

Thèse de Doctorat

Jason OSSART

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie Médecine Santé*

Spécialité : *Immunologie*

Unité de recherche : *CRTI U1064*

Soutenue le *13/03/18*

Thèse N° :

Génération et analyse d'un nouveau modèle de la maladie APECED par déficience pour Aire chez le rat.

JURY

Président du jury	Ignacio ANEGON, Directeur de recherche, Centre de recherche en transplantation en immunologie UMR 1064
Rapporteurs :	Magali IRLA, Docteur CR1-Inserm, HDR, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (CIML) Joost VAN MEERWIJK, Professeur, INSERM U1043 - CNRS UMR 5282 – Université de Toulouse
Examineurs :	Ignacio ANEGON, Directeur de recherche, Centre de recherche en transplantation en immunologie UMR 1064 Roberto MALLONE, Directeur de recherche, Institut Cochin
Directeur de Thèse :	Carole GUILLONNEAU, Directrice de recherche, Centre de recherche en transplantation en immunologie UMR 1064
Co-directeur de Thèse :	Régis JOSIEN, Professeur, Centre de recherche en transplantation en immunologie UMR 1064

Remerciements

Je remercie le Dr. Magali Irla et le Dr. Joost Van Meerwijk pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que pour leurs conseils dans sa rédaction. Je remercie également le Dr. Roberto Mallone et le Dr. Ignacio Anegon pour avoir examiné ce travail.

Je tiens également à remercier le Dr. Ignacio Anegon pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire depuis mon stage de master 2.

Je remercie le Pr. Régis Josien pour m'avoir aiguillé durant ce travail et pour avoir co-encadré ma thèse.

Je remercie le Dr. Carole Guillonnet pour m'avoir encadré depuis mon Master 2 et pour m'avoir permis de faire cette thèse.

Je tiens également à remercier le Dr. Bernard Vanhove et le Dr. Jean-Marie Bach pour avoir participé à mes comités de suivi de thèse, pour leurs conseils et leur soutien.

Je remercie l'ensemble des personnes qui ont été proches de moi ces 4 dernières années et tout particulièrement Camille qui non-seulement m'a soutenue chaque jour au laboratoire mais également tous les jours à la maison (ce qui est clairement un exploit). Je te remercie pour les 2 principales choses que tu m'as fait découvrir : le protocole hybride d'extraction d'ARN de tissu sur colonne et les brocolis.

Je veux également remercier tout particulièrement Laurent Tesson, le dinosaure de la bio mol. Non seulement pour l'aide technique, je ne pourrai pas lister l'ensemble des choses que tu m'as apprises tellement il y en a. Mais également pour ta capacité à me faire rire dans n'importe quel moment. Enfin, je voudrais te remercier pour la relecture afin de corriger cette thèse qui serait bien moins agréable à lire avec les 500 fautes d'orthographe que tu as supprimées.

Je veux également remercier le Dr. Sebastian Riquelme Colet, tu es l'une des personnes m'ayant apporté le plus dans ce laboratoire, tu m'as montré les différentes facettes de ce métier, nos soirées bière / réflexion scientifiques m'ont énormément servi. Tu restes pour moi, en plus d'un ami, un modèle dans ma carrière à venir.

Je remercie Raphael Rispal, bien que je ne t'ai connu qu'en dernière année de thèse, tu es vite devenu un ami et tu m'as également beaucoup aidé notamment dans la recherche de mon post-doc et dans les dernières étapes de la rédaction de thèse. (ne pleure pas en lisant ça).

Je remercie le Dr. Elodie Picarda, tu m'as appris beaucoup de choses sur mon deuxième projet et tes conseils avant de partir m'ont été très utiles.

Enfin, je remercie les autres chercheurs qui m'ont beaucoup apporté, le Dr. Cédric Louvet dont les conseils ont été extrêmement précieux lorsque je me suis attaqué au design des primers pour les TCR de rat. Le Dr. Tuan Huy Nguyen pour son soutien envers moi et ma très chère femme. Ca a été un plaisir de t'avoir avec nous à notre mariage.

Je remercie également l'ensemble de mes collègues avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments au laboratoire mais également en soirée, Eros, Lucas, Ahmed, Laetitia, Diego, Maxim, Mathieu, Richard, Amédée, Sabrina, Justine D, Gaelle B, Aurélie F, Apolline, Gwen, Virginie, Vanessa G et C, Laure-Hélène, Frank.

