node leads to the activation and clonal expansion of CD4+ T cells that cause obliterative airways disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(6), p.3469-3479.
- Rieux-Laucat, F. et al., 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5215), p.1347-1349.
- Rifa'i, M. et al., 2004. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine*, 200(9), p.1123-1134.
- van Rijen, M.M.L. et al., 2002. CD154 is expressed during treatment with calcineurin inhibitors after organ transplantation. *Transplantation*, 73(10), p.1666-1672.
- Riquelme, P. et al., 2012. IFN- γ -induced iNOS Expression in Mouse Regulatory Macrophages Prolongs Allograft Survival in Fully Immunocompetent Recipients. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*.
- Rizzo, L.V. et al., 1995. Regulation of the interaction between Th1 and Th2 T cell clones to provide help for antibody production in vivo. *European journal of immunology*, 25(3), p.708-716.
- Robson, S.C. et al., 1993. Fibrin and fibrinogen degradation products with an intact D-domain C-terminal gamma chain inhibit an early step in accessory cell-dependent lymphocyte mitogenesis. *Blood*, 81(11), p.3006-3014.

-
- Rocha, B., Vassalli, P. & Guy-Grand, D., 1991. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta + lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 173(2), p.483-486.
- Rodríguez-Palmero, M. et al., 2006. Effective treatment of adjuvant arthritis with a stimulatory CD28-specific monoclonal antibody. *The Journal of rheumatology*, 33(1), p.110-118.
- Rogers, P.R. et al., 1992. CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 148(12), p.4054-4065.
- Roitt, I.M. & Cooke, A., 1987. The role of autoantigen in autoimmunity. *Immunology letters*, 16(3-4), p.259-263.
- Rossi, B. et al., 2006. Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(2), p.796-803.
- Rother, R.P. et al., 2008. C5 blockade with conventional immunosuppression induces long-term graft survival in presensitized recipients. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(6), p.1129-1142.
- Rothstein, D M et al., 2001. Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(1), p.322-329.
- Rouse, B.T., Sarangi, P.P. & Suvas, S., 2006. Regulatory T cells in virus infections. *Immunological reviews*, 212, p.272-286.
- Rowshani, Ajda Tahereh & Vereyken, E.J.F., 2012. The Role of Macrophage Lineage Cells in Kidney Graft Rejection and Survival. *Transplantation*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22828735> [Consulté août 16, 2012].
- Rüegg, C. & Pytela, R., 1995. Sequence of a human transcript expressed in T-lymphocytes and encoding a fibrinogen-like protein. *Gene*, 160(2), p.257-262.
- Russell, D.M. et al., 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature*, 354(6351), p.308-311.
- Russell, P.S. et al., 1994. Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(10), p.5135-5141.
- Saadi, S. et al., 2004. Pathways to acute humoral rejection. *The American journal of pathology*, 164(3), p.1073-1080.
- Sagoo, P. et al., 2010. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), p.1848-1861.
- Sakaguchi, S et al., 1995. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), p.1151-1164.
-

- Sakaguchi, S et al., 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, 161(1), p.72-87.
- Sakaguchi, Shimon, 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, p.531-562.
- Sakaguchi, Shimon, 2003. The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery. *The Journal of clinical investigation*, 112(9), p.1310-1312.
- Sakata, A. et al., 1999. Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells in vitro. *Immunology letters*, 68(2-3), p.301-309.
- Sakurai, T. et al., 1998. Effect of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on mouse immune responses in vivo. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 20(1), p.79-102.
- Sakurai, T. et al., 1996. Recombinant human macrophage-colony stimulating factor suppresses the mouse mixed lymphocyte reaction. *Cellular immunology*, 171(1), p.87-94.
- Salcedo, T.W. et al., 1993. Physical and functional association of p56lck with Fc gamma RIIIA (CD16) in natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*, 177(5), p.1475-1480.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A., 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), p.1109-1118.
- Salomon, B. & Bluestone, J A, 1998. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(10), p.5138-5142.
- Sánchez-Fructuoso, A. et al., 2007. Effect of the brain-death process on acute rejection in renal transplantation. *Transplantation proceedings*, 39(7), p.2214-2216.
- Sandovici, M. et al., 2007. Adenovirus-mediated interleukin-13 gene therapy attenuates acute kidney allograft injury. *The journal of gene medicine*, 9(12), p.1024-1032.
- Sarwal, M. et al., 2003. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *The New England journal of medicine*, 349(2), p.125-138.
- Savoie, E. et al., 2007. Survival benefits of kidney transplantation with expanded criteria deceased donors in patients aged 60 years and over. *Transplantation*, 84(12), p.1618-1624.
- Sayegh, M H et al., 1995. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *The Journal of experimental medicine*, 181(5), p.1869-1874.
- Sayi, A. et al., 2011. TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(2), p.878-890.
- Schebesch, C. et al., 1997. Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells in vitro. *Immunology*, 92(4), p.478-486.

- Schioppa, T. et al., 2011. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), p.10662-10667.
- Schmitz, Jochen et al., 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, 23(5), p.479-490.
- Schwartz, R H, 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4961), p.1349-1356.
- Schwartz, Ronald H, 2003. T cell anergy. *Annual review of immunology*, 21, p.305-334.
- Scollay, R.G., Butcher, E.C. & Weissman, I.L., 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *European journal of immunology*, 10(3), p.210-218.
- Scotto, L. et al., 2004. Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells and antigen specific CD4+CD25+ and CD8+CD28- T suppressor cells. *Human immunology*, 65(11), p.1297-1306.
- Segura, E. et al., 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine*, 209(4), p.653-660.
- Selzner, Nazia et al., 2012. FGL2/fibroleukin mediates hepatic reperfusion injury by induction of sinusoidal endothelial cell and hepatocyte apoptosis in mice. *Journal of hepatology*, 56(1), p.153-159.
- Seo, S.K. et al., 2004. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nature medicine*, 10(10), p.1088-1094.
- Serão, N.V.L. et al., 2011. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC medical genomics*, 4, p.49.
- Shah, S. et al., 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 117(4), p.574-586.
- Shalev, Itay et al., 2008. Targeted deletion of fgl2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(1), p.249-260.
- Shalev, Itay et al., 2009. The novel CD4+CD25+ regulatory T cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 contributes to the outcome of murine fulminant viral hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 49(2), p.387-397.
- Shao, L. et al., 2012. The Significance of Microthrombosis and fgl2 in No-Reflow Phenomenon of Rats With Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis: Official Journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22387586> [Consulté mars 19, 2012].

-
- Sharma, M.D. et al., 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation*, 117(9), p.2570-2582.
- Shaw, J. et al., 1980. Cellular origins of co-stimulator (IL2) and its activity in cytotoxic T lymphocyte responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 124(5), p.2231-2239.
- Sherr, C.J. et al., 1985. The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell*, 41(3), p.665-676.
- Shevach, E.M., 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30(5), p.636-645.
- Shi, B. et al., 2011. [Identification and functional study of Tim-1(+)CD19(+) regulatory B cell in kidney transplantation recipients]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 91(48), p.3388-3392.
- Shi, Z. et al., 2009. Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *European journal of immunology*, 39(8), p.2106-2119.
- Shi, Z. et al., 2008. Importance of CD80/CD86-CD28 interactions in the recognition of target cells by CD8+CD122+ regulatory T cells. *Immunology*, 124(1), p.121-128.
- Shimizu, K. et al., 2000. Host CD40 ligand deficiency induces long-term allograft survival and donor-specific tolerance in mouse cardiac transplantation but does not prevent graft arteriosclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(6), p.3506-3518.
- Shin, E.K. et al., 2010. Association between colony-stimulating factor 1 receptor gene polymorphisms and asthma risk. *Human genetics*, 128(3), p.293-302.
- Shirwan, H. et al., 2003. Prevention of chronic rejection with immunoregulatory cells induced by intrathymic immune modulation with class I allopeptides. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(5), p.581-589.
- Shortman, K. & Naik, S.H., 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 7(1), p.19-30.
- Sidiropoulos, P.I. & Boumpas, D.T., 2004. Lessons learned from anti-CD40L treatment in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*, 13(5), p.391-397.
- Singh, A.K., Horvath, K.A. & Mohiuddin, M.M., 2009. Rapamycin promotes the enrichment of CD4(+)CD25(hi)FoxP3(+) T regulatory cells from naïve CD4(+) T cells of baboon that suppress antiporcine xenogenic response in vitro. *Transplantation proceedings*, 41(1), p.418-421.
- Sis, B. et al., 2010. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(3), p.464-471.
- Siu, K.-L. et al., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein does not modulate transcription of the human FGL2 gene. *The Journal of general virology*, 90(Pt 9), p.2107-2113.
-

-
- Smith, J.D. et al., 2000. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *International immunology*, 12(4), p.563-571.
- Soares, M P et al., 2001. Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunological reviews*, 184, p.275-285.
- Solez, K. et al., 2007. Banff « 05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (»CAN'). *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(3), p.518-526.
- Song, E. et al., 2000. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cellular immunology*, 204(1), p.19-28.
- Song, S. et al., 2001. Stable therapeutic serum levels of human alpha-1 antitrypsin (AAT) after portal vein injection of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene therapy*, 8(17), p.1299-1306.
- Sozzani, S., 2005. Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(6), p.581-592.
- Spickett, G.P. et al., 1983. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *The Journal of experimental medicine*, 158(3), p.795-810.
- Staples, P.J., Gery, I. & Waksman, B.H., 1966. Role of the thymus in tolerance. 3. Tolerance to bovine gamma globulin after direct injection of antigen into the shielded thymus of irradiated rats. *The Journal of experimental medicine*, 124(2), p.127-139.
- Stastny, P. et al., 2009. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Human immunology*, 70(8), p.600-604.
- Steele, D.J. et al., 1996. Two levels of help for B cell alloantibody production. *The Journal of experimental medicine*, 183(2), p.699-703.
- Steinbrink, K. et al., 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(10), p.4772-4780.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), p.1142-1162.
- Steinman, R.M., Pack, M. & Inaba, K., 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunological reviews*, 156, p.25-37.
- Stephens, L.A. & Mason, D., 2000. CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(6), p.3105-3110.
- Strauss, L. et al., 2007. Selective survival of naturally occurring human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells cultured with rapamycin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(1), p.320-329.
-

- Streuli, M. et al., 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *The Journal of experimental medicine*, 166(5), p.1548-1566.
- Strockbine, L.D. et al., 1998. The Epstein-Barr virus BARTF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *Journal of virology*, 72(5), p.4015-4021.
- Su, K. et al., 2008. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin prothrombinase contributes to tumor hypercoagulability via IL-2 and IFN-gamma. *World journal of gastroenterology: WJG*, 14(39), p.5980-5989.
- Subra, J.F. et al., 2001. The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(5), p.2944-2952.
- Suffia, I.J. et al., 2006. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*, 203(3), p.777-788.
- Sumitran, S., 2000. Clinical importance of HLA-specific and non-HLA-specific antibodies in allogeneic kidney transplantation. *Advances in nephrology from the Necker Hospital*, 30, p.29-39.
- Sun, L. et al., 2011. Hepatic overexpression of heme oxygenase-1 improves liver allograft survival by expanding T regulatory cells. *The Journal of surgical research*, 166(2), p.e187-194.
- Süsal, C. & Opelz, G., 2004. Good kidney transplant outcome in recipients with presensitization against HLA class II but not HLA class I. *Human immunology*, 65(8), p.810-816.
- Sutherland, S.M. et al., 2012. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatric transplantation*, 16(1), p.12-17.
- Suzuki, H. et al., 2008. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? *Human immunology*, 69(11), p.751-754.
- Swain, S.L. et al., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 145(11), p.3796-3806.
- Szabo, S.J. et al., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100(6), p.655-669.
- Tadmor, T. et al., 2011. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 60(5), p.609-619.
- Tagoh, H. et al., 2002. Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Genes & development*, 16(13), p.1721-1737.
- Takahashi, T et al., 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*, 76(6), p.969-976.
- Takashima, A. et al., 1995. Colony-stimulating factor-1 secreted by fibroblasts promotes the growth of dendritic cell lines (XS series) derived from murine epidermis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 154(10), p.5128-5135.

- Takatsuki, M. et al., 2001. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation*, 72(3), p.449-454.
- Takeda, A. et al., 2012. Significance of C4d deposition in antibody-mediated rejection. *Clinical transplantation*, 26 Suppl 24, p.43-48.
- Talmage, D.W. et al., 1976. Activation of transplant immunity: effect of donor leukocytes on thyroid allograft rejection. *Science (New York, N.Y.)*, 191(4225), p.385-388.
- Tang, X. et al., 2006. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8 α α +TCR α β + T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(11), p.7645-7655.
- Tang, X., Maricic, I. & Kumar, V., 2007. Anti-TCR antibody treatment activates a novel population of nonintestinal CD8 α α + TCR α β + regulatory T cells and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), p.6043-6050.
- Taymans, J.-M. et al., 2007. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Human gene therapy*, 18(3), p.195-206.
- Teh, C. et al., 2000. M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of Escherichia coli. *Immunology*, 101(2), p.225-232.
- Terasaki, P I et al., 1997. Significance of the donor age effect on kidney transplants. *Clinical transplantation*, 11(5 Pt 1), p.366-372.
- Le Texier, L. et al., 2011. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(3), p.429-438.
- Texier, L.L. et al., 2012. Immunoregulatory Function of IL-27 and TGF- β 1 in Cardiac Allograft Transplantation. *Transplantation*, 94(3), p.226-233.
- Thornton, A.M. et al., 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(7), p.3433-3441.
- Tian, J. et al., 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 167(2), p.1081-1089.
- Tian, P.-X. et al., 2006. Prolongation of renal allograft survival in rats by replication-defective recombinant adenovirus-mediated coexpression of CD40L and CTLA4lg. *Transplantation proceedings*, 38(5), p.1634-1637.
- Tiemessen, M.M. et al., 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), p.19446-19451.

- Titus, J.A. et al., 1987. Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 139(9), p.3153-3158.
- Tokita, D. et al., 2008. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation*, 85(3), p.369-377.
- Toromanoff, A. et al., 2008. Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(7), p.1291-1299.
- Trinité, B et al., 2000. A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(8), p.4202-4208.
- Tsakadze, N.L., Zhao, Z. & D'Souza, S.E., 2002. Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends in cardiovascular medicine*, 12(3), p.101-108.
- Tsang, J.Y.S., Chai, Jian Guo & Lechler, Robert, 2003. Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood*, 101(7), p.2704-2710.
- Tu, W. et al., 2008. Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *Blood*, 112(6), p.2554-2562.
- Turnquist, H.R. et al., 2007. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(11), p.7018-7031.
- Tzachanis, D. et al., 2002. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood*, 99(4), p.1465-1473.
- Uemura, Y. et al., 2008. The selective M-CSF receptor tyrosine kinase inhibitor Ki20227 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 195(1-2), p.73-80.
- Ujike, A. et al., 1999. Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *The Journal of experimental medicine*, 189(10), p.1573-1579.
- Ulich, T.R. et al., 1990. In vivo hematologic effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 75(4), p.846-850.
- Uss, E. et al., 2006. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(5), p.2775-2783.
- Uss, E. et al., 2007. Rapamycin enhances the number of alloantigen-induced human CD103+CD8+ regulatory T cells in vitro. *Transplantation*, 83(8), p.1098-1106.
- Valmori, D. et al., 2006. Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4+ T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(2), p.944-949.

- Valujskikh, A. et al., 2002. Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway. *Nature immunology*, 3(9), p.844-851.
- Vanasek, T.L. et al., 2006. CD25+Foxp3+ regulatory T cells facilitate CD4+ T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(10), p.5880-5889.
- VandePol, C.J. & Garnick, M.B., 1991. Clinical applications of recombinant macrophage-colony stimulating factor (rhM-CSF). *Biotechnology therapeutics*, 2(3-4), p.231-239.
- Varthaman, A. et al., 2010. Control of T cell reactivation by regulatory Qa-1-restricted CD8+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(12), p.6585-6591.
- Vella, J.P. et al., 1997. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*, 64(6), p.795-800.
- Vendetti, S. et al., 2000. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(3), p.1175-1181.
- Victoria, G.D. et al., 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*, 143(4), p.592-605.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W. & Workman, C.J., 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*, 8(7), p.523-532.
- Vinuesa, C.G. et al., 2005. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 5(11), p.853-865.
- Voisine, Cécile et al., 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(5), p.2284-2291.
- Waaga-Gasser, A.M. et al., 2009. Regulatory allospecific T cell clones abrogate chronic allograft rejection. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(4), p.820-830.
- Walker, L.S.K. et al., 2002. CTLA-4 differentially regulates T cell responses to endogenous tissue protein versus exogenous immunogen. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(11), p.6202-6209.
- Walker, L.S.K. & Abbas, Abul K, 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature reviews. Immunology*, 2(1), p.11-19.
- Wallet, M.A. et al., 2008. MerTK is required for apoptotic cell-induced T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 205(1), p.219-232.
- Walunas, T.L. & Bluestone, J A, 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(8), p.3855-3860.
- Wang, C. et al., 2010. Donor IL-4-treatment induces alternatively activated liver macrophages and IDO-expressing NK cells and promotes rat liver allograft acceptance. *Transplant immunology*, 22(3-4), p.172-178.

- Wang, C.Y. et al., 2002. Suppression of murine cardiac allograft arteriopathy by long-term blockade of CD40-CD154 interactions. *Circulation*, 105(13), p.1609-1614.
- Wang, Yaming et al., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22729249> [Consulté juin 30, 2012].
- Wang, Zhi-mo et al., 2006. [Construction of the p-mfgl2shRNA and its effect on mfgl2 expression in vitro]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology*, 14(5), p.358-363.
- Wasowska, B A et al., 2001. Passive transfer of alloantibodies restores acute cardiac rejection in IgKO mice. *Transplantation*, 71(6), p.727-736.
- Watanabe, N. et al., 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436(7054), p.1181-1185.
- Watanabe-Fukunaga, R. et al., 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356(6367), p.314-317.
- Wei, B. et al., 2008. Integration of B cells and CD8+ T in the protective regulation of systemic epithelial inflammation. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 127(3), p.303-312.
- Wei, B. et al., 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), p.2010-2015.
- Wei, S. et al., 2010. Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of leukocyte biology*, 88(3), p.495-505.
- Wells, A D et al., 1999. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature medicine*, 5(11), p.1303-1307.
- Werner-Klein, M. et al., 2007. Transcriptional targeting of B cells for induction of peripheral CD8 T cell tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(12), p.7738-7746.
- Wernersson, S. et al., 1999. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 163(2), p.618-622.
- Wiktor-Jedrzejczak, W. et al., 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), p.4828-4832.
- Wiktor-Jedrzejczak, W.W. et al., 1982. Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 156(5), p.1516-1527.
- Williams, G.M. et al., 1968. « Hyperacute » renal-homograft rejection in man. *The New England journal of medicine*, 279(12), p.611-618.

-
- Wisner-Lynch, L.A., Shalhoub, V. & Marks, S.C., Jr, 1995. Administration of colony stimulating factor-1 to toothless osteopetrotic rats normalizes osteoblast, but not osteoclast, gene expression. *Bone*, 16(6), p.611-618.
- Wolf, S.D. et al., 1996. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, 184(6), p.2271-2278.
- Wong, S.-C. et al., 2010. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *European journal of immunology*, 40(8), p.2296-2307.
- Wood, Kathryn J, Bushell, A. & Hester, Joanna, 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nature reviews. Immunology*, 12(6), p.417-430.
- Wood, Kathryn J & Goto, R., 2012. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 93(1), p.1-10.
- Woollett, G.R. et al., 1985. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *European journal of immunology*, 15(2), p.168-173.
- Wysocki, C.A. et al., 2005. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood*, 106(9), p.3300-3307.
- Xi, D., Li, Li & Gao, S., 2008. [Construction of p-hfgl2shRNA and its effect on hfgl2 expression in vitro]. *Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology*, 16(12), p.930-934.
- Xiao, S. et al., 2012. Defect in regulatory B-cell function and development of systemic autoimmunity in T-cell Ig mucin 1 (Tim-1) mucin domain-mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), p.12105-12110.
- Xiao, X, Li, J & Samulski, R.J., 1996. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *Journal of virology*, 70(11), p.8098-8108.
- Xie, A. et al., 2011. Treatment with interleukin-12/23p40 antibody attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation*, 91(1), p.27-34.
- Xie, L. et al., 2012. Identification of a novel biomarker gene set with sensitivity and specificity for distinguishing between allograft rejection and tolerance. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 18(4), p.444-454.
- Xu, H. et al., 2006. Platelet-derived or soluble CD154 induces vascularized allograft rejection independent of cell-bound CD154. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), p.769-774.
- Xu, H. et al., 2003. Studies investigating pretransplant donor-specific blood transfusion, rapamycin, and the CD154-specific antibody IDEC-131 in a nonhuman primate model of skin allotransplantation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 170(5), p.2776-2782.
- Xue, L. et al., 2009. [Effect of CD8(+)/CD28(-) suppressor T cells induced by dendritic cell with major histocompatibility complex 1 expression RNA interference on immune tolerance in rat
-

- intestinal transplantation]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery*, 12(4), p.404-408.
- Xystrakis, Emmanuel, Bernard, Isabelle, et al., 2004. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *European journal of immunology*, 34(2), p.408-417.
- Xystrakis, Emmanuel, Cavailles, P., et al., 2004. Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(5), p.3140-3147.
- Xystrakis, Emmanuel, Dejean, A.S., et al., 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood*, 104(10), p.3294-3301.
- Yadav, M. et al., 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 209(10), p.1713-1722.
- Yamashita, K. et al., 2006. Heme oxygenase-1 is essential for and promotes tolerance to transplanted organs. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(6), p.776-778.
- Yamashita, K. et al., 2003. Long-term acceptance of rat cardiac allografts on the basis of adenovirus mediated CD40lg plus CTLA4lg gene therapies. *Transplantation*, 76(7), p.1089-1096.
- Yanaba, K. et al., 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity*, 28(5), p.639-650.
- Yang, Jinming et al., 2003. LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. *Journal of leukocyte biology*, 74(3), p.438-447.
- Yang, Jun et al., 2003. Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(1), p.214-225.
- Yang, X.-J. et al., 2011. Semi-mature MyD88-silenced bone marrow dendritic cells prolong the allograft survival in a rat model of intestinal transplantation. *Chinese medical journal*, 124(2), p.268-272.
- Yang, Z. et al., 1999. Cardiac allograft tolerance induced by intra-arterial infusion of recombinant adenoviral CTLA4lg. *Transplantation*, 67(12), p.1517-1523.
- Yin, H. et al., 2010. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation*, 89(10), p.1189-1197.
- Yoshizumi, T. et al., 2006. Tumor necrosis factor-a antisense transfer remarkably improves hepatic graft viability. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 26(4), p.451-456.