Je remercie Claire, Manu et Chad pour toute l'aide à l'animalerie, les greffes toujours magnifiques et la bonne humeur permanente.

Je remercie mes collègues de bureau (du dernier) Gaelle, Carole et Lola. Lola, je ne sais pas comment je vais faire dans mon futur labo sans toi,... je vais enfin pouvoir passer plus de 20 minutes à travailler sans qu'on me pose une question.

Enfin je veux remercier ma famille et tout particulièrement mes parents, premièrement pour m'avoir donné la vie, première étape nécessaire avant d'arriver à l'écriture de cette thèse. Je vous remercie également pour le soutien financier sans lequel je n'aurai jamais pu suivre cette passion, je vous promets de vous mettre dans une très bonne maison de retraite pour vous en remercier.

Sommaire

Sommaire	4
Table des illustrations	6
Liste des abréviations	8
Introduction	10
A. La tolérance immune	10
I- Tolérance centrale	12
1. Le thymus	12
1.1. Le développement du thymus	13
1.2. Le stroma thymique	14
(a). Les cellules dendritiques thymiques	15
1.3. Les cellules épithéliales thymiques	16
(a). Les cellules épithéliales thymiques corticales	18
(b). Les cellules épithéliales thymiques médullaires	19
1.4. Les antigènes spécifiques de tissus	25
2. Les mécanismes de sélection des lymphocytes T	27
2.1. Les mécanismes de la diversité du TCR	27
(a). Les enzymes de la recombinaison, RAG1 / RAG2, la recombinaison V (D) J	28
(b). Génération de la diversité du répertoire	29
(i). La diversité combinatoire	29
(ii). La diversité d'appariement	30
(iii). La diversité jonctionnelle	30
(c). Engagement dans la lignée $\alpha \beta$	32
(d). La sélection beta	32
2.2. La sélection positive	33
2.3. La sélection négative	37
(a). Sélection des T régulateurs	40
II- Tolérance périphérique	43
1. La tolérance passive	44
1.1. La délétion clonale/l'apoptose	44
1.2. L'anergie	44
1.3. L'ignorance	45
2. La tolérance active	45
2.1. Les lymphocytes T régulateurs	45
(a). Les lymphocytes T régulateurs $CD4^+$	46

(i). Les Tregs CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	46
(ii). Les mécanismes de suppression des Tregs CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	48
(a). La suppression par contact cellulaire	48
(b). La perturbation métabolique	48
(c). Les cytokines immunosuppressives	49
(b). <i>Les Tr1</i>	49
(c). <i>Les Tregs CD8⁺</i>	49
(i). Les Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low}	50
(ii). Les T régulateurs CD8 ⁺ CD28 ⁻	54
B. Aire, le régulateur de l'auto-immunité	55
I- L' APECED ou APS-1	55
II- Les modèles de déficience pour Aire	57
III- Rôle de Aire	60
1. Dans la tolérance centrale	60
1.1. Activité transcriptionnelle	60
1.2. Mise en évidence de la fonction de Aire	63
2. Dans la tolérance périphérique	64
C. La technologie des ZFNs	66
Objectifs de la thèse	68
Résultats	72
A. Description du modèle	72
I- Article 1 : Breakdown of immune tolerance in Aire-deficient rats induces a severe APECED-like autoimmune disease	72
B. Article Aire et Tregs rat / humain	128
I- Les Tregs issus d'animaux Aire ^{-/-} présentent une altération de leurs fonctions suppressives.	129
Discussion / perspectives	145
CV et liste des publications	252

Table des illustrations

Figure 1 Représentation schématique de l'équilibre du système immunitaire	10
Figure 2 L'hématopoïèse	11
Figure 3 Conservation des organes lymphoïdes au sein des vertébrés.	13
Figure 4 Structure du thymus.	16
Figure 5 Model de développement des mTECs.....	18
Figure 6 Les acteurs cellulaires, ligands et recepteurs impliqués dans la différenciation des mTECs Aire ⁺	24
Figure 7 Les mécanismes de la recombinaison V(D)J.	31
Figure 8 Evolution de la signalisation TCR en fonction du stade de développement d'un thymocyte. a.	38
Figure 9 Les étapes de selection positive et négative dans le thymus.	40
Figure 10 La molécule CD45 et ses isoformes générées par épissage alternatif	50
Figure 11 Résumé des travaux de caractérisation des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low} réalisé par notre équipe chez le rat.	53
Figure 12 Représentation des symptômes associés à l'APECED	57
Figure 13 Tableau comparatif des différentes souches de souris Aire ^{-/-} , (Hubert et al. 2009).	60
Figure 14 Représentation schématique des différents domaines de la protéine Aire et de ses partenaires.	63
Figure 16 Rôle du régulateur Aire dans les mTECs et conséquence de sa déficience.	64
Figure 16 Les Tregs d'animaux Aire ^{-/-} SPD agés de plus de 6 mois issus de la rate ont une capacité suppressivie altérée in-vitro.	131
Figure 17. Les Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} CD127 ^{low} d'animaux Aire ^{-/-} SPD agés de plus de 6 mois triés à partir la rate ont une fonction suppressivie altérée in-vivo dans un modèle de « Wasting disease », dans un contexte auto-réactif.	134
Figure 18 Profil immunoscope de la region CDR3 pour l'ensemble des Vbeta d'un animal Aire ^{-/-}	137
Figure 19. Analyse du repertoire TCR Vbeta des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low} et CD4 ⁺ CD25 ^{hi} par immunoscope.	138
Figure 20. Les rats Aire ^{-/-} ont un repertoire TCR Vbeta 11 restreint avec un biais privé.....	140
Figure 21. Les rats Aire ^{-/-} semblent présenter un défaut de selection des Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low} spécifiques du peptide 51.	142
Figure 22. Courbe de survie du greffon chez des animaux Lewis 1A greffés avec un coeur Lewis 1W.....	143

Tableau 1 : Tableau comparatif Homme / souris résumant les différences observées entre le syndrome humain et le phénotype des modèles de souris.69

Tableau 2 : Tableau comparatif repertoriant certaines observation entre l'Homme, la souris et le rat.... 151

Liste des abréviations

Ac	Anticorps
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Antigène
AID	Activation-Induced cytidine Deaminase
AICD	Activation Induced Cell Death
AIRE	AutoImmune Regulator
AP-1	Activator Protein-1
APC	Cellule Présentatrice d'Antigènes
APRIL	A Proliferation-Inducing Ligand
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
BAFF	B cell-Activating Factor
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cells
CD	Cluster de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
cTEC	Cortical Thymic Epithelial Cells
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4
DC	Dendritic Cell
DCIR	Dendritic Cell immunoReceptor
DN	Double Négative
DSG	Déoxyspergualine
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale
EBI3	Epstein-Barr virus induced gene 3
Foxp3	Forkhead box P3
Gal-1	Galectin-1
GITR	Glucocorticoid-Induced TNF-related Receptor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GVHD	Graft Versus Host Disease
HLA	Human Leucocyte Antigen
HO-1	Hème Oxygenase-1
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyl Transférase
IDO	Indoléamine 2,3- Dioxygénase
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IS	ImmunoSuppresseur
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
KO	Knock-Out
LB	Lymphocytes B
LT	Lymphocytes T
LEW	Lewis
LFA-1	Leucocyte-Function-Associated <i>molecule</i> 1
LPS	Lipopolysaccharide
MAI	Maladie Auto-Immune
MLR	Mixed Leucocyte Reaction

mTEC	medullary Thymic Epithelial Cells
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF κ B	nuclear factor- κ B
NK	Natural killer
NOD	Non-Obese Diabetic
Nrp-1	Neuropilin-1
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaire
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PD-1	Programmed Death 1
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	T Cell receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Th	T helper
TLR	Toll-Like Receptor
TNF	Tumor necrosis Factor
Treg	Cellule T régulatrice
WT	Wild Type

Introduction

A. La tolérance immune

La tolérance immune est une notion importante de l'immunologie. Les bases de ce principe ont été posées par Sir Macfarlane Burnet en 1957. Elle se définit comme une absence de réaction ou une réaction délétère du système immunitaire contre des antigènes spécifiques et notamment contre les auto-antigènes (Auto-Ag). Cette tolérance immune permet aux composants du soi de ne pas être reconnus et donc d'empêcher l'auto-immunité. La mise en place de la tolérance est un fondement de l'établissement du système immunitaire. En effet, les mécanismes de la tolérance sont à l'origine d'une « régulation » du système immunitaire permettant l'équilibre de la balance entre réactivité contre le non-soi et tolérance au soi (Figure 1). Il existe deux niveaux de tolérance qui sont complémentaires et indissociables. Dans des conditions pathologiques, cette tolérance au soi peut être altérée et conduire à une réponse immunitaire non contrôlée. C'est alors que peuvent se développer des maladies auto-immunes (MAIs) dont les conséquences peuvent être graves voire létales pour l'individu.