- Young, D.A. et al., 2000. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(7), p.3563-3572.
- Young, J.D., Ko, S.S. & Cohn, Z.A., 1984. The increase in intracellular free calcium associated with IgG gamma 2b/gamma 1 Fc receptor-ligand interactions: role in phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(17), p.5430-5434.
- Yu, X.-Z. et al., 2004. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *The Journal of clinical investigation*, 113(11), p.1624-1630.
- Yuasa, T. et al., 1999. Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *The Journal of experimental medicine*, 189(1), p.187-194.
- Yuwaraj, S. et al., 2001. Genomic characterization, localization, and functional expression of FGL2, the human gene encoding fibroleukin: a novel human procoagulant. *Genomics*, 71(3), p.330-338.
- Zhai, Y. et al., 2002. Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(8), p.4667-4673.
- Zhai, Y. et al., 2006. CD4+ T regulatory cell induction and function in transplant recipients after CD154 blockade is TLR4 independent. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(10), p.5988-5994.
- Zhang, D. et al., 2010. Th1 to Th2 immune deviation facilitates, but does not cause, islet allograft tolerance in mice. *Cytokine*, 51(3), p.311-319.
- Zhang, L. et al., 2004. [Expression of human fibrinogen-like protein 2/fibroleukin in renal acute allograft rejection and its potential clinical implication]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 84(6), p.474-477.
- Zhang, Q. et al., 2005. Inhibition of Src kinases combined with CD40 ligand blockade prolongs murine cardiac allograft survival. *Transplantation*, 80(8), p.1112-1120.
- Zhao, P. et al., 2009. Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(8A), p.1513-1525.
- Zheng, J. et al., 2010. CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells. *Cellular & molecular immunology*, 7(1), p.44-50.
- Zhou, L. et al., 2008. The IL-10 and IFN-gamma pathways are essential to the potent immunosuppressive activity of cultured CD8+ NKT-like cells. *Genome biology*, 9(7), p.R119.
- Zhou, Q. et al., 2011. [Count and function of CD8(+)CXCR3(+) regulatory T cells in peripheral blood of patients with autoimmune hemolytic anemia]. *Zhonghua yi xue za zhi*, 91(24), p.1687-1690.
- Zhu, C.-L. et al., 2005. Fibrinogen-like protein 2 fibroleukin expression and its correlation with disease progression in murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis and in patients with severe viral hepatitis B. *World journal of gastroenterology: WJG*, 11(44), p.6936-6940.

- Zhu, Chuanlong et al., 2006. Novel mfgl2 antisense plasmid inhibits murine fgl2 expression and ameliorates murine hepatitis virus type 3-induced fulminant hepatitis in BALB/cJ mice. *Human gene therapy*, 17(6), p.589-600.
- Zhu, M. et al., 2003. Interleukin-10 modified dendritic cells induce allo-hyporesponsiveness and prolong small intestine allograft survival. *World journal of gastroenterology: WJG*, 9(11), p.2509-2512.
- Zinkernagel, R.M. et al., 1978. Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature*, 271(5642), p.251-253.
- Zuklys, S. et al., 2000. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 165(4), p.1976-1983.
- Zuñiga, E. et al., 2001. Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *Journal of leukocyte biology*, 70(1), p.73-79.

ANNEXES

Article 3

**Mécanismes et localisation des cellules T régulatrices CD8⁺
dans un modèle de tolérance en transplantation cardiaque**

Xian Liang Li, Séverine Ménoret, Séverine Bezie, Lise Caron, Dominique Chabannes, Marcelo Hill, Franck Halary, Mathieu Angin, Michèle Heslan, Claire Usal, Liang Liang, Carole Guillonnet, Brigitte Le Mauff, Maria Cristina Cuturi, Régis Josien and Ignacio Aneon

Article publié dans *J Immunol* 2010;185:823-833;

Titre original: Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance



Full Spectrum Cell Analysis

Over 10,000 Reagents for Life Science Research

Antibodies – Proteins – ELISA & Multiplexing – Buffers & Support



Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance

Xian Liang Li, Séverine Ménoret, Séverine Bezie, Lise Caron, Dominique Chabannes, Marcelo Hill, Franck Halary, Mathieu Angin, Michèle Heslan, Claire Usal, Liang Liang, Carole Guillonneau, Brigitte Le Mauff, Maria Cristina Cuturi, Régis Josien and Ignacio Anegón

This information is current as of April 14, 2011

J Immunol 2010;185:823-833; Prepublished online 11 June 2010;
doi:10.4049/jimmunol.1000120
<http://www.jimmunol.org/content/185/2/823>

- Supplementary Data** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2010/06/09/jimmunol.1000120.DC1.html>
- References** This article cites 53 articles, 22 of which can be accessed free at: <http://www.jimmunol.org/content/185/2/823.full.html#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at <http://www.jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at <http://www.jimmunol.org/etoc/subscriptions.shtml/>

Downloaded from www.jimmunol.org on April 14, 2011

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright ©2010 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance

Xian Liang Li,^{*,†,‡,1} Séverine Ménoret,^{*,†,‡} Séverine Bezie,^{*,†,‡} Lise Caron,^{*,†,‡}
 Dominique Chabannes,^{*,†,‡} Marcelo Hill,^{*,†,‡} Franck Halary,^{*,†,‡} Mathieu Angin,^{*,†,‡}
 Michèle Heslan,^{*,†,‡} Claire Usal,^{*,†,‡} Liang Liang,[‡] Carole Guillonnet,^{*,†,‡}
 Brigitte Le Mauff,[¶] Maria Cristina Cuturi,^{*,†,‡} Régis Josien,^{*,†,‡,||} and Ignacio Anegón^{*,†,‡}

Despite accumulating evidence for the importance of allospecific CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) in tolerant rodents and free immunosuppression transplant recipients, mechanisms underlying CD8⁺ Treg-mediated tolerance remain unclear. By using a model of transplantation tolerance mediated by CD8⁺ Tregs following CD40lg treatment in rats, in this study, we show that the accumulation of tolerogenic CD8⁺ Tregs and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) in allograft and spleen but not lymph nodes was associated with tolerance induction in vascularized allograft recipients. pDCs preferentially induced tolerogenic CD8⁺ Tregs to suppress CD4⁺ effector cells responses to first-donor Ags in vitro. When tolerogenic CD8⁺ Tregs were not in contact with CD4⁺ effector cells, suppression was mediated by IDO. Contact with CD4⁺ effector cells resulted in alternative suppressive mechanisms implicating IFN- γ and fibroblast growth factor-2. In vivo, both IDO and IFN- γ were involved in tolerance induction, suggesting that contact with CD4⁺ effector cells is crucial to modulate CD8⁺ Tregs function in vivo. In conclusion, CD8⁺ Tregs and pDCs interactions were necessary for suppression of CD4⁺ T cells and involved different mechanisms modulated by the presence of cell contact between CD8⁺ Tregs, pDCs, and CD4⁺ effector cells. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 823–833.

Although CD4⁺ regulatory T cells (Tregs) have received considerably more attention (1), CD8⁺ Tregs have been identified both as naturally occurring cells and after different immunotherapy regimen in various pathophysiological situations (2). In organ transplantation, CD8⁺ Tregs have been shown to play a central role in vivo in donor-specific blood transfusion-induced tolerance (3) and anti-ICOS-treated mice (4). Furthermore, we have shown in rats that blockade of CD40–CD40L interactions with CD40lg-induced tolerogenic CD8⁺CD45RC^{low}

Tregs, which generated infectious tolerance upon adoptive transfer (5). CD8⁺CD45RC^{low} Tregs produced IFN- γ , and tolerance was dependent on both IFN- γ and IDO (5). In human transplantation studies, CD8⁺ Tregs have not only been described in kidney (6)-, heart (7, 8)-, and liver-intestine (9)-transplanted patients but also associated with less rejection episodes (7, 8) and even tolerance (6). Although these observations highlight an important role of CD8⁺ Tregs in allograft tolerance, there is a little information about the cellular interactions and anatomical sites associated with their generation, migration, and tolerogenic properties.

CD4⁺ and CD8⁺ Treg (1, 2) function can be modulated by conventional dendritic cells (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). pDCs were shown to induce CD8⁺ Tregs in humans (6, 10, 11), mice, and rats (12–14). In a mouse cardiac transplantation model, pDCs were reported to induce tolerance by inducing CD4⁺ CD25⁺ Tregs in lymph nodes (LNs), and the migration of pDCs to LNs was crucial to induce tolerance (13). Obviously, different DC subsets and their migration profiles may exert different influences in the development of CD8⁺ Tregs and their regulatory function.

The in vivo outcome of DCs and Tregs encounters depends also on the effects of CD4⁺ effector cells which potentiate and modify the suppressive mechanisms of CD4⁺ Tregs (15). This observation introduces an important new concept on the suppressive mechanisms of Tregs, indicating that it is not only bidirectional regulation with DC subsets, but rather a triangle modulation in which T effector cells (Teffs) play also a key role potentiating Treg function.

In the current study, using a model of transplantation tolerance mediated by CD8⁺ Tregs following CD40lg treatment in rats (5), we found that tolerance induction was associated with an accumulation of CD8⁺CD45RC^{low} cells first in the graft and then in the spleen but not in LNs. The splenic compartment appeared to be sufficient at early time points and necessary at late time points for the induction and maintenance of tolerance. pDCs accumulated in the graft and spleen of tolerant animals and preferentially

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 643; ²Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation; ³Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Laboratoire d'Immunologie; and ⁴Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes; ⁵Centre Hospitalier Universitaire Caen, Laboratoire d'Immunologie et d'Immunopathologie, Caen, France; and ⁶Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Key Laboratory of Multi-Organ Transplantation of Ministry of Public Health, First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, People's Republic of China

[†]Current address: Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Bei Jing Chao Yang Hospital, Capital Medical University, Bei Jing, People's Republic of China.

Received for publication January 13, 2010. Accepted for publication April 18, 2010.

This work was supported by a research fellowship from the Transplantation Society and a Senior Basic Science grant from the European Society for Organ Transplantation (to X.L.L.) as well as grants from the Roche Organ Transplantation Research Foundation and the Fondation Transvie (to I.A.). L.L. was supported by a grant of the Administration of Science and Technology of Zhejiang Province, China (2007C24001).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Ignacio Anegón or Dr. Xian Liang Li, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche 643, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, Cedex 1, France. E-mail addresses: Ignacio.Anegón@univ-nantes.fr or Lixl@graduate.hku.hk

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this paper: Ad, adenovirus; BM, bone marrow; BN, Brown Norway; cDC, conventional dendritic cell; DC, dendritic cell; Fgl-2, fibroblast growth factor-2; LN, lymph node; MFI, mean fluorescence intensity; MTHF, methylthiohydantoin tryptophan; PD-1, programmed death-1; pDC, plasmacytoid dendritic cell; Teff, T effector cell; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000120

supported the regulation of alloreactive CD4⁺ T cells by CD8⁺ CD45RC^{low} cells *in vitro*. Finally, we uncovered complex interactions between effector CD4⁺ T cells, pDCs, and CD8⁺ Tregs that resulted in distinct regulatory mechanisms depending on the extent of cell-cell contacts between the different cell populations.

Materials and Methods

Animals and cardiac transplantation models

Heart allotransplantation was performed between whole MHC-incompatible male LEW-1W (donors) and LEW-1A (recipients) rats as described previously (5). The experiments complied with the Institutional Ethical Guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Nantes, France).

Adenovirus-mediated gene transfer and mAb administration

The recombinant noncoding adenovirus (Ad) AdΔ1324 and the Ad encoding for the extracellular portion of mouse CD40 fused to the constant domains of human IgG1 (AdCD40Ig) with the mouse CMV promoter as well as the procedure of intragraft delivery have been described previously (5).

A neutralizing mouse anti-rat IFN- γ mAb (DB1, IgG1; provided by P. H. Van der Meis, Amsterdam, The Netherlands) or the isotype control 3G8 mAb was injected (3 mg/kg) *i.p.* twice a week beginning the day of transplantation. The IDO-specific inhibitor, 1-methyltryptophan, was administered twice daily by oral gavages at 50 mg/dose, as described previously (5). A neutralizing murine anti-TGF- β mAb (2G7; provided by Dr. K. Melief, Amsterdam, The Netherlands) was injected *i.p.* (5 mg/kg) twice a week beginning the day of transplantation as described previously (16). All treatments were continued until rejection or 40 d.

Adoptive transfer

Naive LEW-1A recipients received 4.5 Gy whole-body irradiation on the day before transplantation. Total splenocytes, bone marrow (BM) cells, LNs, or PBLs ($50\text{--}100 \times 10^6$ cells) as well as PKH-labeled pDCs (1.5×10^6 cells) or PKH-labeled CD8⁺ Tregs (2.5×10^6 cells) were adoptively transferred into recipients *i.v.* immediately after allograft implantation.

Purification of T cell subpopulations

T cells were enriched by negative selection from total splenocytes after depletion with a mixture of mAbs reactive with $\gamma\delta$ T cells (V65), B cells (His24, anti-CD45R), NK cells (3.2.3, anti-CD161), and monocytes (OX42, anti-CD11b/c) and magnetic beads (DynaBead, Ceryg Pontoise, France). Enriched T cells were labeled with a mixture of anti-CD45RC-biotin (OX22), anti-CD8 α -PE (OX8), anti-CD6-FITC (OX56), anti-CD25-Alexa647 (OX39), and streptavidin-PE-Cy7. CD8⁺CD45RC^{low} T cells, CD4⁺CD25⁺ T cells, and CD4⁺CD25⁻ T cells were sorted after gating of CD6⁺ cells with a FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA). Purity of sorted populations was >99%.

Purification of DC subsets

DCs subsets were prepared and isolated from spleen as described previously (17, 18). Briefly, spleens were digested by collagenase D, followed by Nycodenz gradient centrifugation and the middle layer of cells was collected as enriched cDCs. cDCs were sorted using the following Abs: anti-TCR (R73-FITC), anti-CD45RA (OX33-FITC), CD103 (OX62-APC), and anti-CD4 (OX35-PE). cDCs were defined as TCR⁺CD45RA⁺CD103⁺ cells and further sorted into CD4⁺ cDCs and CD4⁻ cDCs subpopulations (17). The Nycodenz cell pellet was fractionated by Ficol-Hypaque gradient centrifugation, and middle layer cells were depleted of T cells (R73 and V65 clones) and B (OX33 clone) cells, followed by sorting of pDCs using the following Abs: anti-TCR (R73-FITC), anti-CD45RA (OX33-FITC), CD45R (His24-PE), and anti-CD4 (OX35-APC). pDCs were defined as TCR⁺CD45RA⁺CD45R⁺CD4⁺ cells (18). Cell sorting was performed with a FACS Aria with cell purity of sorted populations >98%.

mAbs and flow cytometry

The Abs used for sorting CD8⁺ T cells and DC subsets were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, U.K.). All biotin-labeled mAbs were visualized using streptavidin-PE-Cy7 (BD Biosciences). Fibroleukin-2 (Fgl-2) was detected using a murine mAb anti-Fgl-2 (Abnova, Heidelberg, Germany). An LSR II cytometer (BD Biosciences) was used to measure fluorescence, and data were analyzed using the FlowJo software

(Tree Star, Ashland, OR). Cells were first gated by their morphology excluding dead cells, and the gates that were used to separate the populations and the percentages of gated cells are depicted in Supplemental Fig. 1.

Mixed leukocyte reaction

For MLR performed in coculture experiments, purified naive CFSE-labeled ($5 \mu\text{M}$ CFSE, 3 min at room temperature) CD4⁺CD25⁻ T cells (2×10^4 cells) were cultured with DCs of different types (5×10^3 cells) in a round-bottom 96-well plate in a final volume of 200 μl complete RPMI 1640 medium, with or without suppressive cells for 6 d at 37°C in 5% CO₂.

For Transwell MLRs, purified naive CD4⁺CD25⁻ T cells (0.4×10^6 cells) were cultured with DCs (10^5 cells) in a V-bottom tube used as a lower chamber. A cell culture insert (BD Biosciences) with 0.4- μm pore size membrane was then inserted into the V tube as an upper chamber. A total of 4×10^6 cells CD8⁺ Tregs with or without pDCs were seeded onto the cell culture insert as an upper chamber. The cells were cultured at 37°C in 5% CO₂ in a final volume of 1 ml complete RPMI 1640 medium for 6 d.

Proliferation of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells was analyzed by flow cytometry after gating TCR⁺CD4⁺ cells.

MLRs were performed in the presence of rat IFN- γ (5000 IU/ml; Roussel Uclaf, Romainville, France), mouse anti-rat IFN- γ mAb (20 or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rabbit anti-rat IL-10 (19) (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, provided by Dr. J. Khalife, Institut Pasteur de Lille, France), murine anti-TGF- β mAb (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), the IDO-specific inhibitor methyl-thiohydantoin-tryptophan (MHT; 20 μM) (Calbiochem, Nottingham, U.K.) (20), B18R from vaccinia virus neutralizing all type I IFNs (21) (eBioscience, San Diego, CA) (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or 2 ng/ml), or an anti-Fgl-2 mAb (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). IFN- γ was measured using ELISA kits (BD Biosciences).

Ag presentation by indirect pathway

Heart resident leukocytes were isolated from donor LEW.1W hearts digested with collagenase D, followed by Ficol gradient centrifugation. Apoptosis was induced by UV irradiation (TUV 30 W/G 30 TB; wavelength 280–340 nm; Philips, Eindhoven, The Netherlands) for 3 h at room temperature. Apoptotic cells were then cultured overnight with recipient (LEW.1A) DC subsets (1:1 ratio) at 10^6 pDCs/ml. Ficol gradient centrifugation was used to harvest DCs loaded with donor alloantigens and eliminated apoptotic cells.

Histological analysis and microscopy

Cryostat sections were harvested and fixed in acetone. Sections were mounted in Prolong Antifade Kit (Molecular Probes, Invitrogen, Ceryg Pontoise, France) and analyzed by confocal microscopy (Leica TCS-SPE, Nanterre, France) with Imagem software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Fgl-2 quantitative RT-PCR

The isolation and retrotranscription of mRNA as well as the quantification of specific mRNA levels using SYBR green technology after normalization to hypoxanthine phosphoribosyltransferase values have been described previously (5). The sequence of primer pairs for rat Fgl-2 was 5'-CAAGACACAACCAACCAATCC-3' (forward) and 5'-CCCAGCCAAAATTCTCGTTCAA-3' (reverse).

Statistics

For graft survival, log-rank test was done. For numbers of DC subsets and proliferation assay, ANOVA test was done to examine individual differences versus various controls. For CD8⁺CD45RC^{low} T cell percentages, one-way ANOVA was done.

Results

Tolerogenic CD8⁺ Tregs sequentially accumulate in the allograft and the spleen

Treatment of graft recipients with AdCD40Ig resulted in long-term cardiac allograft survival (5). Tolerance to cardiac allografts induced by CD40Ig treatment could be adoptively transferred exclusively by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, whereas CD8⁺CD45RC^{low} T cells from naive animals failed to do so (5). Thus, CD8⁺CD45RC^{low} cells from naive animals versus tolerant CD40Ig-treated transplanted recipients will be hereafter referred to as natural (or naive) versus tolerogenic CD8⁺ Tregs, respectively. In previous work and in the present paper, adoptive transfers were performed with recipient cells isolated at different time after

CD40lg treatment and transferred to graft recipients sublethally irradiated the day before transplantation. Tolerance was induced in 50% of recipients that were transferred with splenocytes harvested after 1 wk of treatment, and this frequency was increased to 100% when splenocytes were harvested 1 or 3 mo after treatment (Fig. 1A). In contrast, graft survival was not prolonged after adoptive transfer of the same numbers (Fig. 1B) or even double numbers (data not shown) of LN cells. To examine the role of cells present within the allograft in the prevention of rejection, tolerant allografts were retransplanted into naive recipients without CD40lg treatment. Even though they were eventually rejected in <45 d, retransplanted allografts survived significantly longer than primary allografts (Fig. 1C).

The data above suggested that CD8⁺ Tregs present in both spleen and allograft could contribute to graft acceptance. The presence of CD8⁺CD45RC^{low} T cells was thus analyzed in the spleen, LN, and allograft at 1 wk, 1 mo, and 3 mo after treatment with CD40lg. Tolerogenic CD8⁺ Tregs appeared firstly in the allograft (1 wk) and later in the spleen (1 mo) but never in LNs (Fig. 1D). One week after CD40lg treatment, the proportion of tolerogenic CD8⁺ Tregs increased rapidly in the allograft and then remained stable, whereas it took 3 mo to reach similar levels in the spleen (Fig. 1E). Control animals treated with Add1324 virus showed lower proportion of CD8⁺CD45RC^{low} cells in the spleen

at 3 mo after transplantation, comparable to that of naive animals (data not shown). To further investigate whether the organ distribution of CD8⁺ Tregs correlated with their tolerogenic properties, PKH-labeled natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs were adoptively transferred into recipients immediately after transplantation. Tolerogenic CD8⁺ Tregs migrated to the cardiac graft within 5 d, whereas natural CD8⁺ Tregs did not (Fig. 1F). A higher proportion of tolerogenic CD8⁺ Tregs was observed in the spleen compared with natural CD8⁺ Tregs and little to none tolerogenic or natural CD8⁺ Tregs were observed in LNs (Fig. 1F) or the recipient native heart (data not shown). Thus, long-term allograft survival was associated with accumulation of tolerogenic CD8⁺ Tregs first in the allograft and later in the spleen.

The spleen is dispensable for the generation but necessary for the long-term maintenance of tolerogenic CD8⁺ Tregs

To investigate the role of the spleen in the development of tolerogenic CD8⁺ Tregs, we treated graft recipients with a suboptimal dose of CD40lg to induce tolerance in ~50% of recipients. Splenectomy performed on the day of transplantation together with a suboptimal dose of CD40lg treatment increased allograft survival rates to 100%, whereas splenectomy alone did not alter allograft survival (Fig. 2A). Splenectomy 3 mo after treatment did not abrogate long-term allograft survival (Fig. 2B). In contrast, allografts were rejected when the

FIGURE 1. Tissue distribution of tolerogenic CD8⁺ Tregs. To analyze the for the presence of CD8⁺ Tregs, allograft survival rates were compared after adoptive transfer of 50×10^6 cells isolated at different times after transplantation from LEW-1A rats treated with control Ad or AdCD40lg and transplanted with cardiac grafts (A–C). A, Adoptive transfer of splenocytes ($n = 4$ –6/group). * $p < 0.05$ compared with all other groups. B, Adoptive transfer of LN cells ($n = 4$ –6/group). C, Tolerant allografts (survival > 3 mo) or normal donor grafts were transplanted into naive irradiated recipients ($n = 3$) * $p < 0.05$ compared with all other groups. Direct identification of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs was performed by flow cytometry analysis (D, E). D, CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were analyzed in spleen, LN, and allografts in recipients treated with CD40lg at the indicated time points. Cells were gated by morphology and TCR⁺CD8⁺ cells (Supplemental Fig. 1) were analyzed for CD45RC expression. Data are representative of at least three independent experiments at each time point. E, Same experiments as in D expressed as percentage mean \pm SD of the percentage of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs among TCR⁺CD8⁺ T cells from three to five animals treated with CD40lg sacrificed at each time point. ** $p < 0.01$ compared with LN group. The migratory capacity of CD8⁺ Tregs was analyzed by adoptive transfer experiments. F, Natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs were sorted from naive or tolerant recipients, labeled with PKH26, and adoptively transferred into naive irradiated and transplanted recipients. The presence of PKH-labeled CD8⁺ Tregs was analyzed by confocal microscopy in spleen, LN, and allografts collected 5 d after adoptive transfer (original magnification $\times 63$).

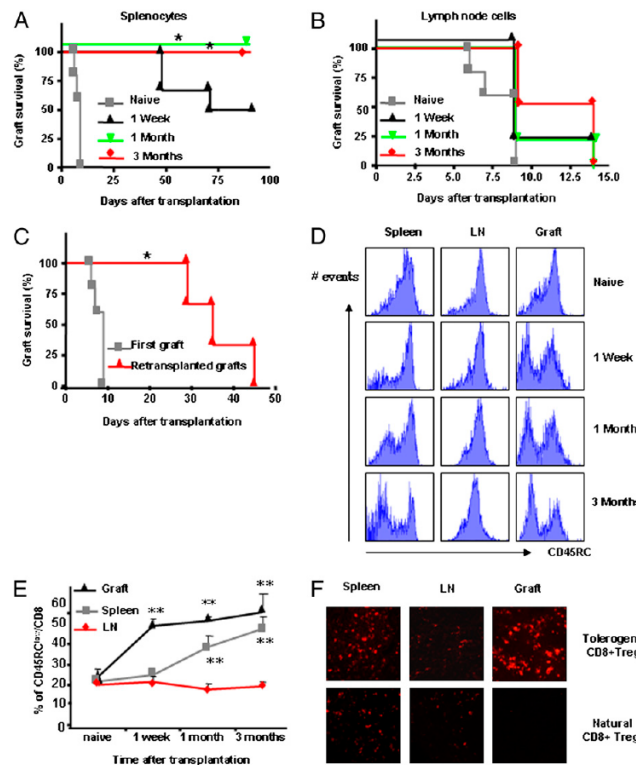
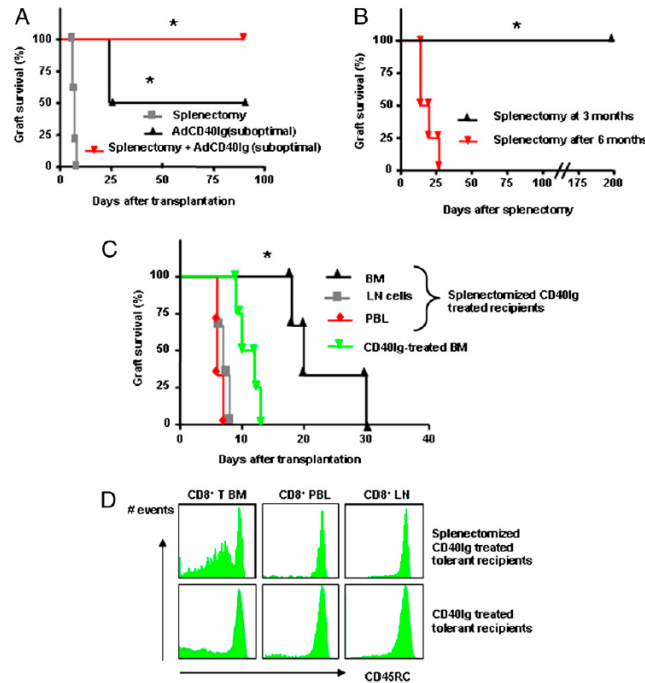


FIGURE 2. Role of lymphoid organs and BM in the induction and maintenance of tolerance by CD8⁺ Tregs. To analyze the role of spleen in graft survival was analyzed in recipients that received different doses of AdCD40lg and were splenectomized at different time points (A, B). A, Graft survival rates in recipients treated with a sub-optimal dose of AdCD40lg associated or not with splenectomy ($n = 4/\text{group}$). $*p < 0.05$ compared with all other groups. B, Graft survival rates among recipients who received a full dose of AdCD40lg and were splenectomized at 3 or 6 mo after transplantation. Day 0 represents the day at which splenectomy was performed ($n = 4/\text{group}$). To analyze the localization of tolerogenic CD8⁺ Tregs in splenectomized recipients with long-surviving grafts, cell adoptive transfer experiments and flow cytometry experiments were performed in other lymphoid organs or BM (C, D). C, Graft survival rates after adoptive transfer (50×10^6 cells) of LN cells, PBLs, and BM cells collected from splenectomized recipients harboring long-term surviving allografts ($n = 4$ per group). BM cells from CD40lg-treated and transplanted but not splenectomized recipients were used as control. $*p < 0.05$ compared with all other groups. D, Tolerogenic CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were analyzed in BM, PBL, and LN 3 mo after transplantation in recipients treated with CD40lg and splenectomized (upper panels) or treated with CD40lg only (lower panels). Data are representative of four independent experiments.



spleen was removed 6 mo after CD40lg treatment (Fig. 2B). These very contrasted data following splenectomy suggest that although tolerogenic CD8⁺ Tregs were present in the spleen at earlier time points after transplantation (≈ 3 mo), their removal was dispensable for maintaining tolerance suggesting the presence of CD8⁺ Tregs in other organ compartments. Furthermore, because splenic tolerogenic CD8⁺ Tregs can transfer tolerance while removal of spleen on day 0 improved the survival of allografts, both rejection and tolerance mechanisms occurred simultaneously in the spleen.

We examined the anatomic location of tolerogenic CD8⁺ Tregs in splenectomized recipients with long-term surviving allografts. Adoptive transfer of LN cells, PBLs, and BM cells from splenectomized tolerant recipients was performed. Partial but significant prolongation of allograft survival was observed only with the transfer of BM cells (Fig. 2C). In contrast, adoptive transfer of BM cells from CD40lg-treated rats with an intact spleen did not prolong allograft survival (Fig. 2C). Furthermore, in splenectomized recipients with long-term surviving grafts, an expansion of CD8⁺CD45RC^{low} T cells was observed in the BM, but not in LN and peripheral blood, whereas CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were present at a much lower frequency in the BM of CD40lg-treated animals (Fig. 2D) or naive rats (data not shown). These data suggest that, in splenectomized animals, the BM could substitute for the spleen as a reservoir of tolerogenic CD8⁺ Tregs.

Thymus was also dispensable to generate the tolerogenic mechanism because tolerance was induced in all recipients after thymectomy at the day of transplantation (Supplemental Fig. 2) and could be adoptively transferred to naive recipient by splenocytes from thymectomized animals (data not shown).

Differential accumulation of pDCs in the spleen and allograft in tolerant versus rejecting recipients

The number of cells in different DC subsets was compared in the spleen of recipients that rejected or tolerated allografts. Numbers of pDCs were mostly stable in tolerant spleen, although they slightly increased 3 mo after transplantation. In contrast, numbers of pDCs in rejected spleen were dramatically decreased in the early phase (rejection occurred between 6 and 9 d), reaching less than half at 2 wk and recovering after 3 mo (Fig. 3A). Numbers of CD4⁺ cDCs in tolerant spleen increased in the first week, remained high at 2 wk, and decreased to pretransplantation levels by 3 mo (Fig. 3B). The numbers of CD4⁺ cDCs in rejected spleen also increased in the first week and then decreased rapidly to pretransplantation levels by 2 wk. The changes in numbers of CD4⁺ cDCs were similar in rejected and tolerant spleens, increasing during the first week, and stably returning to pretransplantation levels after 2 wk (Fig. 3C). Thus, although changes in numbers of splenic CD4⁺ cDCs and CD4⁺ cDCs were associated temporally with the early inflammatory response in both rejecting and tolerant recipients, pDCs were the only DC subset characterized by dynamic changes that correlated with the outcome of the allograft.

The presence of pDCs was analyzed in the LN and allograft 5 d after transplantation. The percentage of pDCs in LNs was similar in rejecting and tolerant recipients (Fig. 3D). In contrast, in the graft, pDCs were observed in higher percentages in tolerant allografts versus rejected allografts (Fig. 3D) and were also present in long-surviving allografts (data not shown) suggesting that the preferential migration of pDCs to long-term surviving allografts was important to

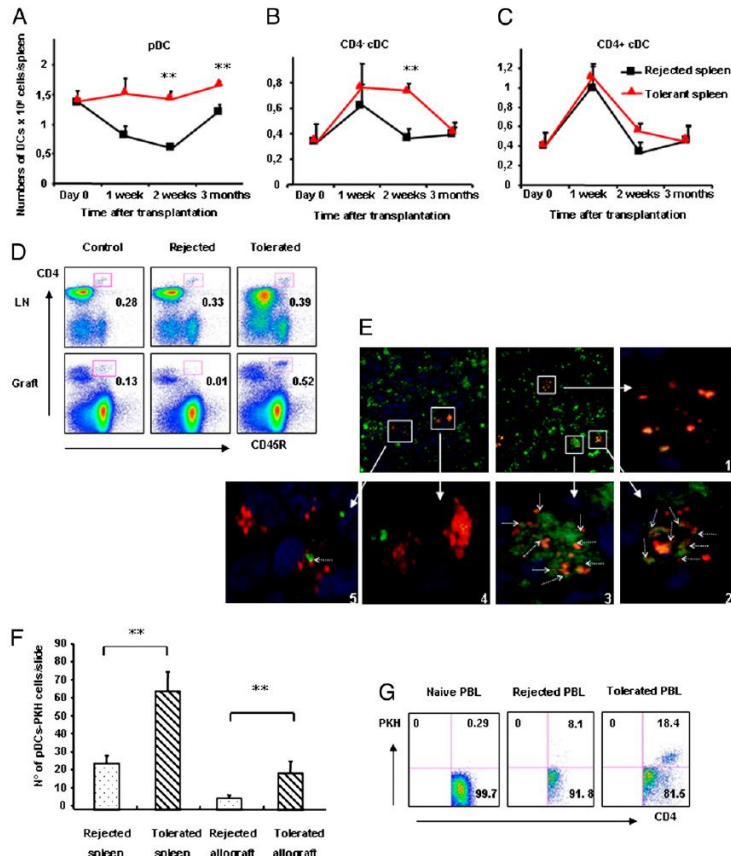


FIGURE 3. DC subsets organ distribution and pDC accumulation in long-term allograft recipients. Grafted recipients treated with CD40lg were sacrificed at the indicated time points and analyzed for the presence of different DCs populations by flow cytometry (A–D). Absolute numbers of pDCs (A), CD4⁻ cDCs (B), and CD4⁺ cDCs (C) in spleen from rejecting (squares) or tolerant (triangles) recipients were compared at indicated times after transplantation. At least $n = 4$ in each time point and each group, total $n = 35$, generated in 15 different experiments. $**p < 0.01$. D, Percentage of pDCs (gated as TCR⁻CD4⁺CD45R⁺; Supplemental Fig. 1) in LNs and allografts at day 5 after transplantation in syngeneic, rejected, or tolerant recipients. Data are representative of three independent experiments. The accumulation of pDCs was evaluated by adoptive cell transfer experiments using PKH-labeled cells (E–G). E, PKH-labeled pDCs were adoptively transferred in along with CFSE-labeled natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs to mimic rejection or long-term allograft survival conditions (samples labeled rejected and tolerated, respectively). The samples were collected on day 5 and analyzed by confocal microscopy or cytofluorimetry. The spleens were analyzed by confocal microscopy (upper panels, original magnification $\times 63$; lower panels were digitally amplified to original magnification $\times 200$). CD8⁺ Tregs are green, and pDCs are red. Data representative of three independent experiments and in each spleen at least five sections were analyzed. F, The numbers of PKH-positive pDCs in spleen and allograft were presented as cells per field. At least two sections were counted for each sample and at least six independent fields were analyzed for each section. $**p = 0.0006$ for tolerant spleen versus rejected spleen; $**p = 0.008$ for tolerant allograft versus rejected allograft. G, After gating TCR⁻CD4⁺ cells PKH-positive pDCs in peripheral blood were compared between rejected and tolerant groups by flow cytometry. Data are representative of three independent experiments.

prevent acute rejection and induce tolerance. cDCs populations in LNs were not different in the experimental groups at day 5 after transplantation, and it was not possible to identify them using the conditions used in lymphoid organs, probably because of inflammatory and necrotic cells during acute rejection (data not shown).

Because numbers of pDCs in tissues correlated with induction of tolerance by CD40lg, we examined the relationship between pDCs and tolerogenic CD8⁺ Tregs that mediate this tolerant state (5). The

presence and accumulation of pDCs were analyzed in vivo by tracing PKH-labeled naive pDCs from recipient origin adoptively transferred simultaneously with natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs, and animals were sacrificed at day 5. The use of recipient pDCs aimed to reproduce the changes observed in the distribution of pDCs described above and also on the fact that recipient pDCs were able to present donor Ags to CD8⁺ Tregs and trigger suppression (see next section). The use of natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs

aimed to mimic the outcome of the graft, rejection or tolerance, but the early timing of sacrifice was necessary to analyze the fate of this cells within the graft before complete rejection (~ day 7).

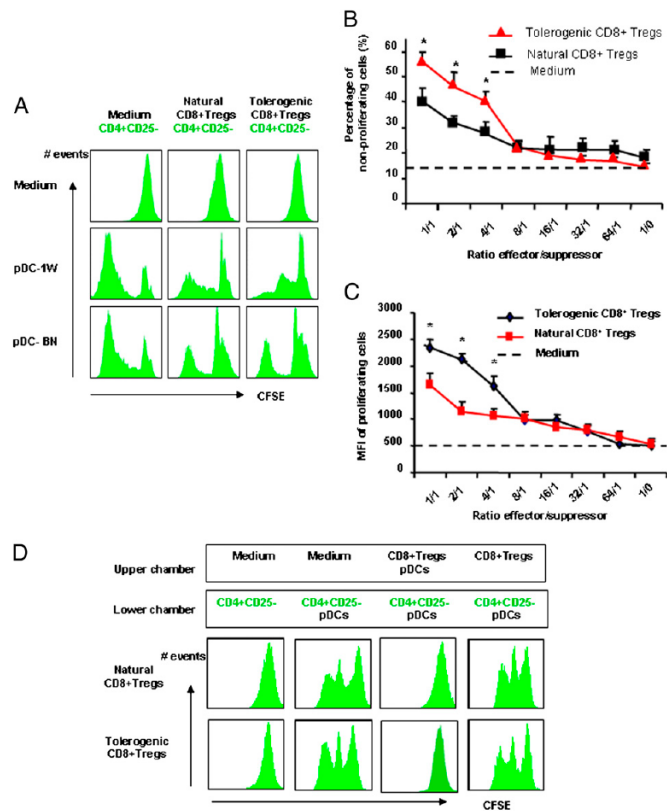
PKH-labeled pDCs in spleens were more frequently juxtaposed to CFSE-labeled tolerogenic CD8⁺ Tregs compared with natural CD8⁺ Tregs (Fig. 3E). The numbers of CFSE-labeled tolerogenic CD8⁺ Tregs were higher versus natural CD8⁺ Tregs in the spleen (608 ± 11 versus 365 ± 13 CFSE⁺ cells/section; $n = 12$; $p < 0.05$), and the percentage in contact with PKH-labeled pDCs was also higher with tolerogenic versus natural CD8⁺ Tregs (23.7 versus 10.4%, respectively; $p < 0.05$). Enumeration of PKH-labeled pDCs showed that numbers of pDCs were significantly higher in the spleen and graft when pDCs were cotransferred with tolerogenic compared with naive CD8⁺ Tregs (Fig. 3F).

Furthermore, PKH-labeled pDCs were not observed in LNs (data not shown). Cytofluorimetry analysis of PBMCs showed a significantly higher percentage of PKH⁺ pDCs in recipients transferred with tolerogenic CD8⁺ Tregs compared with naive CD8⁺ Tregs (Fig. 3G). PKH-labeled pDCs were also observed in the BM of recipients transferred with tolerogenic or naive CD8⁺ Tregs without significant differences (data not shown). Thus, tissue accumulation of pDCs correlated with both graft outcome and localization of tolerogenic CD8⁺ Tregs, suggesting privileged interactions between the two cell subsets.

CD8⁺ Tregs donor-specific suppression is preferentially induced by pDCs

Donor pDCs or cDCs were purified and used as stimulators in an in vitro suppression assay where CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ responder T cells were cocultured in the presence or absence of natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs. Both natural and tolerogenic CD8⁺ Tregs suppressed the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of first-donor- and third-party-derived immature pDCs but tolerogenic CD8⁺ Tregs showed significantly higher suppression when using first donor-derived but not third-party pDCs (Fig. 4A). The enhanced suppressive effect of tolerogenic CD8⁺ Tregs when using first-donor pDCs was dose dependent when analyzed both at the level of percentage of nonproliferating cells (Fig. 4B) and mean fluorescence intensity of proliferating cells (Fig. 4C). When either of the two rat cDC populations (CD4⁺ or CD4⁻) (17, 22) of first donor origin were used in the suppressive MLR assay, suppression of CD4⁺ T cell proliferation was induced by natural and tolerogenic CD8⁺ Tregs in the presence of CD4⁻ cDCs, whereas no or little suppression was observed with CD4⁺ cDCs (Supplemental Fig. 3A–C). Taken together, these results show that pDCs were the most effective DC subset to mediate donor specific suppression by tolerogenic CD8⁺ Tregs and that the suppression was higher when using first

FIGURE 4. Suppressive activity of tolerogenic versus natural CD8⁺ Tregs was preferentially induced by interaction with pDCs. Regulatory function of natural and tolerogenic CD8⁺ Tregs was analyzed by measuring their capacity to suppress MLR assays. The proliferation of naive CFSE-labeled LEW.1A CD4⁺CD25⁻ T cells against alloantigens presented by LEW.1W pDCs was analyzed after 6 d of culture in the absence or presence of LEW.1A natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs. **A**, Representative experiment in which natural and tolerogenic CD8⁺ Treg suppressive activity was analyzed following gating on TCR⁺CD4⁺ of CFSE-labeled naive LEW.1A CD4⁺CD25⁻ T cells after culture with medium alone or pDCs from LEW.1W or BN origin (1:1 ratio for effector/suppressor). **B**, Same suppressive assay performed using decreasing ratios of effector/suppressor cells. Results are depicted as the percentage of nonproliferating CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells. Data are the mean \pm SD of three independent experiments. Dotted line represents values obtained in the absence of CD8⁺ Tregs. $*p < 0.05$ tolerogenic versus natural CD8⁺ Tregs. **C**, Same suppressive assay with results depicted as the MFI of CD4⁺CD25⁻ proliferating cells. Dotted line represents values obtained in the absence of CD8⁺ Tregs. $*p < 0.05$ tolerogenic versus natural CD8⁺ Tregs. **D**, Transwell experiments were performed using CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells, CD8⁺ Tregs (1:1 ratio for effector/suppressor), and donor pDCs distributed as shown in the figure and analyzed after 6 d of coculture. Data are representative of five independent experiments. BN, Brown Norway; MFI, mean fluorescence intensity.



donor-derived pDCs, in keeping with the previously demonstrated alloantigen-specificity of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs (5).