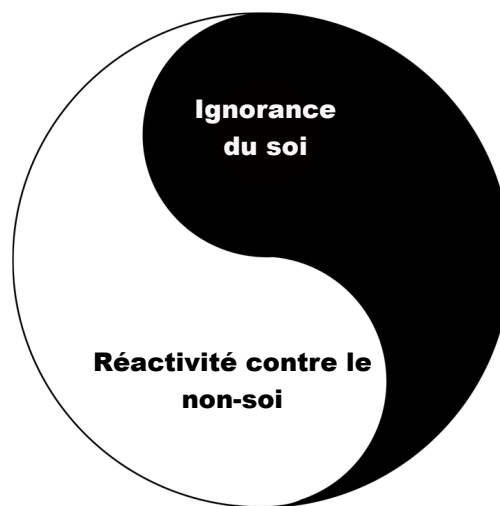


Figure 1 Représentation schématique de l'équilibre du système immunitaire

Ces deux mécanismes dits de tolérance centrale et tolérance périphérique prennent place dans des sites anatomiques différents. La tolérance centrale se déroule exclusivement au niveau des organes lymphoïdes primaires : dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B

et dans le thymus en ce qui concerne les lymphocytes T, alors que la tolérance périphérique, comme l'indique son nom prend place au niveau de l'ensemble de la périphérie et essentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires et concerne les lymphocytes matures. Ces deux mécanismes vont être décrits en détail ci-dessous. Les lymphocytes T (LTs) sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire. Ils dérivent d'un précurseur hématopoïétique commun aux lymphocytes B (LBs) et T générés dans la moelle osseuse, puis ils vont être « éduqués » dans le thymus, d'où leur nom de lymphocytes T (Figure 2). C'est à ce moment que le mécanisme de la tolérance centrale entre en jeu.