To analyze whether CD8⁺ Tregs could also suppress the indirect alloantigen presentation pathway, we used recipient pDCs loaded with apoptotic PKH-labeled donor cells (Supplemental Fig. 4A). Proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells was observed when cultured with recipient pDCs loaded with donor alloantigens and not with apoptotic donor cells alone in the absence of recipient pDCs (Supplemental Fig. 4B). Suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation induced by indirect alloantigen presentation was most effectively achieved by tolerogenic CD8⁺ Tregs in the presence of recipient pDCs (Supplemental Fig. 4C, 4D). These results demonstrate that rat pDCs can cross-present Ags as was previously observed in humans and mice (23) and that both indirect and direct donor alloantigen presentation by pDCs resulted in stronger donor-specific suppressive activity by tolerogenic CD8⁺ Tregs compared with natural CD8⁺ Tregs.

Transwell experiments were performed to test whether the suppressive function of CD8⁺ Tregs was dependent on cell contact. Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cells stimulated with allogeneic pDCs in the lower chamber was strongly suppressed by the addition of tolerogenic CD8⁺ Tregs together with pDCs in the

upper chamber (Fig. 4D). In the Transwell assay, we did not observe higher suppression by tolerogenic versus naive CD8⁺ Tregs, as we did in the coculture system, suggesting different suppressive mechanisms in each situation. However, tolerogenic CD8⁺ Tregs without direct contact with allogeneic pDCs in the upper chamber did not exert suppression of CD4⁺ effector T cells in the lower chamber (Fig. 4D). The same results were obtained with recipient pDCs loaded with donor Ags (data not shown). These data indicate that the suppressive function of CD8⁺ Tregs required contact-dependent stimulation at least by pDCs, whereas suppression itself occurred independently of regulatory/effector T cells contacts.

Contact with CD4⁺ T cells modifies the suppressive mechanisms of tolerogenic CD8⁺ Tregs

Because suppression by CD4⁺CD25⁺ Tregs is modified and potentiated by cell contact with CD4⁺ effector cells (15), we tested whether contact with CD4⁺ cells would modify the suppressive mechanisms of tolerogenic CD8⁺ Tregs.

In vitro, Transwell experiments showed that the suppressive function of tolerogenic CD8⁺ Tregs was abrogated by an IDO inhibitor when Tregs were not in direct contact with CD4⁺ Teffs (Fig. 5A). In contrast, although IFN- γ can induce IDO (24), IFN- γ

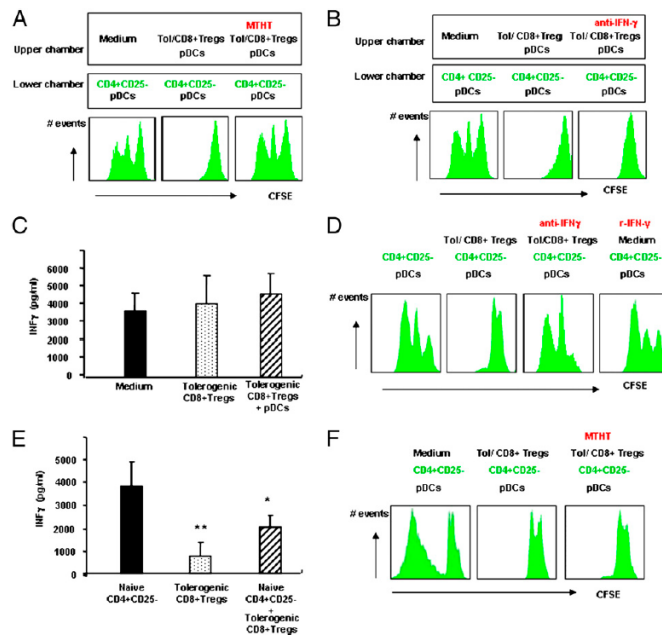


FIGURE 5. Suppressive mechanisms by tolerogenic CD8⁺ Tregs are modified by cell contact with CD4⁺ T cells. Recipient tolerogenic CD8⁺ Tregs were cultured with donor pDCs, and recipient CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells either in coculture or Transwell MLRs in the presence of different blocking molecules and proliferation were analyzed by CFSE dilution. **A**, The effect of the IDO inhibitor MTHIT (20 μ M) on the suppressive function of CD8⁺ Tregs was determined by analysis of the dilution of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells in a Transwell MLR. Data representative of five or three independent experiments, respectively. **B**, The effect of the neutralizing IFN- γ Ab (100 μ g/ml) on the suppression of proliferation of naive CD4⁺CD25⁻ T cells by tolerogenic CD8⁺ Tregs analyzed in a Transwell MLR. Data are representative of three independent experiments. **C**, Concentration of IFN- γ in the supernatant of Transwell MLRs. **D**, The effect of neutralizing anti-IFN- γ mAb (100 μ g/ml) and rIFN- γ (5000 U/ml) was analyzed in a coculture MLR. Data are representative of five independent experiments. **E**, Concentration of IFN- γ in the supernatant of coculture MLR ($n = 3$). $**p = 0.0007$; $*p = 0.03$ versus naive CD4⁺CD25⁻. **F**, The effect of inhibition of IDO by MTHIT (20 μ M) was analyzed in a coculture MLR. Data are representative of five independent experiments.

was not responsible for the contact-independent suppression of CD4⁺ T cells, because a neutralizing anti-IFN- γ Ab did not reverse suppression (Fig. 5B), and concentrations of IFN- γ in the supernatant did not correlate with suppression (Fig. 5C). These results also indicate that IDO-mediated suppression by CD8⁺ Tregs inhibited the proliferation but not the effector function of CD4⁺ T cells assessed by IFN- γ production. Because IDO is also induced by type I IFNs (24), we tested the effect of the viral molecule B18R (which neutralizes all type I IFNs) (21). Suppression was still observed in the presence of B18R (data not shown), indicating that production of IDO was controlled by IFN-independent mechanisms.

We examined whether the suppressive mechanisms of tolerogenic CD8⁺ Tregs could be modified after contact with CD4⁺ cells by analyzing the suppressive function of CD8⁺ Tregs in a coculture MLR containing CD8⁺ Tregs, pDCs, and CD4⁺ cells. Although tolerogenic CD8⁺ Tregs suppressed CD4⁺ T cell proliferation as efficiently as in the Transwell system, the addition of neutralizing anti-IFN- γ Ab abrogated the suppression by CD8⁺ Tregs in the coculture MLR (Fig. 5D). In contrast, addition of soluble IFN- γ protein alone did not suppress the proliferation of CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 5D). Furthermore, the addition of tolerogenic CD8⁺ Tregs to the coculture system significantly suppressed the production of IFN- γ (Fig. 5E), indicating that tolerogenic CD8⁺ Tregs inhibited both the proliferation and effector function of CD4⁺ T cells and suggesting that the mechanisms of suppression were distinct from the Transwell experiments. In support of this, suppression by CD8⁺ Tregs in the coculture MLR was not due to the induction of IDO, because IDO inhibitors did not restore CD4⁺ proliferation (Fig. 5F). Thus, contacts with CD4⁺ T cells modified the suppressive mechanisms of CD8⁺ Tregs to an IFN- γ -dependent mechanism, different from the IDO-dependent mechanism observed when cells were not in contact in the Transwell system.

Our previous *in vivo* data supports a role for both IDO- and IFN- γ -dependent mechanisms in allograft tolerance. We previously reported that both IDO and IFN- γ were crucial in the maintenance phase of long-term allograft survival after adoptive transfer of CD8⁺ Tregs (5). We now further confirm that IDO and IFN- γ are necessary in the induction phase of long-term allograft survival by CD40lg treatment, because graft rejection was triggered after administration at the day of transplantation of an IDO inhibitor in 60% of recipients (Supplemental Fig. 5A) and in 75% of recipients after administration of an anti-IFN- γ Ab (Supplemental Fig. 5B).

Fgl-2 is involved in suppression when CD8⁺ Tregs are in contact with CD4⁺ T cells

To identify other mediators potentially involved in suppression by CD8⁺ Tregs, we performed microarray analysis to compare tolerogenic versus naive CD8⁺ Tregs from spleen from recipients of long-surviving allografts (>100 d) and naive animals and showed increased expression of several potentially regulatory molecules in tolerogenic CD8⁺ Tregs. Among them was Fgl-2, which has been shown to have suppressive functions on CD4⁺ effector T cells through action on DCs (25). We confirmed that Fgl-2 expression was significantly increased in tolerogenic compared with naive CD8⁺ Tregs by quantitative RT-PCR (Fig. 6A) and at protein level at the membrane of cells by FACS analysis (Fig. 6B) and by confocal microscopy within the cells (Fig. 6C). Importantly, inclusion of a neutralizing anti-Fgl-2 Ab restored CD4⁺ T cell proliferation in the coculture MLR suppression assay (Fig. 6D). These results suggest that Fgl-2, a molecule induced by IFN- γ (25), was one of the mediators of CD8⁺ Treg suppression when CD4⁺ and CD8⁺ Tregs were in contact. Altogether, although both

IFN- γ - and IDO-dependent mechanisms coexisted *in vivo* for tolerance induction by tolerogenic CD8⁺ Tregs, these pathways occurred independently and differentially depending on cell contacts with CD4⁺ T cells, which switched suppression from an IDO-dependent mechanism in the absence of contacts to an IFN- γ - and Fgl-2-dependent mechanism in the presence of contacts.

Discussion

In this model of vascularized heart transplantation in rats, we have defined the kinetics, tissue distribution, and cellular interactions underlying tolerance induction by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs following CD40lg treatment. We demonstrate that the accumulation of tolerogenic CD8⁺ Tregs first occurs within the allograft, whereas maintenance of long-term tolerance requires the splenic compartment. pDCs appear to play a predominant role in the tolerogenic process as their dynamics correlate with both allograft outcome and tissue distribution of tolerogenic CD8⁺ Tregs *in vivo*, and they preferentially induce Tregs suppression *in vitro*. Distinct mechanisms of suppression occurred depending on cellular interactions taking place in the MLR *in vitro*. In particular, the presence or absence of contacts between CD8⁺ Tregs and CD4⁺ Teffs resulted in a switch between an IFN- γ - and Fgl-2-dependent mechanism and an IDO-dependent mechanism of suppression, respectively. Because both IFN- γ and IDO are important for tolerance mediated by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs *in vivo* (5), these results suggest that CD8⁺ Tregs suppress alloreactive CD4⁺ responses by both contact-dependent and -independent mechanisms after CD40lg treatment.

The spleen was dominant among lymphoid organs to generate and maintain tolerogenic CD8⁺ Tregs because tolerance could be transferred with splenocytes early after transplantation and rejection occurred upon splenectomy long-term after transplantation. Alloantigen priming from vascularized organs has been shown to occur both in the spleen and the LN (26). In a rat heart allotransplantation model similar to ours (27), blood was the preferential route for migration of recipient DCs into the graft and later for both donor and recipient DC migration into the spleen with no migration into regional LNs. This is opposed to islets grafted under the kidney capsule where lymphatic drainage is largely predominant. In our model, at early time points, spleen could be partially replaced by BM, which contained CD8⁺ Tregs and prolonged allograft survival upon transfer. BM is part of the lymphocyte recirculation pool, and CD4⁺CD25⁺ Tregs can accumulate in the BM (28). Our results showing accumulation of tolerogenic CD8⁺ Tregs first in the graft and later in the spleen are concordant with a recent model of islet transplantation where CD4⁺ Tregs first transit to the graft before migrating to lymphoid organs (29). CD8⁺ Tregs have also been shown to accumulate in tumor sites (11), allografts (4), or inflamed lymphoid tissue (30). The observation that transferred tolerogenic CD8⁺ Tregs were found in higher numbers in the graft and spleen compared with natural CD8⁺ Tregs may represent increased migration, as previously observed for CD4⁺ Tregs (29). In this regard, a pangenomic microarray analysis showed an increase (fold increase versus naive CD8⁺ Tregs) of several molecules, which could explain different migratory profiles, such as CXCR3 (2.55), CCR5 (9.63), CCR2 (6.6), and CCL5 (4.75), that were confirmed by quantitative RT-PCR (data not shown).

In tolerant animals, transferred pDCs accumulated in the graft, spleen, blood, and BM but not in LNs, and this distribution is concordant with the preferential hematogenous route for pDC migration (31). In contrast, during rejection, numbers of pDCs in

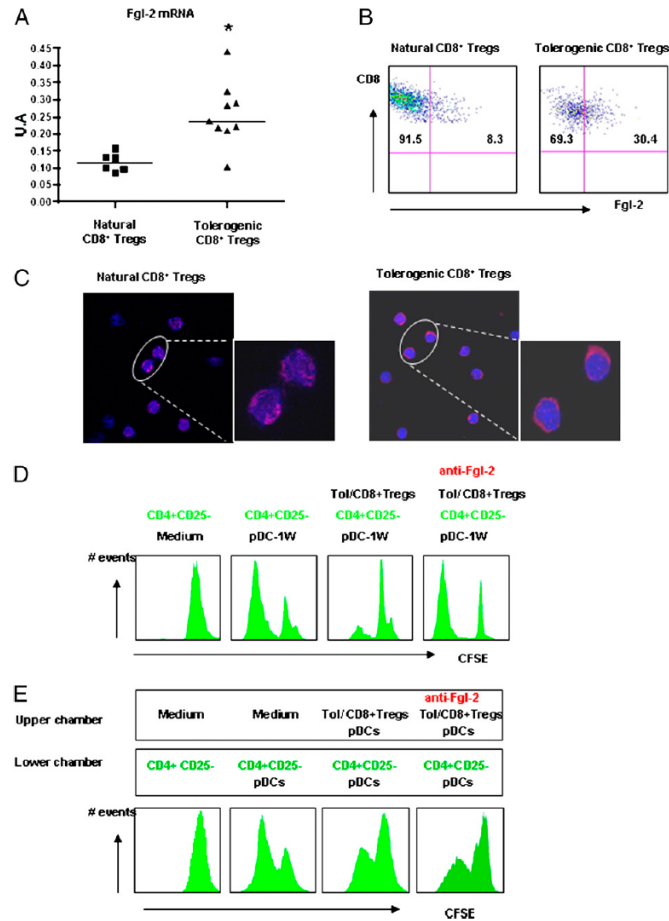


FIGURE 6. Fgl-2 is involved in the suppressive effect of tolerogenic CD8⁺ Tregs. Tolerogenic and natural CD8⁺ Tregs were isolated from spleen from recipients of CD40lg-treated long-surviving allografts (>100 d) and naive animals and analyzed for Fgl-2 expression and its role in suppressive function. *A*, Fgl-2 mRNA levels by quantitative RT-PCR. Symbols represent cells from individual animals. **p* < 0.05. *B* and *C*, Fgl-2 protein levels in naive and tolerogenic CD8⁺ Tregs as analyzed by FACS (*B*) and confocal (*C*) analysis (original magnification $\times 63$). Data are representative of three independent experiments. The effect of neutralizing anti-Fgl-2 Abs (20 μ g/ml) on the suppression of naive CD4⁺CD25⁻ T cells by tolerogenic CD8⁺ Tregs analyzed in coculture MLR (*D*) and Transwell MLR (*E*). Data are representative of three independent experiments for each type of MLR.

the spleen decreased dramatically. The intra-graft accumulation of pDCs in CD40lg-treated recipients is reminiscent of tolerance (anti-CD40L plus donor-specific blood transfusion) in a cardiac graft model in mice (13), but pDC migration differed between the two models because tolerance was associated with accumulation of pDCs to LNs in the mouse model and to the spleen in our model. Furthermore, in this mouse model, tolerance was associated with CD4⁺CD25⁺ Tregs (13). These differences may be explained by the use of distinct species and tolerance protocols. The suppressive function of CD8⁺ Tregs was observed in the presence of pDCs and CD4⁺ cDCs but not CD4⁺ cDCs, so we cannot exclude a role for CD4⁺ cDCs in tolerance induction in our model. Nevertheless, donor-specific suppression was only mediated by pDCs. CD8⁺ Tregs displayed donor alloantigen recognition in both direct and indirect Ag presentation pathways. CD4⁺CD25⁺ Tregs with both specificities are more efficient to inhibit allograft rejection (32), suggesting that both pathways could participate in suppression by CD8⁺ Tregs.

The tolerance induced by CD8⁺ Tregs in our model could be explained by the action of Tregs on DCs (1), as previously reported for CD4⁺ Tregs (33, 34) and CD8⁺ Tregs (7, 35). Conversely, pDCs can induce allospecific CD8⁺ Tregs (6, 11) and CD4⁺ Tregs through mechanisms, such as IDO (12). IDO exists as two isoforms, IDO1 and IDO2 (36, 37), and although IDO1 was expressed by pDCs (data not shown), the expression of IDO2 and, more importantly the function of IDO1 and/or IDO2 in pDCs in this model, requires further research. Contact with pDCs was necessary to trigger suppression by tolerogenic CD8⁺ Tregs in our model. Although CTLA4 (33, 34) or the programmed death-1 (PD-1) ligand (4) have been involved in suppression by subsets of CD4⁺ or CD8⁺ Tregs, they did not play a role in suppression by our tolerogenic CD8⁺ Tregs because anti-CTLA4 or the PD-1 Fc did not reverse suppression in vitro (data not shown). Fgl-2 participated in the suppressive mechanism of CD8⁺CD45R^{low} Tregs because Fgl-2 was selectively increased in tolerogenic CD8⁺ Tregs, and suppression was abrogated by Fgl-2 blockade

in coculture MLR. Fgl-2 is a membrane and/or secreted molecule induced by IFN- γ and produced by CD4⁺CD25⁺ Tregs (38) and TCR⁺CD8⁺ $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes (39). Fgl-2 has been reported to inhibit T cell proliferation and DC maturation (25) through binding to T cells (25) or Fc γ R1B on DCs (40). We have observed that, similar to human, rat pDCs express Fc γ R1B (data not shown). Thus, IFN- γ -induced Fgl-2 expressed by tolerogenic CD8⁺ Tregs could inhibit CD4⁺ proliferation through interaction with Fc γ R1B on pDCs. Enough neutralizing anti-Fgl-2 Ab to administrate to CD40lg-treated rats was not available, but gene transfer in vivo using adeno-associated vectors encoding for rat Fgl-2 significantly promoted allograft survival (unpublished observation), giving indirect support to a role for Fgl-2 inhibiting allogeneic immune responses in vivo.

Interestingly, cell contact with CD4⁺ effector cells modified the suppressive mechanisms used by CD8⁺ Tregs because IFN- γ and Fgl-2 became predominant, in contrast to Transwell MLR where suppression was IDO-dependent but IFN- γ and Fgl-2 independent. A complete anti-Fgl-2 effect in coculture but not Transwell and Fgl-2 in the supernatant was detected in MLR the presence of CD8⁺ Tregs coculture but not Transwell (data not shown). As previously described (33, 34), it is possible that CD4⁺ cells inhibit IDO enzymatic activity through CD40-CD40L interactions with pDCs. This modification in suppression mechanisms by contact with CD4⁺ Teffs is reminiscent of recently published data showing that contact of CD4⁺CD25⁺ Tregs with conventional CD4⁺ T cells not only increased suppression by Tregs but also altered the suppression mechanism (15). CD8⁺ Tregs have been shown to exert suppression through contact-dependent (7, 35, 41, 42) or -independent mechanisms (4, 43). Contact-dependent mechanisms include cytotoxicity (41) but not TGF- β (7, 35, 42) or IL-10 (7). Contact-independent mechanisms can involve IFN- γ (43), TGF- β (43), and PD-1 (4) but not IL-10 (44). Donor-specific cytotoxicity was reduced in CD40lg-treated recipients (5). The inclusion of IL-10- or TGF- β -neutralizing Abs in coculture or Transwell MLR did not modify suppression and long-term allograft survival was unchanged by anti-TGF- β Ab administration (data not shown).

Despite its recognized effects promoting immune responses, IFN- γ also has tolerogenic effects (45). IFN- γ upregulates Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ Tregs (46), and it has been implicated in suppression mediated by CD8⁺ Tregs (43, 47-49). In a model of CD137 costimulation blockade, inhibition of immune responses was dependent on IFN- γ , yet IFN- γ alone did not induce suppression and acted through induction of TGF- β production by CD8⁺ Tregs (43). Similarly, in another model of CD8⁺ Tregs, IFN- γ did not directly inhibit CD4⁺ responses but rather licensed CD8⁺ Tregs to inhibit these responses (49). IFN- γ has been shown to induce a weak and transient increase of IDO functional activity in DCs, but neutralization of IFN- γ or IFN type 1 with B18R did not completely reverse IDO-dependent suppression, suggesting additional mechanisms inducing IDO, such as ligation of CD200, TLRs, or TNF- α and PGE₂ (24, 34). In our model, IFN- γ could be tolerogenic by inducing Fgl-2 on CD8⁺ Tregs. The involvement of IFN- γ only when CD4⁺ cells were in contact with DCs and Tregs could be explained by the directional secretion of IFN- γ to cells in close contact rather than diffuse production (50). Although IFN- γ promotes IDO expression on allografts (5) and allografts from IFN- γ -deficient donors are rejected more rapidly than wild-type grafts (51), intracoronary infusion of IFN- γ caused accelerated acute rejection in large animals (52), indicating that the effects of IFN- γ must take place both in the graft and in the lymphoid organs where close contact between CD4⁺, CD8⁺ Tregs, and DCs occur.

DC-T cell interaction in the absence of CD40L-CD40 results in cross-tolerization of CD8⁺ T cells, and IDO was shown to be essential (53). We found that IFN- γ was not responsible for IDO activity in vitro and other potential molecules that could induce IDO, such as IFN-I, TGF- β , and CTLA4 (33, 34), were also excluded. Further work is thus needed to identify the mechanism by which tolerogenic CD8⁺ Tregs induce IDO activity.

In conclusion, our results suggest that migration of pDCs and CD8⁺ Tregs to the graft and spleen allowed in vivo interactions necessary for suppression of CD4⁺ T cells. This suppression involved different mechanisms modulated by the presence of cell contact with CD4⁺ T cells, and IDO, IFN- γ , and Fgl-2 were the main mediators in vitro. In vivo, IDO and IFN- γ were essential for long-term allograft survival, suggesting that alloreactive CD4⁺ Teffs are suppressed by tolerogenic CD8⁺ Tregs through both contact-dependent and -independent mechanisms.

Acknowledgments

We thank Emmanuel Merieu, Helga Smit, and Bernard Martinet for technical contribution in animal models.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

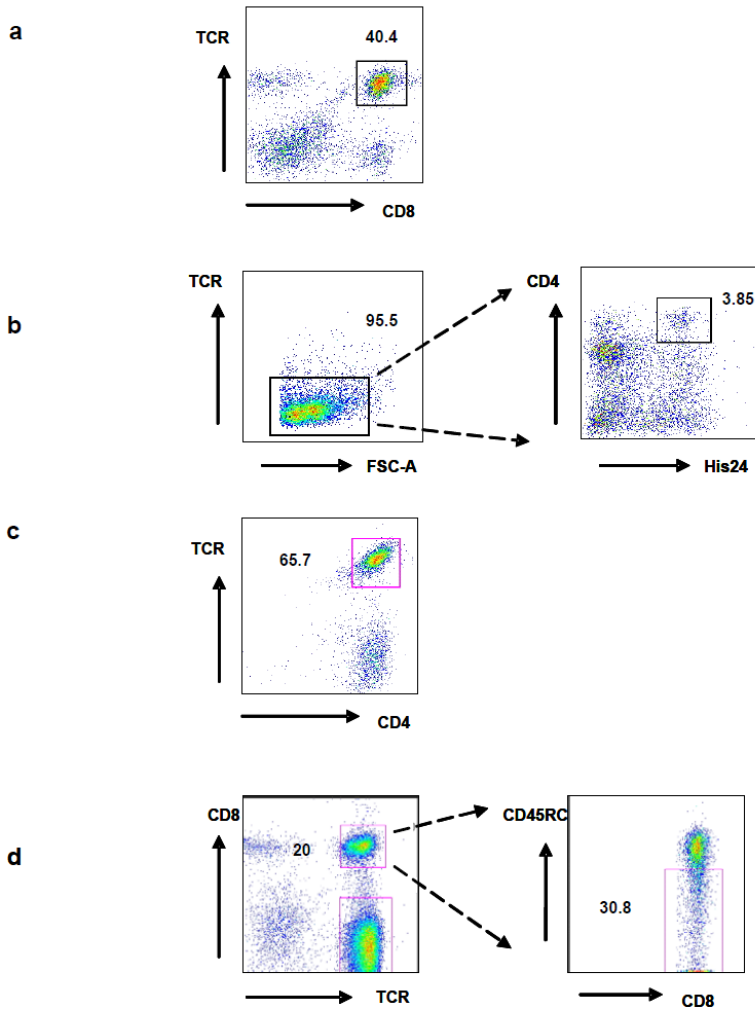
References

- Wood, K. J., and S. Sakaguchi. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 199-210.
- Niederhorn, J. Y. 2008. Emerging concepts in CD8⁺ T regulatory cells. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 327-331.
- Douillard, P., C. Vignes, R. Josien, E. Chiffolleau, J. M. Heslan, V. Proust, J. P. Souillou, and M. C. Caturi. 1999. Reassessment of the role of CD8⁺ T cells in the induction of allograft tolerance by donor-specific blood transfusion. *Eur. J. Immunol.* 29: 1919-1924.
- Izawa, A., K. Yamaura, M. J. Albin, M. Jurewicz, K. Tanaka, M. R. Clarkson, T. Ueno, A. Habicht, G. J. Freeman, H. Yagita, et al. 2007. A novel alloantigen-specific CD8⁺PD1⁺ regulatory T cell induced by ICOS-B7h blockade in vivo. *J. Immunol.* 179: 786-796.
- Guillonneau, C., M. Hill, F. X. Hubert, E. Chiffolleau, C. Hervé, X. L. Li, M. Heslan, C. Usal, L. Tesson, S. Ménoret, et al. 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 1096-1106.
- Derks, R. A., E. Jankowska-Gan, Q. Xu, and W. J. Burlingham. 2007. Dendritic cell type determines the mechanism of bystander suppression by adoptive T regulatory cells specific for the minor antigen HA-1. *J. Immunol.* 179: 3443-3451.
- Chang, C. C., R. Ciubotariu, J. S. Manavalan, J. Yuan, A. I. Colovai, F. Piazza, S. Lederman, M. Colonna, R. Cortesini, R. Dalla-Favera, and N. Suci-Foca. 2002. Tolerization of dendritic cells by TIS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3: 237-243.
- Dijke, I. E., K. Caliskan, M. Klepper, R. de Kuiper, A. H. Balk, A. P. Maat, W. Weimar, and C. C. Baan. 2009. Donor-specific immune regulation by CD8 lymphocytes expanded from rejecting human cardiac allografts. *Am. J. Transplant.* 9: 397-403.
- Sindhi, R., J. S. Manavalan, A. Magill, N. Suci-Foca, and A. Zeevi. 2005. Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8⁺CD28⁻ T-suppressor cells. *Hum. Immunol.* 66: 252-257.
- Gilliet, M., and Y. J. Liu. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195: 695-704.
- Wei, S., I. Kryczek, L. Zou, B. Daniel, P. Cheng, P. Mottram, T. Curiel, A. Lange, and W. Zou. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 65: 5020-5026.
- Sharma, M. D., B. Baban, P. Chandler, D. Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B. R. Blazar, A. L. Mellor, and D. H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117: 2570-2582.
- Ochando, J. C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, et al. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* 7: 652-662.
- Ouabed, A., F. X. Hubert, D. Chabannes, L. Gautreau, M. Heslan, and R. Josien. 2008. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 5862-5870.
- Collison, L. W., M. R. Pillai, V. Chaturvedi, and D. A. Vignali. 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J. Immunol.* 182: 6121-6128.

16. Josien, R., M. Heslan, S. Brouard, J. P. Souillou, and M. C. Cuturi. 1998. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 92: 4539–4544.
17. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinité, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity. *J. Immunol.* 169: 2284–2291.
18. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan, and R. Josien. 2004. 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: 7485–7494.
19. Guillot, C., S. Ménotet, C. Guillonnet, C. Braudeau, M. G. Castro, P. Lowenstein, and I. Anegón. 2003. Active suppression of allogeneic proliferative responses by dendritic cells after induction of long-term allograft survival by CTLA4lg. *Blood* 101: 3325–3333.
20. Muller, F. A., J. B. DuHadaway, P. S. Donovan, E. Sutanto-Ward, and G. C. Prendergast. 2005. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat. Med.* 11: 312–319.
21. Symons, J. A., A. Alcamí, and G. L. Smith. 1995. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81: 551–560.
22. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, J. M. Heslan, A. Ouabed, M. Heslan, and R. Josien. 2006. Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 177: 1007–1016.
23. Villadangos, J. A., and L. Young. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29: 352–361.
24. Mellor, A. L., and D. H. Munn. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 762–774.
25. Shalev, I., H. Liu, C. Kosciak, A. Bartzak, M. Javadi, K. M. Wong, A. Maknaja, W. He, M. F. Liu, J. Diao, et al. 2008. Targeted deletion of Fgl-2 leads to impaired regulatory T cell activity and development of autoimmune glomerulonephritis. *J. Immunol.* 180: 249–260.
26. Lakkis, F. G., A. Arakelov, B. T. Koniczny, and Y. Inoue. 2000. Immunologic "ignorance" of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat. Med.* 6: 686–688.
27. Saiki, T., T. Ezaki, M. Ogawa, and K. Matsuno. 2001. Trafficking of host- and donor-derived dendritic cells in rat cardiac transplantation: allosensitization in the spleen and hepatic nodes. *Transplantation* 71: 1806–1815.
28. Zou, L., B. Barnett, H. Safah, V. F. Larussa, M. Evdemon-Hogan, P. Mottram, S. Wei, O. David, T. J. Curiel, and W. Zou. 2004. Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res.* 64: 8451–8455.
29. Zhang, N., B. Schröppel, G. Lal, C. Jakubzick, X. Mao, D. Chen, N. Yin, R. Jessberger, J. C. Ochando, Y. Ding, and J. S. Bromberg. 2009. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 30: 458–469.
30. Siegmund, K., B. Rückert, N. Ouaked, S. Bürgler, A. Speiser, C. A. Akdis, and C. B. Schmidt-Weber. 2009. Unique phenotype of human tonsillar and in vitro-induced FOXP3⁺CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 182: 2124–2130.
31. Randolph, G. J., J. Ochando, and S. Parida-Sánchez. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 293–316.
32. Joffre, O., T. Santolaria, D. Calise, T. Al Saati, D. Hudrisier, P. Romagnoli, and J. P. van Meerwijk. 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T lymphocytes. *Nat. Med.* 14: 88–92.
33. Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 4: 1206–1212.
34. Munn, D. H., M. D. Sharma, and A. L. Mellor. 2004. Ligand of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172: 4100–4110.
35. Najafian, N., T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, M. R. Clarkson, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2003. Regulatory functions of CD8⁺CD28⁺ T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* 112: 1037–1048.
36. Ball, H. J., A. Sanchez-Perez, S. Weiser, C. J. Austin, F. Astelbauer, J. Miu, J. A. McQuillan, R. Stocker, L. S. Jermin, and N. H. Hunt. 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 396: 203–213.
37. Metz, R., J. B. DuHadaway, U. Kamasani, L. Laury-Kleintop, A. J. Muller, and G. C. Prendergast. 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitor compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* 67: 7082–7087.
38. Fontenot, J. D., J. P. Rasmussen, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6: 1142–1151.
39. Denning, T. L., S. W. Granger, D. Mucida, R. Graddy, G. Leclercq, W. Zhang, K. Honey, J. P. Rasmussen, H. Cheroutre, A. Y. Rudensky, et al. 2007. Mouse TCR $\alpha\beta$ CD8 α intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J. Immunol.* 178: 4230–4239.
40. Chan, C. W., L. S. Kay, R. G. Khadaroo, M. W. Chan, S. Lakatoo, K. J. Young, L. Zhang, R. M. Gorczynski, M. Cattral, O. Rotstein, and G. A. Levy. 2003. Soluble fibrinogen-like protein 2/fibronectin exhibits immunosuppressive properties: suppressing T cell proliferation and inhibiting maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 170: 4036–4044.
41. Jiang, H., and L. Chess. 2000. The specific regulation of immune responses by CD8⁺ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 185–216.
42. Bisikirska, B., J. Colgan, J. Luban, J. A. Bluestone, and K. C. Herold. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *J. Clin. Invest.* 115: 2904–2913.
43. Myers, L., M. Croft, B. S. Kwon, R. S. Mittler, and A. T. Vella. 2005. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN- γ to elaborate TGF- β -based suppression. *J. Immunol.* 174: 7625–7632.
44. Bienvenu, B., B. Martin, C. Auffray, C. Cordier, C. Bécart, and B. Lucas. 2005. Peripheral CD8⁺CD25⁺ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol.* 175: 246–253.
45. Zhang, J. 2007. Yin and yang interplay of IFN- γ in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 117: 871–873.
46. Feng, G., W. Gao, T. B. Strom, M. Oukka, R. S. Francis, K. J. Wood, and A. Bushnell. 2008. Exogenous IFN- γ ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 38: 2512–2527.
47. Tang, X., I. Maricic, N. Purohit, B. Bakamjian, L. M. Reed-Loisel, T. Beeston, P. Jensen, and V. Kumar. 2006. Regulation of immunity by a novel population of Qa-1-restricted CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\beta\beta$ T cells. *J. Immunol.* 177: 7645–7655.
48. Seo, S. K., J. H. Choi, Y. H. Kim, W. J. Kang, H. Y. Park, J. H. Suh, B. K. Choi, D. S. Vinay, and B. S. Kwon. 2004. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 10: 1088–1094.
49. Cone, R. E., X. Li, R. Sharafieh, J. O'Rourke, and A. T. Vella. 2007. The suppression of delayed-type hypersensitivity by CD8⁺ regulatory T cells requires interferon- γ . *Immunology* 120: 112–119.
50. Huse, M., B. F. Lillemeier, M. S. Kuhns, D. S. Chen, and M. M. Davis. 2006. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat. Immunol.* 7: 247–255.
51. Sis, B., K. S. Famulski, K. L. Allanach, L. F. Zhu, and P. F. Halloran. 2007. IFN- γ prevents early perforin-granzyme-mediated destruction of kidney allografts by inducing donor class I products in the kidney. *Am. J. Transplant.* 7: 2301–2310.
52. Hoerbelt, R., C. L. Benjamin, T. Shoji, S. L. Houser, A. Muniappan, R. S. Hasse, L. G. Ledgerwood, J. S. Allan, D. H. Sachs, and J. C. Madsen. 2008. The effects of tolerance on allograft damage caused by the innate immune system. *Transplantation* 85: 314–322.
53. Grohmann, U., F. Fallarino, S. Silla, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Vacca, A. Micheletti, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2001. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J. Immunol.* 166: 277–283.

SUPPLEMENTARY FIGURES

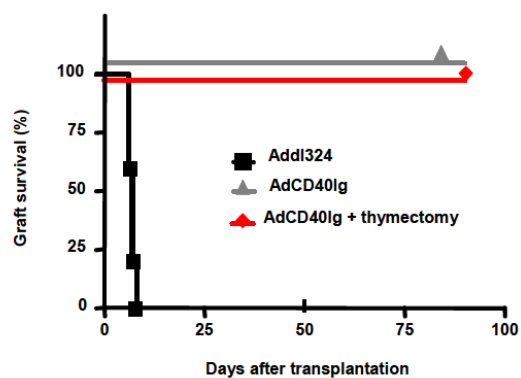
Supplementary Figure 1.



Supplementary figure 1. Gates used for cytofluorimetry analysis.

After gating cells by their morphology, cells were double labelled with the indicated antibodies, gated as indicated and used for analysis of additional markers. **a)** Gate used in figures 1d and 2d. **b)** Gates used in Figure 3d. **c)** Gate used in figures 4a, 5a-b, 5d, 5f, 6d-e as well as in supplementary figures 2a, 3b and 3c. **d)** Gate used in figure 6 b.

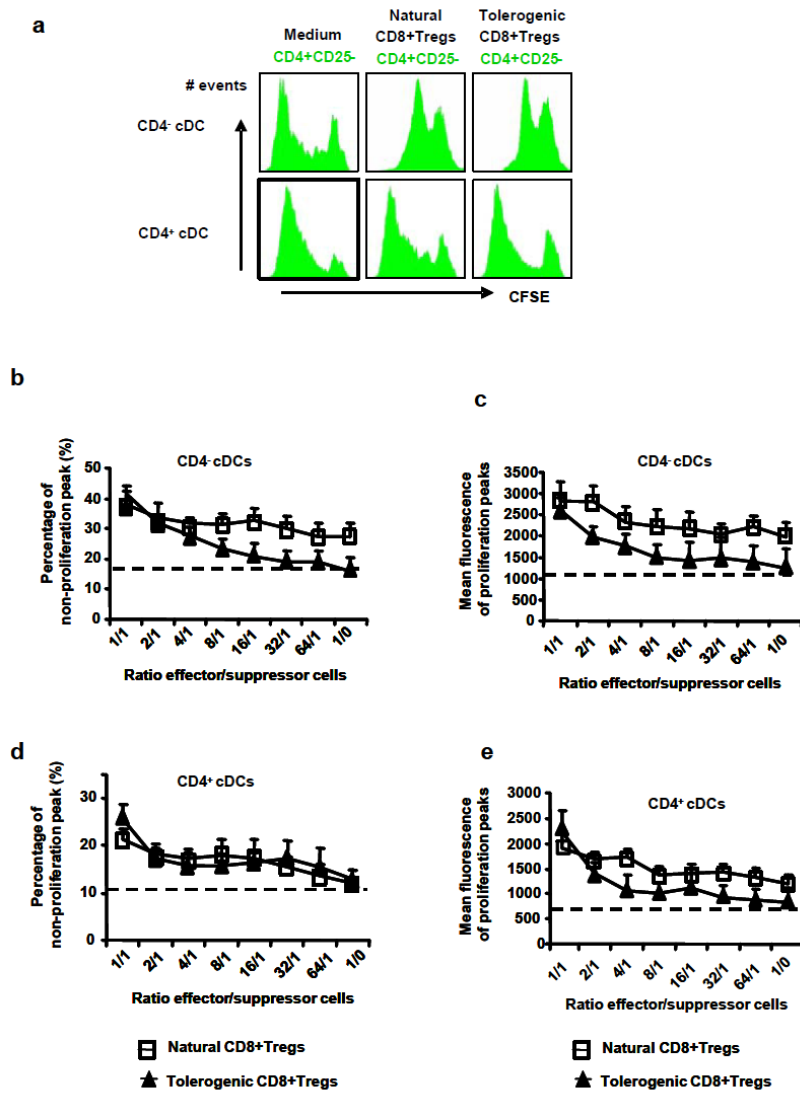
Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 2. Development of CD8⁺ Tregs in CD40Ig-treated animals is independent of the thymus.

Cardiac allograft survival in the control group (non-coding Addl324, n=4) or after AdCD40Ig administration in recipients with (n=4) or without (n=4) the thymus

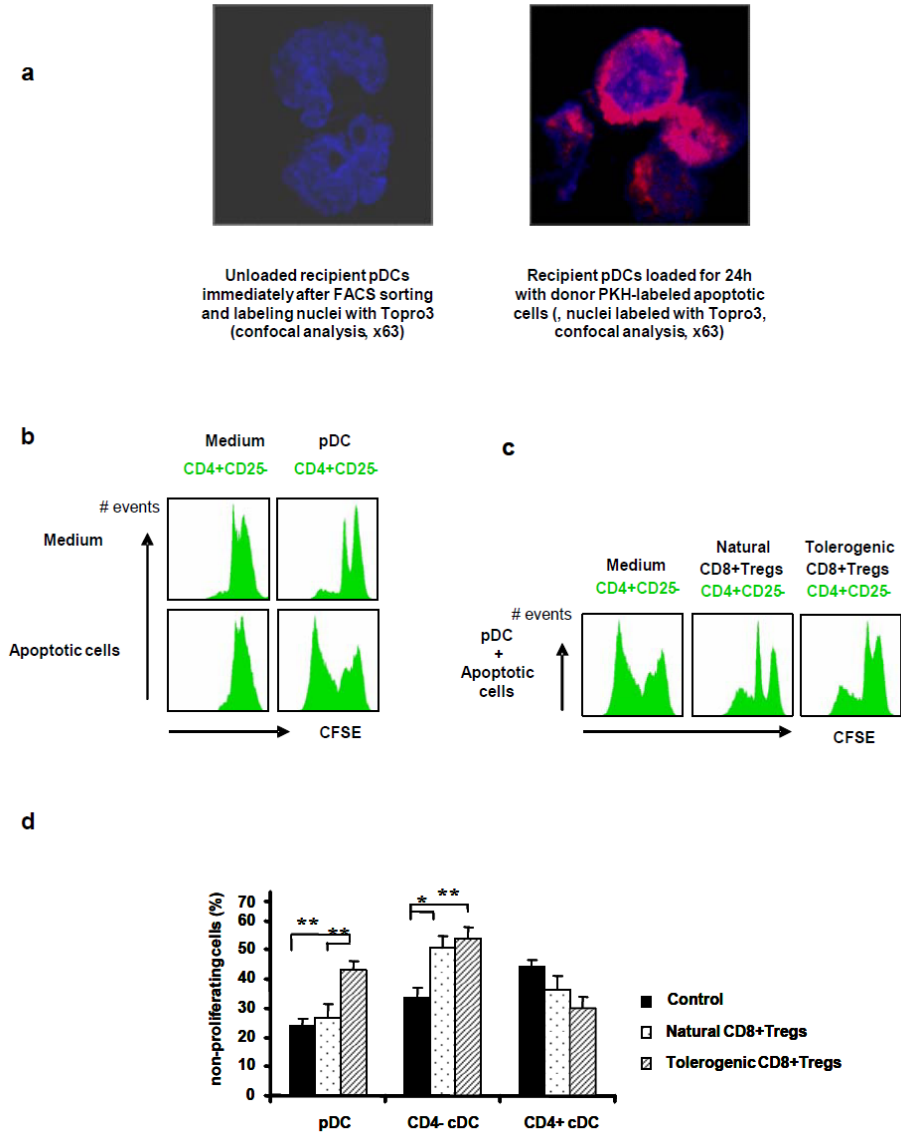
Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 3. CD8⁺ Tregs suppress CD4⁺ T cell response to direct alloantigen presentation by CD4⁻ cDCs but not CD4⁺ cDCs.