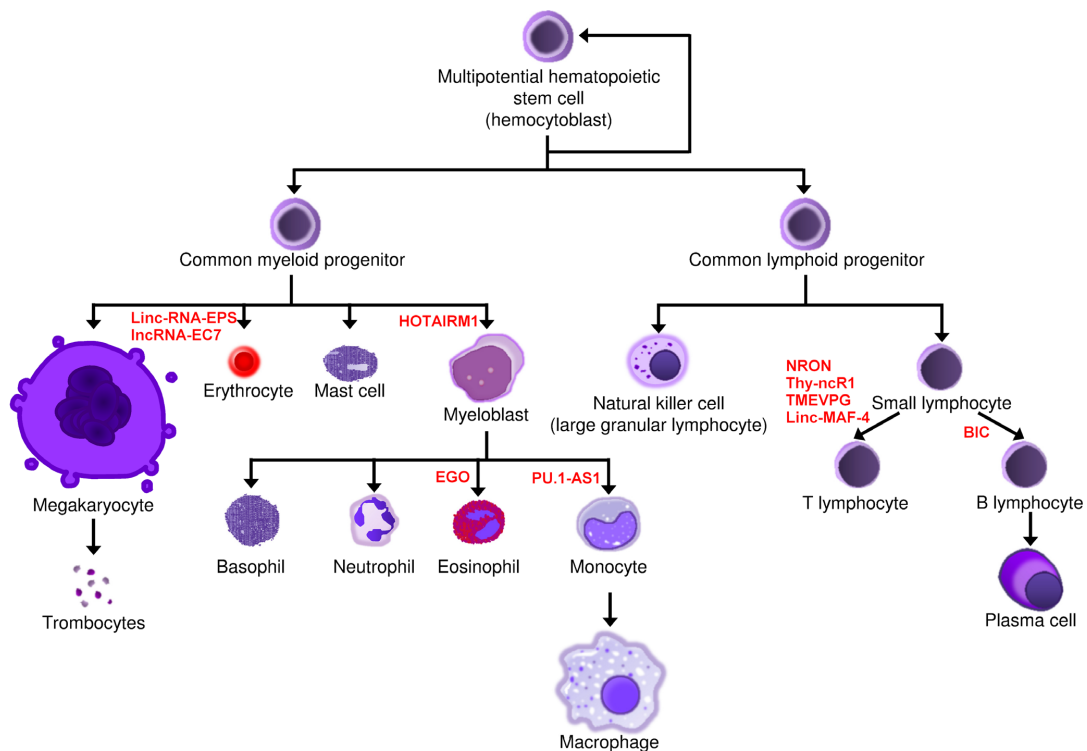


Figure 2 *L'hématopoïèse* (Nobili et al., 2016), les lymphocytes T dérivent d'un précurseur hématopoïétique généré dans la moelle osseuse.

I-Tolérance centrale

Deux étapes majeures se déroulent durant l'éducation des LTs. Une première étape dite de sélection positive durant laquelle les LTs sont sélectionnés selon leur affinité avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 ou 2 et une seconde étape dite de sélection négative où ils ne sont pas sélectionnés lorsqu'ils reconnaissent un complexe CMH/peptide du soi (Starr et al., 2003). Ces deux étapes se déroulent dans le thymus et bien qu'elles aient été longtemps considérées comme séparées chronologiquement et physiquement, nous verrons que ces deux types de sélection se déroulent majoritairement dans le cortex. Au cours de leur éducation, les LTs subissent le réarrangement des gènes de leur récepteur d'antigène (TCR) appelé recombinaison V(D)J. C'est la structure particulière du thymus ainsi que la diversité cellulaire présente dans cet organe qui vont permettre l'éducation des lymphocytes T (Kyewski and Klein, 2006). La compréhension de l'organisation du thymus est donc fondamentale pour définir le mécanisme de la tolérance centrale.

1.Le thymus

Le thymus est un organe lymphoïde primaire extrêmement conservé au sein des vertébrés (Boehm and Swann, 2014) (Figure 3). Il s'agit d'un organe thoracique situé dans le médiastin antérieur juste au dessus du cœur (Figure 4a). Il est composé principalement de deux lobes, chaque lobe est enveloppé d'une capsule fibreuse. De la face interne de cette capsule partent des septas conjonctifs qui s'enfoncent plus ou moins profondément dans le parenchyme et le divisent en nombreux lobules. Chaque lobule comprend une zone périphérique sombre, le cortex, et une région centrale claire, la médulla dans laquelle on distingue de petites zones colorées en rouge, les corpuscules de Hassall (Figure 4 b et c).