(a) CD4⁺CD25⁻ CFSE-labelled T cells were cocultured with or without natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs as well as CD4⁻ or CD4⁺ cDCs for 6 days. One representative experiment out of 3 is shown. (b) The same suppressive assay performed using decreasing ratios of effector/suppressor cells with results depicted as the percentage of non-proliferating CFSE-labelled naïve CD4⁺CD25⁻ T cells. Data is the mean ± SD of 3 independent experiments. Dotted lines represent values obtained in the absence of CD8⁺ Tregs. * p< 0.05 tolerogenic vs. natural CD8⁺ Tregs. (c) The same suppressive assays with results depicted as the MFI of CFSE-labelled naïve CD4⁺CD25⁻ proliferating cells. Dotted lines represent values obtained in the absence of CD8⁺ Tregs. * p< 0.05 tolerogenic vs. natural CD8⁺ Tregs.

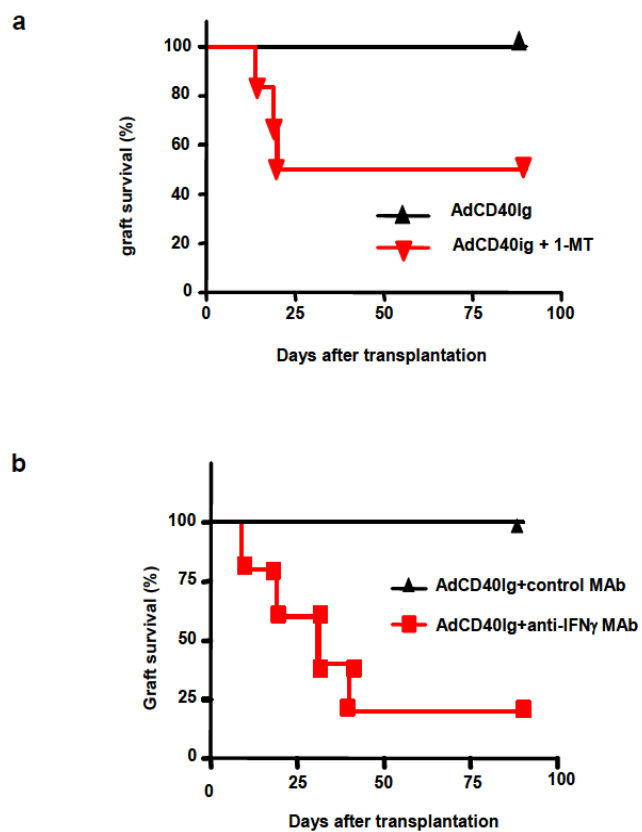
SupplementaryFigure 4.



Supplementary Figure 4. CD8⁺ Tregs suppress CD4⁺ T cell response to indirect alloantigen presentation by pDCs and CD4⁻ cDCs but not CD4⁺ cDCs.

The ability of recipient DCs to cross-present alloantigen was tested. **(a)** pDCs from LEW.1A before (left) and after (right) loading with PKH-labelled donor LEW.1W apoptotic heart resident leukocytes were analyzed by fluorescence microscopy. **(b)** The capacity of pDCs to present donor alloantigens through the indirect pathway was analyzed by cytofluorimetry. CFSE-labelled LEW.1A naïve CD4⁺CD25⁻ T cells were stimulated by recipient LEW.1A pDCs after loading with medium or apoptotic donor heart resident leukocytes. Data are representative of 3 independent experiments. **(c)** After gating on TCR⁺CD4⁺ cells, CFSE-labelled CD4⁺ T cells were analyzed after 6 days of coculture with natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs and recipient LEW.1A pDCs loaded with alloantigen (1:1 ratio for effector/suppressor). Data are representative of 3 independent experiments. **(d)** CD4⁺CD25⁻ CFSE-labelled T cells and indicated subpopulations of recipient DCs loaded with donor antigens were cocultured with or without natural or tolerogenic CD8⁺ Tregs for 6 days. After gating on TCR⁺CD4⁺ cells, the percentage of non-proliferating CFSE-labelled cells was determined (mean ± SD of triplicates from one experiment representative out of 3) (** p = 0.001 for tolerogenic CD8⁺ Tregs group vs. control MLR in the presence of pDCs, p = 0.0026 for tolerogenic CD8⁺ Tregs group vs. natural CD8⁺ Tregs group in the presence of pDCs and p = 0.006 for tolerogenic CD8⁺ Tregs group vs. natural CD8⁺ Tregs group in the presence of CD4⁻ cDCs; * p = 0.01 for natural CD8⁺ Tregs group vs. control group in the presence of CD4⁻ cDCs).

Supplementary Figure 5.



Supplementary Figure 5. Tolerance induction by CD40Ig treatment at least in part mediated by IDO and IFN- γ .

(a) Graft survival in animals that received an adenovirus encoding for CD40Ig alone or together with the IDO inhibitor 1-MT (twice daily by oral gavages at 50 mg/dose) on the day of transplantation (n = 4, each group). (b) Graft survival rates were compared after administration of CD40Ig and neutralizing anti-IFN- γ or isotype control mAb (at 3mg/kg i.p./2 week) (n=5 and n=4, respectively, p = 0.0081 between the two groups).

Article 4

**Caractérisation phénotypique et fonctionnelle
des cellules T régulatrices CD8⁺**

Séverine Ménoret, Carole Guillonnet, Séverine Bezie, Lise Caron, Ignacio Anegón, and Xian-Liang Li

Article publié dans *Methods Mol Biol.* 2011;677:63-83.

Titre original: Phenotypic and functional characterization of CD8⁺ T regulatory cells

Chapter 5

Phenotypic and Functional Characterization of CD8⁺ T Regulatory Cells

Séverine Ménoret, Carole Guillonnet, Séverine Bezié, Lise Caron, Ignacio Anegón, and Xian-Liang Li

Abstract

Increasing evidence shows the presence and significance of CD8⁺ T regulatory cells (CD8⁺ Tregs) in both human and rodent transplant recipients, as well as in autoimmune disease models. We, hereafter, review all available data on the phenotypic and functional characterization of CD8⁺ Tregs, and we also provide detailed protocols to purify them and analyze their suppressive function. Different subsets of dendritic cells (DCs) and CD4⁺ effector T cells may modulate the suppression mediated by CD8⁺ Tregs. By analyzing the proliferation of CFSE-labeled naïve CD4⁺CD25⁻ T cells in coculture MLR and transwell experiments, we explored the mutual modulation of CD8⁺ Tregs, DC subsets, and CD4⁺ T effector cells. The suppressive function of CD8⁺ Tregs was mediated by both cell-contact-dependent and -independent mechanisms.

Key words: CD8⁺ regulatory T cells, CFSE, Suppressive function, Transwell analysis, Dendritic cells, CD4⁺ effector T cells

1. Introduction

The CD8⁺ suppressor T cells mediating the adoptive transfer of tolerance in mice were first identified in the 1970s by Gershon and colleagues (1, 2). In 1984, human CD8⁺ T cells with immune regulatory potential were demonstrated (3). These observations prompted the first series of studies for CD8⁺ regulatory T cells (Tregs) in the late 1980s and early 1990s. Most of the CD8⁺ Tregs that have been characterized for their phenotype and function are summarized in Table 1.

The functional study of human CD8⁺ Tregs with suppressive function induced with an autologous renal allograft-derived T cell

Table 1
The different subsets of CD8+ Tregs

Species	Identification	Generation	Phenotypic and function and characterization	References
Human	CD25+	Induced by anti-CD3 mAb	Foxp3+, CTLA4+, CD45RA+	(22)
	CD28-	Induced by allotransplantation	CD27+, Foxp3+	(6)
	Foxp3+	Induced by virus	CTLA4+, GITR+, IFN- γ	(23)
	LAG3+	Induced by MTB in vitro	CD25+Foxp3+CCL4+, CD28+, CD62L+	(24)
	CD45RO+	Induced by pDCs in vivo, ovarian cancer	CCR7+ IL-10+, IL-10-dependent	(25)
	CD8+	Induced by activated allogeneic pDCs	IL-10-mediated suppression	(26)
	CD45RC ^{low}	Natural from MHC II-deficient mice	IL-10 and TGF β	(27)
	CD8+	Induced by immature DCs pulsed with MP	Peptide specific and contact dependent suppression	(28)
	CD28+	Induced after allotransplantation	IL-10, TGF β , and CTLA4+ dependent suppression	(29)
	Foxp3+	Induced by anti-CD3 and TGF β	CTLA4+, CD45RO+, CD28+, CD25+, IFN- γ production	(30)
	CD8 ^{high}	Induced by CD40 activated B cells	Foxp3+, CD25+, CD28+, CD62L+, CD45RO+, cell contact dependent, IL-10, TGF β , CTLA-4 dependent suppression	(31)
	CD103+	Induced by alloantigen	IL-10 production, cell contact dependent	(32)
	Mouse	CD8+	Induced by anti-CD137 and polyI:C	CD103+, IFN γ induced TGF- β -mediated suppression
CD8+		Induced by IL-4 IL-12 and dexamethasone	CD45RB+, CD28+, contact dependent, IL-10/TGF β independent	(34)
CD25+		Natural	CD44 ^{high} , GITR+, CTLA-4+ CD25+, CD28-	(35)
CD25+		Induced by epithelial cells through TGF- β	CD25+, Foxp3+, TGF- β , IL-10	(36)

Phenotypic and Functional Characterization of CD8⁺ T Regulatory Cells

65

CD28 ⁻	Natural	CD62L ⁺ , CD44 ^{low} , CD45RB ^{high} , action through IL-10 and TGFβ	(37)
Foxp3 ⁺	Induced by peptides	TGF-β, suppress anti-DNA IgG production	(38)
CD122 ⁺	Natural	Foxp3 ⁻ , IL-10	(39, 40)
CD122 ⁺	Natural	CD44 ^{high} , IL-10	(41)
PDI ⁺	Induced by anti-ICOSmAb	CD45RB ⁺ , CD27 ⁺ , CD45RA ⁺ , PD-1 ⁺ , CD25 ⁻	(42)
CD11c ⁺	Induced by anti-CD137	IFN-γ and IDO dependent	(43, 44)
Qa-1 restricted	Natural	CD8αα+TCRαβ ⁺ , killing of CD4+Qa-1+ cells	(44, 45)
CD103 ^{high}	Natural	CD44 ⁻ , TGF-β production	(46)
Rat			
CD28 ⁻	Induced by T-cell vaccination	Foxp3 ⁻ , inhibit corneal xenograft rejection	(47)
CD28 ⁻	Induced by DST	Foxp3 ⁺ , contact dependent	(48)
CD8 ⁺	Induced by oral alloantigen	IL-4, prolong graft survival	(49)
CD45RC ^{low}	Natural	CTLA4 ⁺ , IL-10, IL-4, IL13, contact dependent	(50)
CD45RC ^{low}	Induced by uveitogenic peptide	Foxp3 ⁺ after stimulation	(51)
CD45RC ^{low}	Induced by CD40Ig	Foxp3 ⁻ , CD40L ⁻ , IFN-γ, IDO, contact dependent and independent	(11), unpublished
CD8 ⁺	Induced by UV-B-irradiated DST	Donor-specific unresponsiveness	(52)
CD8 ⁺	Induced by DST	Adoptive transfer of tolerance by CD8 ⁺ and CD4 ⁺ T cells	(53)
CD8 ⁺	Induced by oral administration of MBP	Antigen-driven bystander suppression	(54)

GVHD graft vs. host disease, *VIP* vasoactive intestinal peptide, *MTB Mycobacterium tuberculosis*, *IDO* indoleamine 2,3-dioxygenase, *MP* influenza matrix peptide, *MBP* myelin basic protein

line was first reported in 1988 (4). The presence and expansion of CD8⁺ Tregs have also been associated with absence or reduced immunosuppression in transplant recipients of liver-intestine (5), heart (6, 7), and kidney allografts (8, 9). Recently, CD8⁺ Tregs have equally been described in human cardiac allografts with a potential to specifically inhibit antidonor immune reactivity (10). Furthermore, by blockade of CD40–CD40L interactions with CD40Ig in a rodent heart allograft model, the adoptive transfer of tolerance was mediated by tolerogenic CD8⁺CD45R^C^{low} regulatory T cells (11). All these observations highlight the potentially significant role of CD8⁺ Tregs in allograft tolerance.

The crucial role of CD8⁺ suppressor T cells in autoimmune diseases was firstly reported in a murine model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (12, 13). Mice that were deficient of CD8⁺ T cells developed more severe autoimmune myocarditis and were prone to a relapse of autoimmune arthritis, suggesting that the regulatory activity of CD8⁺ T cells might reside in the CD8⁺ memory pool (14, 15). CD8⁺ Tregs have also been implicated in the regulation of human autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease and multiple sclerosis (16–18). Mounting evidence has also pointed to the role of antigen-specific CD8⁺ Tregs in allergy, asthma, and cancers (19, 20). As a result, the interest in the role of CD8⁺ Tregs has been rekindled and several types of CD8⁺ Tregs with distinct phenotypes and suppressive mechanisms have been described both in humans and in rodents (Table 1). The suppressive functions can be categorized into cell-contact-dependent or -independent mechanisms, and cytotoxicity to the target cells and anti-inflammatory cytokine secretion have been described in both of these categories (18) (Table 1).

Subsets of DCs may influence the suppressive function of CD8⁺ Tregs. In a rat cardiac allograft transplantation model, plasmacytoid DCs (pDCs) promote the expression of Foxp3 in CD8⁺ Tregs and are needed for donor alloantigen-specific suppression. In addition, the interaction of immature CD8⁺ Tregs with pDCs, but not with conventional DCs, is crucial so as to induce tolerance and prevent rejection (Li et al. submitted).

The *in vivo* outcome of DC and Treg encounters additionally depends on the effects of CD4⁺ effector cells, which can potentiate and modify the suppressive mechanisms of CD4⁺ Tregs (21). This observation introduces an important new concept concerning the suppressive mechanism of Tregs, indicating that it is not only a bidirectional regulation with DC subsets but also a triangular modulation in which T effector cells also play a key role in potentiating Treg function.

To test the suppressive function of CD8⁺ Tregs, the coculture mixed leukocyte reaction (MLR) systems are indispensable. The conventional ³H-thymidine incorporation assay is widely used to

assess the suppressive function of regulatory T cells (see Note 1). However, this system cannot specifically identify the different influences of APC subsets on the suppressive function because the proliferation of CD4⁺ T effector cells can be masked by the proliferation of other cells in the MLR system, such as CD8⁺ Tregs. We have, thus, developed a more specific MLR and transwell system using CFSE-labeled CD4⁺ T cells by which we have analyzed the suppressive mechanisms of CD8⁺ Tregs and the role of different APC subsets as well as CD4⁺ T effector cells on the CD8⁺ Treg function.

2. Materials

2.1. Equipment

1. A basic anesthetic delivery system with an isoflurane anesthesia facility for harvesting the spleen or lymph nodes.
2. Stainless-steel mesh, dissection instruments, and syringes, as well as needles for isolation of lymphocytes. All instruments should be cleaned and sterilized with 70% ethanol.
3. Magnetic bead separator for separating the lymphocyte subpopulations.
4. Flow cytometer; FACS LSR II for analysis, FACSAria for lymphocyte subpopulation sorting.
5. Microscope and hemocytometer for cell counting.
6. 37°C, Water-jacketed CO₂ incubator with 95% humidity.
7. Calibrated pipettes and multichannel pipettes.
8. Cell strainer with a pore size of 100 or 60 μm.
9. Conical tubes: 15-ml and 50-ml BD Falcon tubes and 5-ml V-bottom sterilized tubes.
10. Culture plates and dishes: 96-well U-bottom and 24-well plates, 10-cm dishes, 3.5-cm dishes, cell culture insert with a 0.4-μm pore size.
11. Centrifuges capable of spinning for Ficoll Hypaque, Nycodenz, and washing cells.

2.2. Reagents

1. Phosphate Buffer Solution without calcium and magnesium.
2. Red blood cell lysis solution: 8.29-g NH₄Cl, 1-g KHCO₃, 37.2-mg Na₂ EDTA dissolved in 1-l H₂O, with a pH adjusted to 7.2.
3. Ficoll-Paque Plus.
4. Nycodenz: 14.5-g Nycodenz/100-ml PBS-FCS-EDTA solution.

Table 2
Antibodies used for FACS analysis or sorting

Labeled antibody	Clone	Supplier
Purified mouse anti-rat TCR $\gamma\delta$	V65	Hybridoma from ECCC
Purified mouse anti-rat CD45R	His24	BD Biosciences
Purified mouse anti-rat NK cells	3.2.3	Hybridoma from ECCC
Purified mouse anti-rat CD11b/c	OX42	Hybridoma from ECCC
Purified mouse anti-rat T cells	R73	Hybridoma from ECCC
Biotin mouse anti-rat CD45RC	OX22	Hybridoma from ECCC
Alexa 488 mouse anti-rat TCR	R73	Hybridoma from ECCC
FITC mouse anti-rat CD6	OX56	Hybridoma from ECCC
FITC mouse anti-rat CD45R	His24	BD Biosciences
FITC mouse anti-rat TCR	R73	Hybridoma from ECCC
PE mouse anti-rat CD8 α	OX8	Hybridoma from ECCC
PE mouse anti-rat CD4	OX35	Hybridoma from ECCC
PE mouse anti-rat CD45R	His24	BD Biosciences
APC mouse anti-rat CD4	OX35	Hybridoma from ECCC
APC mouse anti-rat CD103	OX62	Hybridoma from ECCC
Alexa 647 mouse anti-rat CD25	OX39	Hybridoma from ECCC

5. Collagenase D: 1 g collagenase in 500-ml RPMI-1640 + 5-ml Hepes + 2% fetal bovine serum (FCS).
6. Antibodies for FACS analysis or cell sorting: see Table 2.
7. PBS-FCS-EDTA solution: 500-ml PBS + 10-ml FCS + 2.5-ml 0.1 M EDTA.
8. Microbeads: Goat anti-mouse IgG (see Note 2).
9. 500 ml complete RPMI-1640 medium with 5-ml penicillin (80 U/ml)-streptomycin (80 μ g/ml), 5-ml L-glutamine, 5-ml nonessential amino acids (100 \times), 5-ml pyruvate sodium (100 mM), 5-ml HEPES buffer (1 M), 2.5-ml β -mercapto-methanol (7 μ l of 2- β mercaptoethanol stock diluted in 10-ml RPMI) (see Notes 3 and 4).
10. Fetal bovine serum (see Note 3).

2.3. Animals and Other Antibodies

1. Male Lewis 1W and Lewis 1A Rats (8 weeks) (see Note 5).
2. A description of antibodies used is provided in Table 2.

3. Methods

3.1. Protocols for the Analysis of Regulatory CD8⁺ T Cell Suppressive Function

Analyzing antigen-specific CD4⁺ T-cell proliferation is a major technique for assessing the suppressive capacity of CD8⁺ Tregs. CD4⁺ lymphocytes proliferate in response to antigenic peptides associated with class II major histocompatibility complex (MHC) molecules on APCs. A mixed lymphocyte proliferation (MLR) assay measures the ability of lymphocytes placed in short-term tissue culture to proliferate when stimulated *in vitro* by donor alloantigens.

Our method involves isolating and labeling naive CD4⁺ CD25⁻ T lymphocytes with CFSE, placing the cells in a 96-well plate with or without CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells, and stimulating with various stimuli, such as allogeneic plasmacytoid or conventional DCs, as well as recipient DC subsets loaded with donor alloantigens. The cells are incubated for six days at 37°C in a CO₂ incubator. A transwell system can be used to test the contact dependency of Treg–DC cells, or Treg–Teff cells. Proliferation is quantified on the 6th day by analyzing the dilution of CFSE (excitation, 488 nm; detection, 530 nm) on a LSR II cytometer. After gating of TCR⁺CD4⁺ T cells, the proliferation is shown by a histogram of CFSE intensity.

3.2. Protocol for Harvesting the Spleen or Other Organs

1. Anesthetize 8-week-old male Lewis 1A and Lewis 1W rats by isoflurane (rat body weight around 250 g).
2. Sterilize the abdomen of the animals with 70% ethanol. All surgical procedures should be performed with sterilized instruments.

3.2.1. Protocol for Harvesting the Spleen

1. Make a surgical incision in the abdomen with the dissection scissors.
2. Expose the spleen, separate from other organs, and ligate the blood vessels of the spleen with 4–0 surgical thread, then remove it aseptically without the fat tissues by forceps and scissors.
3. Store the spleen in cold PBS solution in a 50-ml BD Falcon tube on ice.

3.2.2. Protocol for Harvesting the Donor Heart for Indirect Antigen Presentation Analysis

1. Make a middle thoracic incision exposing the rib cage and cut bilaterally.
2. Expose the heart by removing the rib cage and harvest the heart without the thymus using sterile instruments.
3. Store the donor heart in cold PBS solution in a 50-ml BD Falcon tube on ice.

3.3. Protocol for the Purification of T Lymphocyte Subpopulations

3.3.1. Preparation of T Lymphocytes: CD8⁺ Tregs, CD4⁺CD25⁻ T Cells, and CD4⁺CD25⁺ Tregs

1. Collect the spleen from the storage tube and transfer to a 10-ml culture dish with 3–4 ml of PBS.
2. Mince the spleen into small pieces with sterilized surgical blades.
3. Prepare another 10-ml dish with a sterilized steel mesh, transfer the small pieces of spleen with a 10-ml pipette onto the mesh, and add 15 ml of PBS.
4. Further disrupt the spleen tissue by pressuring using the syringe column.
5. Collect the suspension of splenocytes in a 50-ml tube and wash the dish with cold PBS.
6. Centrifuge the suspension of splenocytes for 10 min at $524 \times g$, 4°C.
7. Remove the supernatant and resuspend the pellet of splenocytes with 10 ml of red cell lysis buffer for at least 5 min at room temperature.
8. Wash the splenocytes twice with 50 ml of PBS to remove the lysis buffer.
9. After washing, resuspend the splenocytes in 10-ml PBS solution, filter the splenocyte suspension with a cell strainer with a pore size of 100 μm , and collect the splenocytes in another 50-ml BD Falcon tube.
10. Count the splenocyte suspension with a hemocytometer and resuspend it at a concentration of $20\text{--}30 \times 10^6$ cells/ml in PBS-FCS-EDTA solution.
11. To enrich for T cells, incubate the splenocyte suspension for at least 10 min or more at 4°C with a cocktail of antibodies against: $\gamma\delta$ T cells (anti-TCR $\gamma\delta$, clone V65), B cells (anti-CD45R, clone His24), NK cells (anti-CD161, clone 3.2.3), and monocytes (anti-CD11b/c, clone OX42).
12. After the incubation of the cocktail of antibodies, wash the splenocytes twice with PBS-FCS-EDTA solution at $524 \times g$ for 10 min, 4°C.
13. During the washing of the antibodies, prepare the Dynabeads by calculating the number of cells that require purifying, for example, to enrich T lymphocytes, 50% of the total number of splenocytes need to be removed using four beads per cell. Wash the Dynabeads at least three times with PBS-FCS-EDTA solution using a magnetic bead separator. After washing, resuspend the Dynabeads at a 1:10 dilution in PBS-FCS-EDTA solution. (see Note 2).
14. Resuspend the splenocyte pellet in magnetic Dynabeads and incubate under slight agitation in a solar agitator for 10 min at 4°C (cold room).

15. After incubation, add 30 ml of PBS-FCS-EDTA solution to the tube and separate the splenocytes using a magnetic bead separator by collecting the suspension of the cells in another tube after at least 1-min incubation in the separator. Repeat at least three times to remove all the conjugated beads.
16. Wash the enriched T lymphocytes at least twice by centrifuging at $524\times g$ for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
17. Count the T lymphocytes and resuspend at $20\text{--}30\times 10^6$ cells/ml.
18. Label the enriched T cells with a cocktail of fluorescence antibodies for at least 20 min or more at 4°C in the dark (anti-CD45RC-biotin (OX22), anti-CD8 α -PE (OX8) or anti-CD4-PE (OX35), anti-CD6-FITC (OX56), and anti-CD25-Alexa 647 (OX39)).
19. Wash the enriched T lymphocytes at least twice by centrifuging at $524\times g$ for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
20. Resuspend the T lymphocytes at 30×10^6 cells/ml in cold PBS-FCS-EDTA solution and label the secondary antibodies with Streptavidin-PE-Cy7 in the dark for at least 15 min at 4°C.
21. Wash the enriched T lymphocytes at least twice by centrifuging at $524\times g$ for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
22. Count the T lymphocyte suspension with a hemocytometer and resuspend at a concentration of 30×10^6 cells/ml in cold PBS-FCS-EDTA solution. Filter the cell suspension using a cell strainer with a pore size of 60 μm .
23. Add DAPI to the cell suspension (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) to exclude dead cells in the FACS analysis.
24. Sort the subpopulations of T lymphocytes using a FACSAria in the following gates, CD6+CD8+CD45RC^{low} T cells, CD6+CD4+CD25+ T cells, and CD6+CD4+CD25- T cells. The purity of the sorted subpopulations should be systematically more than 98%.
25. Refer to the pseudocolor plot display of the FACSAria to sort the targeted population (Fig. 1). (The figures are provided with the permission of the authors.)

3.4. Preparation of DC Subsets

1. Collect the spleen from the storage tube and transfer to a 5-ml culture dish and add 3–4 ml Collagenase D, prewarmed in a 37°C water bath.
2. Inject collagenase D with syringes into the spleen and mince the spleen into small pieces with sterilized surgical blades.

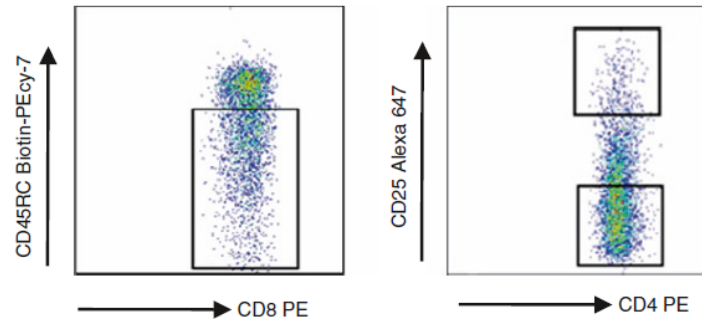


Fig. 1. The pseudocolor plot display of the FACSaria for sorting of the target population. Sort the subpopulations of T lymphocytes using a FACSaria in the following gates: CD6+CD8+CD45RC^{low} T cells, CD6+CD4+CD25+ T cells, and CD6+CD4+CD25- T cells. *Left panel*, CD8+CD45RC^{low} T cells and *right panel*, CD4+CD25+ T cells and CD4+CD25- T cells.

3. Incubate the spleen pieces with collagenase D at 37°C in a water-jacketed CO₂ incubator for at least 30 min.
4. After incubation, add 0.4 ml of 0.1 M EDTA to stop the reaction.
5. Prepare another 10-ml dish with a sterilized steel mesh, transfer the small pieces of spleen with a 10-ml pipette onto the mesh, and add 15 ml of PBS-FCS-EDTA solution (see Note 4).
6. Further lyse the spleen tissue by syringe column pressure or pipette.
7. Collect the suspension of splenocytes in a 50-ml tube and wash the dish with cold PBS-FCS-EDTA solution.
8. Wash the splenocytes with 524 × g for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
9. After washing, resuspend the splenocytes in 8-ml PBS-FCS-EDTA solution, filter the splenocyte suspension using a cell strainer with a pore size of 100 μm, and collect the splenocytes in another 50-ml BD tube.
10. Prepare 4 ml of 14.5% Nycodenz in two 15-ml BD tubes. Very slowly, load 4 ml of splenocytes onto each of the Nycodenz layers.
11. Centrifuge the splenocytes with Nycodenz for 13 min at 1,825 × g, 4°C without braking.
12. After centrifugation, collect the cells from the interface; which are enriched in conventional DCs (cDCs). Wash the enriched cDCs with PBS-FCS-EDTA solution by centrifuging for 10 min at 630 × g, 4°C.
13. Rewash the enriched cDCs by centrifuging at 524 × g for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution and count the cells. Resuspend at a concentration of 30 × 10⁶ cells/ml in cold PBS-FCS-EDTA solution and ready for staining.

14. Incubate with the following cocktail of antibodies used to label cDCs: anti-TCR (R73-alexa 488), anti-CD45RA (clone OX33-FITC), CD103 (OX62-APC), and anti-CD4 (OX35-PE) on ice for at least 10 min.
15. Collect the cell pellet after running the Nycodenz centrifugation and resuspend in 15 ml of PBS-FCS-EDTA solution.
16. Prepare 15 ml of Ficoll Hypaque Plus in 50-ml BD tubes, and very slowly add 7.5 ml of resuspended splenocytes onto the Ficoll Hypaque Plus solution.
17. Centrifuge for 20 min at $931 \times g$ and at room temperature without braking.
18. Collect the cells from the interface and wash with cold PBS-FCS-EDTA for 10 min at 630 g, 4°C. Resuspend at a concentration of 30×10^6 cells/ml in cold PBS-FCS-EDTA solution, ready for staining.
19. To further enrich the pDC population, incubate the cells collected from Ficoll centrifugation with a cocktail of antibodies staining T cells (clone R73), $\gamma\delta$ T cells (anti-TCR $\gamma\delta$, clone V65), and B cells (anti-CD45RA, clone OX33) for at least 10 min at 4°C.
20. After the incubation of the antibody cocktail, wash the cells twice with PBS-FCS-EDTA solution for 10 min at $524 \times g$, 4°C.
21. During the washing of the antibodies, prepare the Dynabeads by calculating the number of cells requiring purification: for example, to enrich for pDCs, at least 50% of total splenocytes need to be removed using four beads per cell. Wash the Dynabeads at least three times in PBS-FCS-EDTA solution using a magnetic beads separator. After washing, resuspend the Dynabeads at a 1:10 dilution in PBS-FCS-EDTA solution (see Note 2).
22. Resuspend the cell pellet with washed magnetic Dynabeads and incubate under slight agitation in a solar agitator for 10 min at 4°C (cold room).
23. After incubation, add 30 ml of PBS-FCS-EDTA solution to the tube and separate the splenocytes using a magnetic bead separator by collecting the cell suspension in another tube after at least 1-min incubation in the separator. Repeat at least three times to remove all conjugated beads.
24. Wash the enriched pDC population by centrifuging at $524 \times g$ for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution, at least twice. Count and resuspend at $20\text{--}30 \times 10^6$ cells/ml.
25. The following cocktail of antibodies should be used to label pDCs: anti-TCR (clone R73-FITC), anti-CD45R (clone His24-PE), and anti-CD4 (clone OX35-APC) for at least 10 min at 4°C.

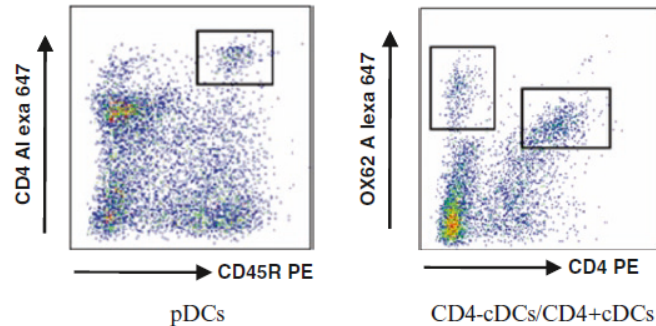


Fig. 2. The pseudocolor plot display of the FACSaria for sorting of the target population. Sort the subpopulations of DCs using a FACSaria in the following gates: cDCs are sorted as TCR-CD45RA-CD103⁺ cells and further classified by the expression of CD4 into CD4⁺ cDCs and CD4⁻ cDCs subpopulations. pDCs are defined as TCR-CD45RA-CD45R⁺CD4⁺ cells. *Left panel*, pDCs, *right panel*, CD4⁺/CD4⁻cDCs.

26. Wash the fluorescence antibody-labeled cell populations at least twice by centrifuging at $524 \times g$ for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
27. Count the cell suspension with a hemocytometer and resuspend at a concentration of 30×10^6 cells/ml in cold PBS-FCS-EDTA solution. Filter the cell suspension using a cell strainer with a pore size of 60 μ m.
28. Add DAPI to the cell suspension (10 μ g/ml) to exclude dead cells in the FACS analysis.
29. Sort the subpopulations of DCs using a FACSaria in the following gates: cDCs are sorted as TCR-CD45RA-CD103⁺ cells and further classified by the expression of CD4 into CD4⁺ cDCs and CD4⁻ cDCs subpopulations. pDCs are defined as TCR-CD45RA-CD45R⁺CD4⁺ cells. The purity of the sorted subpopulations should be systematically greater than 98%.
30. Refer to the pseudocolor plot display of the FACSaria to sort the target population (Fig. 2). (The figures are provided with the permission of the authors.)

3.5. CFSE Labeling of Responder T Cells and MLR by the Direct Alloantigen Presentation Pathway

1. Wash the sorted CD4⁺CD25⁻ T cells with PBS solution twice and dilute with PBS to a concentration of $25 \times 10^6/6$ ml (see Note 6).
2. Label naive CD4⁺CD25⁻ T cells with 3 μ l of 5-carboxy fluorescein succinimidyl ester (CFSE) (5 μ M) for 3–5 min at room temperature.
3. Stop the labeling reaction by adding 1.25 ml of FCS for 1 min at room temperature, and wash the cells twice with complete RPMI-1640. Then, count the cell numbers.

In normal circumstances, 30–50% of cells will die during the labeling process.

4. If the cells numbers are less than 5×10^6 , the cells should be resuspended in 2-ml PBS and stained with 2- μ l CFSE. The reaction is stopped with 500- μ l FCS.
5. To assess the suppressive function of regulatory T cells, coculture MLR experiments are used to analyze the proliferation of naive CD4⁺CD25⁻ T cells. Purified naive CD4⁺CD25⁻ T cells labeled with CFSE (2×10^4 cells) are cocultured with cDCs or pDCs (5×10^3 cells, CD4⁺ T cell/DC ratio of 4/1) in a round-bottom 96-well plate in a final volume of 200 μ l of complete RPMI-1640 medium, with or without suppressive cells, for 6 days at 37°C in 5% CO₂. The ratio of suppressor cells to effector cells should be varied from 1:1 to 0.1/1.
6. To investigate the cell–cell contact dependency, a transwell experiment is used to analyze the proliferation of naive CD4⁺CD25⁻ T cells. Load the purified naive CD4⁺CD25⁻ T cells (4×10^5 cells) labeled with CFSE and sorted DCs (10^5 cells) in a V-bottom tube (5 ml) as the lower chamber. Then, add a cell culture insert with a 0.4- μ m HD pore size membrane into the V tube as the upper chamber. Load the CD8⁺ Tregs (0.4×10^6 cells) with or without sorted DCs onto the cell culture insert membrane. The cells are cultured at 37°C in 5% CO₂ in a final volume of 1 ml of complete RPMI-1640 medium for 6 days (see Note 7).
7. After 6 days of culture, the cells from the coculture MLR experiment or from the lower chamber of the transwell system are harvested and stained with TCR (R73-biotin, further conjugated with Streptavidin-PE-Cy7) and CD4 (OX35-PE) in V-bottom 96-well plates.
8. The proliferation of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells induced by allogeneic DCs is analyzed by the dilution of CFSE (excitation, 488 nm; detection, 530 nm) on a LSR II cytometer. After gating of TCR⁺CD4⁺ T cells, the proliferation is shown by a histogram of CFSE intensity. The data are analyzed using FLOWJO software.
9. The suppressive function assay is performed by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of immature pDCs after 6 days of MLR coculture (Fig. 3). (The figures are provided with the permission of the authors.)
10. The suppressive function assay is performed by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells in the presence of immature pDCs after 6 days of the transwell experiment (Fig. 4). (The figures are provided with the permission of the authors.)

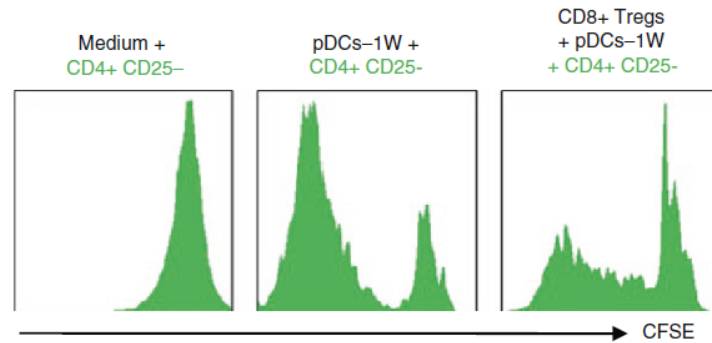


Fig. 3. The suppressive function assay by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4+CD25⁻ T cells in the presence of immature pDCs after 6 days of coculture MLR. *Left panel:* there is no proliferation of the naive CD4+CD25⁻ T cells with medium alone. *Middle panel:* strong proliferation of naive CD4+CD25⁻ T cells with the stimulation of allogeneic pDCs. *Right panel:* the proliferation of naive CD4+CD25⁻ T cells is strongly inhibited by naive CD8+CD45RC^{low} regulatory T cells.

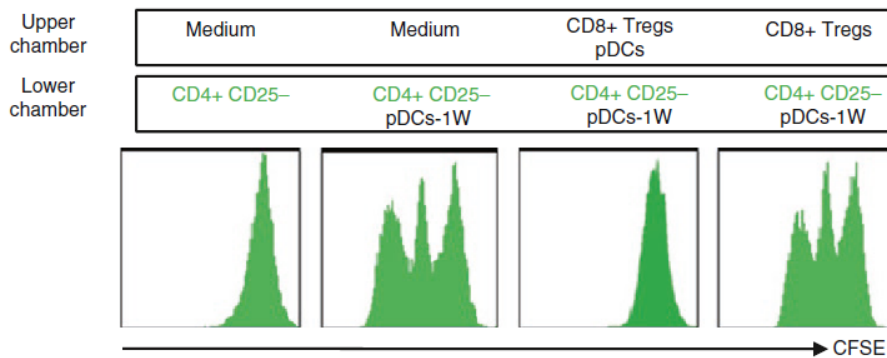


Fig. 4. The suppressive function assay by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4+CD25⁻ T cells in the presence of immature pDCs after 6 days of the transwell experiment. *Left panel:* there is no proliferation of the naive CD4+CD25⁻ T cells with medium alone. *Left middle panel:* strong proliferation of naive CD4+CD25⁻ T cells with the stimulation of allogeneic immature pDCs. *Right middle panel:* the proliferation of naive CD4+CD25⁻ T cells is strongly inhibited when the naive CD8+CD45RC^{low} regulatory T cells and allogeneic immature pDCs are loaded in the upper chamber. *Right panel:* there is no suppression by naive CD8+CD45RC^{low} regulatory T cells if there are no allogeneic pDCs in the upper chamber.

3.6. MLR by the Indirect Alloantigen Presentation Pathway

1. Collect the donor heart from the storage tube and transfer to a 5-ml culture dish, add 3–4 ml collagenase D, prewarmed in a 37°C water bath (see Note 8).
2. Inject collagenase D with syringes into the heart and mince it into small pieces with sterilized surgical blades.

3. Incubate naive heart pieces with collagenase D at 37°C in a Water-jacketed CO₂ incubator for at least 45 min.
4. After incubation, add 0.4 ml of 0.1 M EDTA to stop the reaction.
5. Prepare another 10-ml dish with a sterilized steel mesh, transfer the small pieces with a 10-ml pipette onto the mesh, and add 15 ml of PBS-FCS-EDTA solution.
6. Further disrupt the heart tissue by applying pressure using the syringe column.
7. Collect the suspension of cells in a 50-ml tube and wash the dish with cold PBS-FCS-EDTA solution.
8. Wash the cells by centrifuging at 524×g for 10 min at 4°C in PBS-FCS-EDTA solution.
9. After washing, resuspend the cells in 10-ml PBS-FCS-EDTA solution, filter the cell suspension using a cell strainer with a 100-µm pore size, and collect the cells in another 50-ml BD tube.
10. Prepare 15 ml of Ficoll Hypaque Plus in 50-ml BD Falcon tubes and very slowly add 5 ml of resuspended cells onto the Ficoll Hypaque Plus solution layer.
11. Centrifuge for 20 min at 930×g and at room temperature without braking.
12. Collect the cells from the interface: these are naive heart infiltrating lymphocytes. Wash with cold PBS-FCS-EDTA for 10 min by centrifuging at 630×g, 4°C and count the numbers.
13. Apoptosis of naive heart infiltrating lymphocytes is induced by UV irradiation (TUV 30 W/G 30 TB; Philips, The Netherlands; wavelength 280–340 nm), UV irradiation at room temperature for 3 h in complete RPMI-1640 medium.
14. Apoptotic cells are cocultured overnight with recipient (LEW.1A) DC subsets in a 96-well U-bottom culture plate, with complete RPMI-1640 culture medium at 37°C in a 5% CO₂ incubator. The ratio of the apoptotic cells and DC subset is 1:1 or less. The concentration of the coculture cells is 1 × 10⁶/ml.
15. After one night of coculture, Ficoll gradient centrifugation is used to harvest DCs loaded with donor alloantigens and to eliminate apoptotic cells. Wash the cells collected from the inter-phase with cold PBS-FCS-EDTA by centrifuging for 10 min at 630×g, 4°C and count the numbers. Resuspend the cells in complete RPMI-1640 medium and use for the MLR experiment.

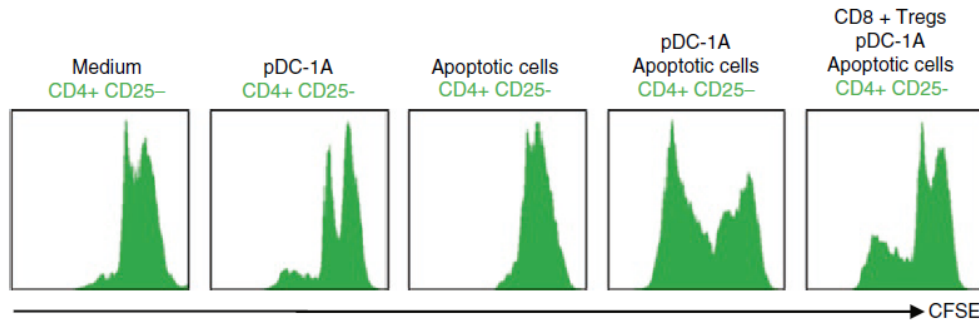


Fig. 5. The suppressive function assay by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4+CD25⁻ T cells in the presence of indirect allogeneic stimulation after 6 days of MLR coculture. There is no proliferation of the naive CD4+CD25⁻ T cells with medium alone, recipient immature pDCs, or the donor apoptotic naive heart resident leukocytes. A strong proliferation of naive CD4+CD25⁻ T cells with the stimulation of recipient immature pDCs after loading with donor apoptotic naive heart resident leukocytes, and strong inhibition when the naive CD8+CD45RC^{low} regulatory T cells are present.

16. The suppressive function assay is performed by analyzing the dilution of CFSE-labeled naive CD4+CD25⁻ T cells in the presence of indirect allogeneic stimulation after 6 days of coculture MLR (Fig. 5). (The figures are provided with the permission of the authors.)