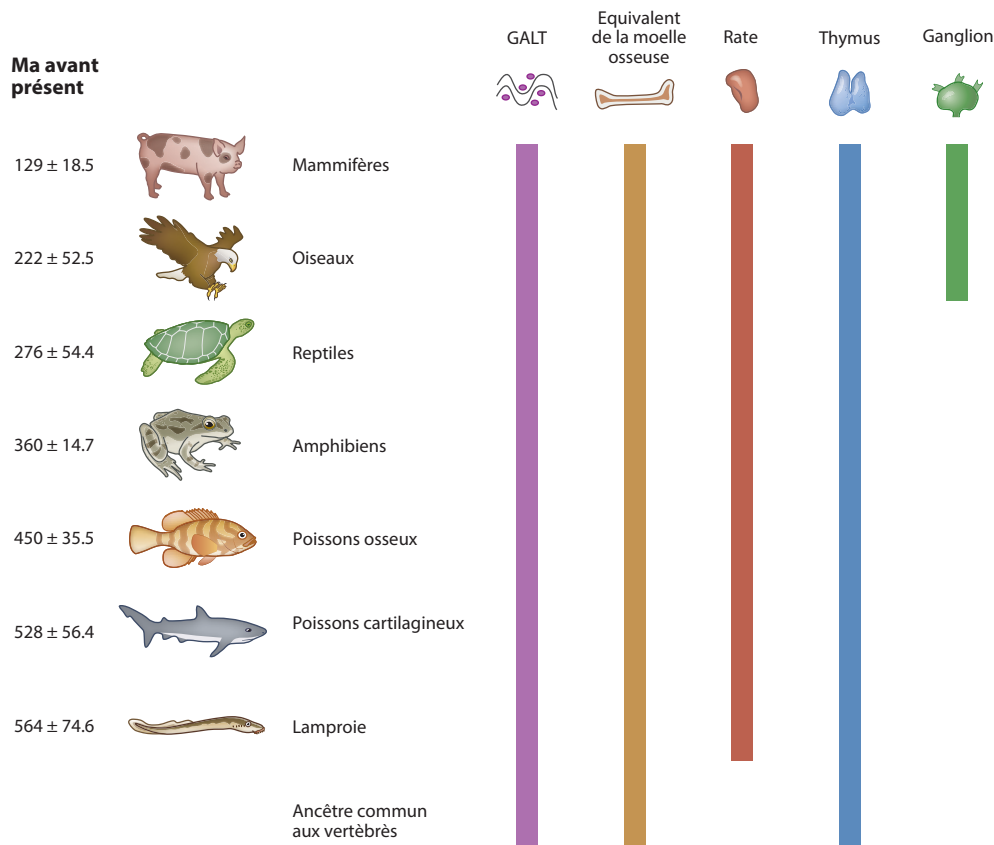


Figure 3 Conservation des organes lymphoïdes au sein des vertébrés (Boehm and Swann, 2014), le thymus est un organe lymphoïde primaire conservé chez l'ensemble des vertébrés. Les barres verticales indiquent l'apparition de l'organe, agrégats lymphoïdes associés à l'intestin (GALT, violet), l'équivalent de la moelle osseuse (jaune), la rate (rouge), le thymus (bleu) et les ganglions (vert).

1.1. Le développement du thymus

La question de l'origine embryonnaire du thymus a été étudiée pendant une longue période. Les premières hypothèses pour expliquer l'architecture du thymus composée des deux zones que sont le cortex et la médulla étaient que le cortex dérivait de l'ectoderme et que la médulla provenait de l'endoderme (Cordier and Haumont, 1980). Des études plus récentes ont réfuté cette hypothèse via des expériences de chimérisme chez la souris. Pour cela, les animaux chimères ont été générés par injection de cellules embryonnaires dans un blastocyste avec un CMH différent de celui des cellules embryonnaires. Lors du développement thymique, des îlots de cellules épithéliales comportant des mTECs et des cTECs sont observés. Dans le cas d'une origine différente de ces deux types cellulaires, des îlots composés de cellules des deux CMH devraient être retrouvés. Or les cellules qui

composent les ilots n'exprimaient qu'un seul CMH. Ces résultats ont donc permis de démontrer que les TECs dérivent d'un même feuillet embryonnaire, que les ilots TECs proviennent d'un progéniteur commun et sont dus à une expansion de ce progéniteur (Rodewald, 2004; Rodewald et al., 2001). En parallèle, des études ont montré une apoptose importante des cellules dérivées de l'ectoderme (Gordon et al., 2004). De plus, des cellules de l'endoderme prélevées à E9, greffées dans des receveurs nude, se développent en thymus fonctionnel possédant des zones corticales et médullaires et une architecture normale (Gordon et al., 2004), suggérant l'origine commune des TECs d'origine endodermale.

Lors du développement embryonnaire, une ébauche constituée de cellules épithéliales se constitue et sera par la suite colonisée par des cellules hématopoïétiques, notamment des précurseurs lymphoïdes et les cellules dendritiques (DCs), permettant de définir la structure finale du thymus. En effet, l'interaction entre les cellules stromales et les cellules d'origine hématopoïétique va clairement définir la structure du thymus.

1.2. Le stroma thymique

Le stroma thymique est défini par l'ensemble des cellules non-hématopoïétiques qui vont constituer la structure du thymus et par conséquent la matrice sur laquelle vont se développer les thymocytes. Parmi les cellules d'origine non-hématopoïétique CD45⁻ constituant ce stroma, nous pouvons définir deux catégories basées sur l'expression de la kératine. Les cellules épithéliales (kératine⁺) et les cellules mésenchymateuses (kératine⁻). Les cellules épithéliales peuvent également être séparées en deux sous-types majeurs que sont les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs) et les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTECs). Ces deux types cellulaires seront abordés en détails dans la suite de ce manuscrit. Les cellules kératine⁻, comprennent des fibroblastes (Gray et al., 2007b), des cellules mésenchymateuses non fibroblastiques (Müller et al., 2005), les cellules formant la capsule et les septas ainsi que les cellules endothéliales formant la vascularisation du thymus (Anderson et al., 2000). En plus des cellules CD45⁻, certaines cellules CD45⁺ font partie du stroma thymique comme les cellules dendritiques ou les macrophages.