4. Notes

1. The ³H incorporation assay is not recommended since the proliferation of DCs and suppressor cells cannot be excluded.
2. In some cases, the toxicity of Dynabeads or its stock solution will strongly influence the viability of T cells and DC subsets. The beads must be washed thoroughly. In addition, using less quantity of beads may partly prevent toxicity.
3. Check each individual serum before using in MLRs to ensure that each batch qualifies for proliferation assays (Fig. 6). Additionally, sera from different companies will exert a significant influence on the suppressive function of CD8+ Tregs. Finally, the same culture medium from different companies also influences the MLRs, the function of the CD8 Tregs, and the function and viability of DC subsets. Thus, the identification of the best combination of serum and coculture medium is very important to ensure consistent and reproducible results. For the functional analysis of rat CD8+ Tregs,

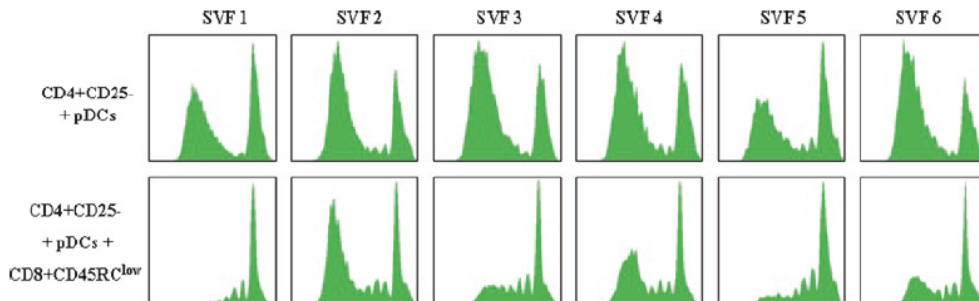


Fig. 6. The influence of sera on the suppressive function of CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells. Purified CD4⁺CD25⁻ T cells labeled with CFSE were cocultured with allogeneic pDCs for 6 days with or without the suppressive CD8⁺CD45RC^{low} T regulatory cells. After 6 days of coculture, proliferation of CFSE-labeled naive CD4⁺CD25⁻ T cells is analyzed by the dilution of CFSE after gating of TCR⁺CD4⁺ T cells. The proliferation is shown by a histogram of CFSE intensity.

FCS from Lonza Verniers and RPMI-1640 culture medium from Sigma are reliable. (The figures are provided with the permission of the authors.)

4. Always use PBS-FCS-EDTA solution for purification of the DC subsets and perform all the procedures in ice. RPMI-1640 medium with L-glutamine should be used for cell culture, and L-glutamine should be added when the medium is used. Fresh L-glutamine should be added if this is not used within a month.
5. Rats should be kept under specific pathogen-free conditions and used at 8–16 weeks of age.
6. Prepare enough number of naive CD4⁺CD25⁻ T cells before labeling the CFSE since this process could cause the cells to die.
7. V-bottom tubes, but not flat-bottom transwell culture plates, are required to ensure optimal cell–cell contact. It is vital that a perfect proliferation of naive CD4⁺CD25⁻ T cells is obtained in the transwell experiment.
8. For alloantigen indirect presentation pathway analysis, the use of naive donor heart leukocytes, but not donor spleen, is paramount, since apoptotic donor naive heart infiltrating cells do not induce any proliferation of naive recipient T cells, while donor splenocytes do. For testing the phagocytosis function of recipient DCs, donor naive heart leukocytes could be labeled with PKH prior to the irradiation. The uptake of PKH fluorescence by recipient DC subsets can be traced by confocal microscopy (Fig. 7). The figures are provided with the permission of the authors.

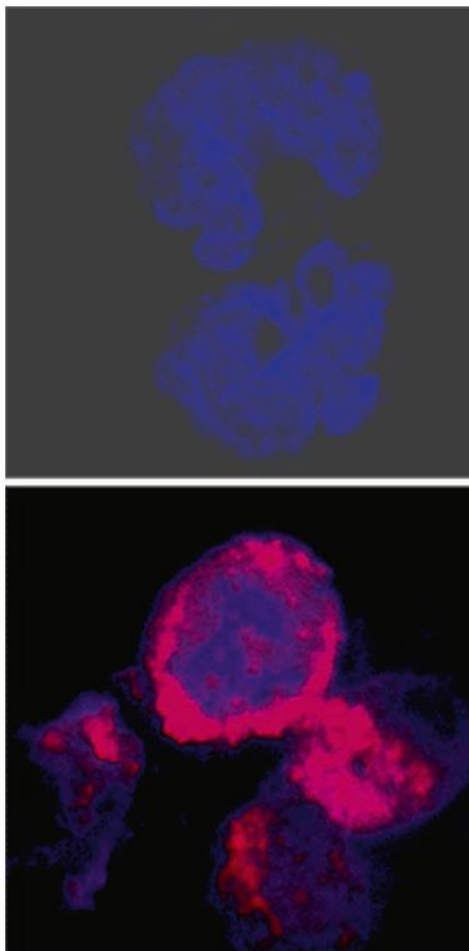


Fig. 7. For testing the phagocytosis function of recipient DCs. Donor naive heart infiltrating cells can be labeled with PKH prior to irradiation. The uptake of PKH fluorescence by recipient DCs subsets can be traced by confocal microscopy. *Left panel:* unloaded recipient pDCs immediately after FACS sorting and labeling nuclei with Topro3 (confocal analysis, $\times 63$). *Right panel:* recipient pDCs loaded for 24 h with donor PKH-labeled apoptotic cells (nuclei labeled with Topro3, confocal analysis, $\times 63$).

Acknowledgments

This work was supported by a research fellowship from the Transplantation Society and the Senior Basic Science Grant from the European Society for Organ Transplantation (to X.L.L.) as well the grants from the Roche Organ Transplantation Research Foundation and the Fondation Transvic (to I.A.).

References

- Gershon, R.K. and Kondo, K. 1971. Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-914.
- Cantor, H., Shen, F.W., and Boyse, E.A. 1976. Separation of helper T cells from suppressor T cells expressing different Ly components. II. Activation by antigen: after immunization, antigen-specific suppressor and helper activities are mediated by distinct T-cell subclasses. *J Exp Med* 143: 1391-1340.
- Thomas, Y., Rogozinski, L., Rabbani, L., Chess, A., Goldstein, G., and Chess, L. 1984. Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. VI. Distinct and opposing immunoregulatory functions within the OKT8⁺ population. *J Mol Cell Immunol* 1:103-113.
- Emara, M., Miceli, M.C., Finn, O.J., and Sanfilippo, F. 1988. Human suppressor T cells induced in vitro with an autologous renal allograft-derived T cell line. I. Suppressor cell induction, function, and specificity. *Hum Immunol* 23:223-240.
- Sindhi, R., Manavalan, J.S., Magill, A., Suci-Foca, N., and Zeevi, A. 2005. Reduced immunosuppression in pediatric liver-intestine transplant recipients with CD8⁺CD28⁻ T-suppressor cells. *Hum Immunol* 66:252-257.
- Colovai, A.I., Mirza, M., Vlad, G., Wang, S., Ho, E., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. 2003. Regulatory CD8⁺CD28⁻ T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64:31-37.
- Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A.J., Vlad, G., Colombo, P.C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. 2004. Alloantigen specific CD8⁺CD28⁻ FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16:1055-1068.
- Ciubotariu, R., Vasilescu, R., Ho, E., Cinti, P., Cancedda, C., Poli, L., Late, M., Liu, Z., Berloco, P., Cortesini, R., et al. 2001. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum Immunol* 62:15-20.
- Trzonkowski, P., Zilveti, M., Chapman, S., Wieckiewicz, J., Sutherland, A., Friend, P., and Wood, K.J. 2008. Homeostatic repopulation by CD28⁻CD8⁺ T cells in alemtuzumab-depleted kidney transplant recipients treated with reduced immunosuppression. *Am J Transplant* 8:338-347.
- Dijke, I.E., Caliskan, K., Klepper, M., de Kuiper, R., Balk, A.H., Maat, A.P., Weimar, W., and Baan, C.C. 2009. Donor-specific immune regulation by CD8 lymphocytes expanded from rejecting human cardiac allografts. *Am J Transplant* 9:397-403.
- Guillonau, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8⁺CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
- Jiang, H., Zhang, S.I., and Pernis, B. 1992. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 256: 1213-1215.
- Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., and Mak, T.W. 1992. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science* 256:1210-1213.
- Penninger, J.M., Neu, N., Timms, E., Wallace, V.A., Koh, D.R., Kishihara, K., Pummerer, C., and Mak, T.W. 1993. The induction of experimental autoimmune myocarditis in mice lacking CD4 or CD8 molecules (corrected). *J Exp Med* 178:1837-1842.
- Tada, Y., Ho, A., Koh, D.R., and Mak, T.W. 1996. Collagen-induced arthritis in CD4⁻ or CD8⁻ deficient mice: CD8⁺ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 156: 4520-4526.
- Brimnes, J., Allez, M., Dotan, I., Shao, L., Nakazawa, A., and Mayer, L. 2005. Defects in CD8⁺ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 174:5814-5822.
- Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B., Bhoj, V., Racke, M.K., and Karandikar, N.J. 2006. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176:7119-7129.
- Suzuki, M., Konya, C., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. 2008. Inhibitory CD8⁺ T cells in autoimmune disease. *Hum Immunol* 69: 781-789.
- Vlad, G. and Suci-Foca, N. 2008. Resurgence or emergence of CD8⁺ Ts. *Hum Immunol* 69:679-680.
- Niederhorn, J.Y. 2008. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Curr Opin Immunol* 20:327-331.
- Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V., and Vignali, D.A. 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in

- a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182:6121–6128.
22. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J.A., and Herold, K.C. 2005. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 115:2904–2913.
 23. Billerbeck, E., Blum, H.E., and Thimme, R. 2007. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3⁻ effector memory and de novo-generated FoxP3⁺ regulatory CD8⁺ T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 179:1039–1048.
 24. Joosten, S.A., van Meijgaarden, K.E., Savage, N.D., de Boer, T., Triebel, F., van der Wal, A., de Heer, E., Klein, M.R., Geluk, A., and Ottenhoff, T.H. 2007. Identification of a human CD8⁺ regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8029–8034.
 25. Wei, S., Kryczek, I., Zou, L., Daniel, B., Cheng, P., Mottram, P., Curiel, T., Lange, A., and Zou, W. 2005. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 65: 5020–5026.
 26. Gilliet, M. and Liu, Y.J. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 195:695–704.
 27. Ordóñez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 4:e5287.
 28. Dhodapkar, M.V. and Steinman, R.M. 2002. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8(+) regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100:174–177.
 29. Cai, J., Lee, J., Jankowska-Gan, E., Derks, R., Pool, J., Mutis, T., Goulmy, E., and Burlingham, W.J. 2004. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8⁺ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. *J Exp Med* 199:1017–1023.
 30. Siegmund, K., Ruckert, B., Ouaked, N., Burgler, S., Speiser, A., Akdis, C.A., and Schmidt-Weber, C.B. 2009. Unique phenotype of human tonsillar and in vitro-induced FOXP3+CD8⁺ T cells. *J Immunol* 182: 2124–2130.
 31. Zheng, J., Liu, Y., Qin, G., Chan, P.L., Mao, H., Lam, K.T., Lewis, D.B., Lau, Y.L., and Tu, W. 2009. Efficient induction and expansion of human alloantigen-specific CD8 regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells. *J Immunol* 183:3742–3750.
 32. Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J. 2006. CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 177: 2775–2783.
 33. Myers, L., Croft, M., Kwon, B.S., Mittler, R.S., and Vella, A.T. 2005. Peptide-specific CD8 T regulatory cells use IFN-gamma to elaborate TGF-beta-based suppression. *J Immunol* 174:7625–7632.
 34. Noble, A., Giorgini, A., and Leggat, J.A. 2006. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood* 107:4475–4483.
 35. Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C., and Lucas, B. 2005. Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol* 175:246–253.
 36. Sugita, S., Futagami, Y., Horie, S., and Mochizuki, M. 2007. Transforming growth factor beta-producing Foxp3(+)CD8(+) CD25(+) T cells induced by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions. *Exp Eye Res* 85:626–636.
 37. Menager-Marcq, I., Pomie, C., Romagnoli, P., and van Meerwijk, J.P. 2006. CD8(+)CD28(-) Regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 131:1775–1785.
 38. Hahn, B.H., Singh, R.P., La Cava, A., and Ebling, F.M. 2005. Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8⁺ T cell suppressors. *J Immunol* 175:7728–7737.
 39. Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., and Suzuki, H. 2004. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med* 200:1123–1134.
 40. Endharti, A.T., Rifa'i, M., Shi, Z., Fukuoka, Y., Nakahara, Y., Kawamoto, Y., Takeda, K., Isobe, K., and Suzuki, H. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8⁺ T cells. *J Immunol* 175:7093–7097.
 41. Chen, X., Priatel, J.J., Chow, M.T., and Teh, H.S. 2008. Preferential development of CD4

- and CD8 T regulatory cells in RasGRP1-deficient mice. *J Immunol* 180:5973–5982.
42. Izawa, A., Yamaura, K., Albin, M.J., Jurewicz, M., Tanaka, K., Clarkson, M.R., Ueno, T., Habicht, A., Freeman, G.J., Yagita, H., et al. 2007. A novel alloantigen-specific CD8+PD1+ regulatory T cell induced by ICOS-B7h blockade in vivo. *J Immunol* 179: 786–796.
 43. Ju, S.A., Park, S.M., Lee, S.C., Kwon, B.S., and Kim, B.S. 2007. Marked expansion of CD11c+CD8+ T-cells in melanoma-bearing mice induced by anti-4-1BB monoclonal antibody. *Mol Cells* 24:132–138.
 44. Seo, S.K., Choi, J.H., Kim, Y.H., Kang, W.J., Park, H.Y., Suh, J.H., Choi, B.K., Vinay, D.S., and Kwon, B.S. 2004. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 10:1088–1094.
 45. Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M.E., Shinohara, M.L., and Cantor, H. 2004. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 5:516–523.
 46. Ho, J., Kurtz, C.C., Naganuma, M., Ernst, P.B., Cominelli, F., and Rivera-Nieves, J. 2008. A CD8+/CD103high T cell subset regulates TNF-mediated chronic murine ileitis. *J Immunol* 180:2573–2580.
 47. Wang, J., Jiang, S., Shi, H., Lin, Y., Wang, J., and Wang, X. 2008. Prolongation of corneal xenotransplant survival by T-cell vaccination-induced T-regulatory cells. *Xenotransplantation* 15:164–173.
 48. Liu, Y., Chen, N., Chen, G., and You, P. 2007. The protective effect of CD8+CD28- T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 39:3396–3403.
 49. Zhou, J., Carr, R.I., Liwski, R.S., Stadnyk, A.W., and Lee, T.D. 2001. Oral exposure to alloantigen generates intragraft CD8+ regulatory cells. *J Immunol* 167:107–113.
 50. Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104:3294–3301.
 51. Han, G., Shao, H., Peng, Y., Zhang, P., Ke, Y., Kaplan, H.J., and Sun, D. 2007. Suppressor role of rat CD8+CD45RClow T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *J Neuroimmunol* 183:81–88.
 52. Oluwole, S.F., Ng, A.K., Reemtsma, K., and Hardy, M.A. 1989. The mechanism of the induction of immunologic unresponsiveness to rat cardiac allografts by recipient pretreatment with donor lymphocyte subsets. *Transplantation* 48:281–288.
 53. Kataoka, M., Margenthaler, J.A., Ku, G., and Flye, M.W. 2003. Development of infectious tolerance after donor-specific transfusion and rat heart transplantation. *J Immunol* 171:204–211.
 54. Miller, A., Lider, O., and Weiner, H.L. 1991. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J Exp Med* 174:791–798.

PUBLICATIONS

- ∴ **Bézie S**, Picarda E, Tesson L, Renaudin K, Durand J, Meriau E, Chiffolleau E, Guillonneau C, Anegon I, Caron L. Fibrinogen-like protein 2 (FGL2)/fibroleukin induces long-term allograft survival through regulatory B cells. *Soumis dans J Immunol*.

- ∴ **Bézie S**, Picarda E, Tesson L, Renaudin K, Meriau E, Guillonneau C, Anegon I, Caron L. Interleukin-34 is able to prevent rat cardiac allograft from acute rejection. *En préparation*

- ∴ Picarda E, **Bézie S**, Venturi V, Renaudin K, Delhumeau A, Merieau E, Davenport M, Anegon I, Guillonneau C. Alloantigenic recognition properties of CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells dictate suppressive activity. *En préparation*

- ∴ Li XL, Ménoret S, **Bezie S**, Caron L, Chabannes D, Hill M, Halary F, Angin M, Heslan M, Usal C, Liang L, Guillonneau C, Le Mauff B, Cuturi MC, Josien R, Anegon I. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):823-33.

- ∴ Ménoret S, Guillonneau C, **Bezie S**, Caron L, Anegon I, Li XL. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol Biol*. 2011;677:63-83.

COMMUNICATIONS ORALES

- ∴ **Bézie S**, Anegon I, Caron L. Rôle de FGL2 dans la fonction immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RClow dans un modèle d'allotransplantation cardiaque chez le rat.
 - 10ème Congrès annuel de la société francophone de transplantation, Genève, Suisse, 16/12/09

- ∴ **Bézie S**, Anegon I, Caron L. Immunosuppressive role of Fibrinogen-like-protein 2 in CD8⁺ regulatory T cells-mediated long-term graft survival.
 - ESOT, Glasgow, Ecosse, 6/09/11
 - EWIMID, Nice, France, 24/11/11
 - SFT, Montpellier, France, 09/12/11

POSTERS

- ∴ Angin M, Li XL, Ménoret S, **Bézie S**, Tesson L, Le Mauff B, Anegon I, Caron L. Allospecific CD8⁺ Treg cells after CD40L blockade : Genes involved in immunosuppressive responses.
 - ESOT, Bruxelles, Belgique. 2009

- ∴ **Bézie S**, Anegon I, Caron L. FGL2 as a new immunosuppressive molecule.
 - ESOT, Nice, France, 01/10/2010

- ∴ **Bézie S**, Anegon I, Caron L. Immunosuppressive role of Fibrinogen-like-protein 2 (FGL2) in CD8⁺ Regulatory T cells-mediated long-term graft survival.
 - BSS, Boston, USA, 11-14/06/11
 - CTS-IXA 2011 Joint Congress, Miami, Floride, USA, 23-26/10/11
 - Journée de la recherche translationnelle, Institut Pasteur, Paris, France, 14/11/11

- ∴ Ménoret S, **Bézie S**, Li XL, Usal C, Caron L and Anegon I. Tranilast, an analogue of tryptophan catabolites, induces allograft tolerance by CD161⁺ cells.
 - EWIMID, Nice, France, 24/11/11

**Caractérisation de la fibrinogen-like protein 2 et de l'interleukine-34 identifiées
chez les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} dans un modèle
d'allotransplantation chez le rat.**

Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} existent à l'état naturel chez l'Homme et le rat. La compréhension de leurs mécanismes de suppression permettrait de moduler la réponse immune chez les patients transplantés et de réduire leur traitement immunosuppresseur. L'équipe a montré que le blocage de la voie CD40 augmente le potentiel tolérogène des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low}. L'analyse par puce à ADN des lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} induits versus naturels a permis d'identifier deux molécules impliquées dans leur suppression : la fibrinogen-like protein 2/fibroleukin (FGL2) et l'interleukine-34 (IL-34). Par la stratégie du transfert de gène, nous montrons que FGL2 est nécessaire et suffisante pour inhiber la réponse T *in vitro* et prévenir du rejet aigu l'allogreffe cardiaque chez le rat, par la génération de lymphocytes B régulateurs. De façon intéressante, ces travaux montrent pour la première fois la capacité de lymphocytes B régulateurs à transmettre la tolérance de manière infectieuse. Par cette même stratégie, les propriétés immunorégulatrices de l'IL-34 ont été montrées *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'IL-34 peut supprimer la réponse T allogénique *in vitro* via le M-CSF R et prolonger la survie de l'allogreffe. Ainsi, ces travaux de thèse suggèrent deux nouveaux biomarqueurs potentiels de tolérance afin d'adapter l'immunosuppression chronique chez les patients transplantés. Ils ont permis d'approfondir les connaissances concernant deux populations régulatrices que sont les lymphocytes T régulateurs CD8⁺CD45RC^{low} et les lymphocytes B régulateurs chez le rat. La caractérisation phénotypique et fonctionnelle des Tregs sera poursuivie chez l'Homme.

Mots-clés : *allotransplantation, rat, tolérance, cellules régulatrices, FGL2, IL-34.*

**Characterization of fibrinogen-like protein 2/fibroleukin and interleukin-34 identified
in CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells in a rat allotransplantation model**

Natural CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells exist in Human and rat. A better understanding of their suppressive mechanisms would allow to modulate immune response in transplanted patients and immunosuppressive treatment. Our team has already shown that CD8⁺ regulatory T cells tolerogenic properties are increased by blocking CD40 pathway. Transcriptomic comparison of induced versus natural CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells highlighted two potentially suppressive molecules : fibrinogen-like protein 2/fibroleukin (FGL2) and interleukin-34 (IL-34). Using gene transfer strategy, we show that FGL2 is necessary and sufficient to inhibit T cells response *in vitro* and to prevent cardiac allograft from acute rejection in rat. Interestingly, this work shows for the first time infectious tolerance by B lymphocytes. The same strategy was used to show immunoregulatory properties of IL-34 *in vitro* and *in vivo*. Indeed, IL-34 is able to suppress allogenic T cells reponse via M-CSFR *in vitro* and to prolong allograft survival. Thus, those results suggest two new potential tolerance biomarkers to adapt chronic immunosuppressive treatment in transplanted patients, and to increase our knowledge of both CD8⁺CD45RC^{low} T and B regulatory cells in rat. Phenotypic and functional characterization of Tregs will be carry on in Human.

Keywords : *allotransplantation, rat, tolerance, regulatory cells, FGL2, IL-34.*