Le stroma thymique est donc composé d'une variété hétérogène de cellules en regardant à un temps précis et sa composition varie de plus dans le temps notamment via l'involution thymique liée à l'âge qui impacte fortement la fonction de cet organe (Gray et al., 2006).

L'analyse de la fonction des types cellulaires présents dans le thymus est relativement complexe du fait de l'existence d'un « crosstalk » important notamment entre les thymocytes en développement et l'ensemble des composants du stroma thymique (van Ewijk et al., 1994).

(a). Les cellules dendritiques thymiques

A l'heure actuelle, il y a trois types de cellules dendritiques qui ont été définis dans le thymus (Bendriss-Vermare et al., 2001). Deux sous-types de cDCs et des pDCs (Wu and Shortman, 2005). Les deux sous-types de cDCs sont caractérisés par un fort niveau d'expression de CD11c et sont différenciées par leur provenance ainsi que par leur phénotype respectif.

Un premier sous-type se développe dans le thymus et dérive d'un progéniteur lymphoïde commun au T et DC (Ardavin et al., 1993), ce sont les cDCs intrathymiques, leur phénotype est $CD11b^-CD8\alpha^{hi}Sirp\alpha^-$. En condition d'homéostasie, elles représentent 66% des cDCs du thymus. Ces cellules résident exclusivement dans le thymus tout au long de leur vie et ont une faible prolifération (Porritt et al., 2003). Elles présentent à leur surface des homodimères CD8 $\alpha\alpha$.

L'autre sous-type provient de la périphérie et migre via le flux sanguin. Il est dérivé d'un progéniteur myéloïde et est caractérisé par l'expression de $CD11b^+CD8\alpha^{low}Sirp\alpha^+$ (Li et al., 2009). Ces cellules sont nommées cDCs extrathymiques. Dans des conditions d'homéostasie, elles représentent 33% des cDCs thymiques (Wu and Shortman, 2005). Ces cellules n'expriment pas l'ARNm de CD8 α . Il a été démontré que le faible niveau d'expression de CD8 α à la surface de ces cellules est dû au fait que les DCs thymiques évoluent dans un environnement riche en thymocytes (Shortman et al., 1989), lorsque ceux-ci entrent en apoptose, les DCs sont capables de capturer des fragments de la membrane cellulaire des thymocytes. De plus, lors de leur migration dans le thymus au niveau de la zone de jonction cortico-medullaire, les cDCs extrathymiques sur-régulent CD80, CD86, CD11c et CMHII (Li et al., 2009). Ces cellules prolifèrent de manière importante et mûrissent en DCs interdigitées. Le phénotype des cDCs extrathymiques est donc plus activé que celui des intrathymiques (Proietto et al., 2008).

Le troisième sous-type de DCs, les pDCs, migre en continu vers le thymus via le flux sanguin. Ces pDCs représentent environ 30% des DCs thymiques et sont caractérisées par

l'expression de $CD11c^{int}B220^{+}PDCA-1^{+}$. A leur arrivée dans le thymus, les pDCs migrent au niveau de la jonction cortico-medullaire et vont adopter un phénotype semi-mature caractérisé par une surexpression de CD11c et du CMHII (Li et al., 2009).

A la naissance, le thymus est parfaitement structuré, et il a été montré que le thymus est particulièrement développé durant les premières années de la vie et l'enfance. En effet, après la puberté, chez l'Homme, le thymus commence à involuer et donc le taux de production de LTs diminue. De plus, des expériences de thymectomies chez la souris montrent que l'ablation du thymus à la naissance conduit au développement de syndromes auto-immuns alors que son ablation à l'âge adulte chez la souris n'a pas d'incidence, suggérant que le répertoire de lymphocytes T régulateurs généré à la naissance suffit pour assurer une réponse immunitaire normale (Miller, 1965).

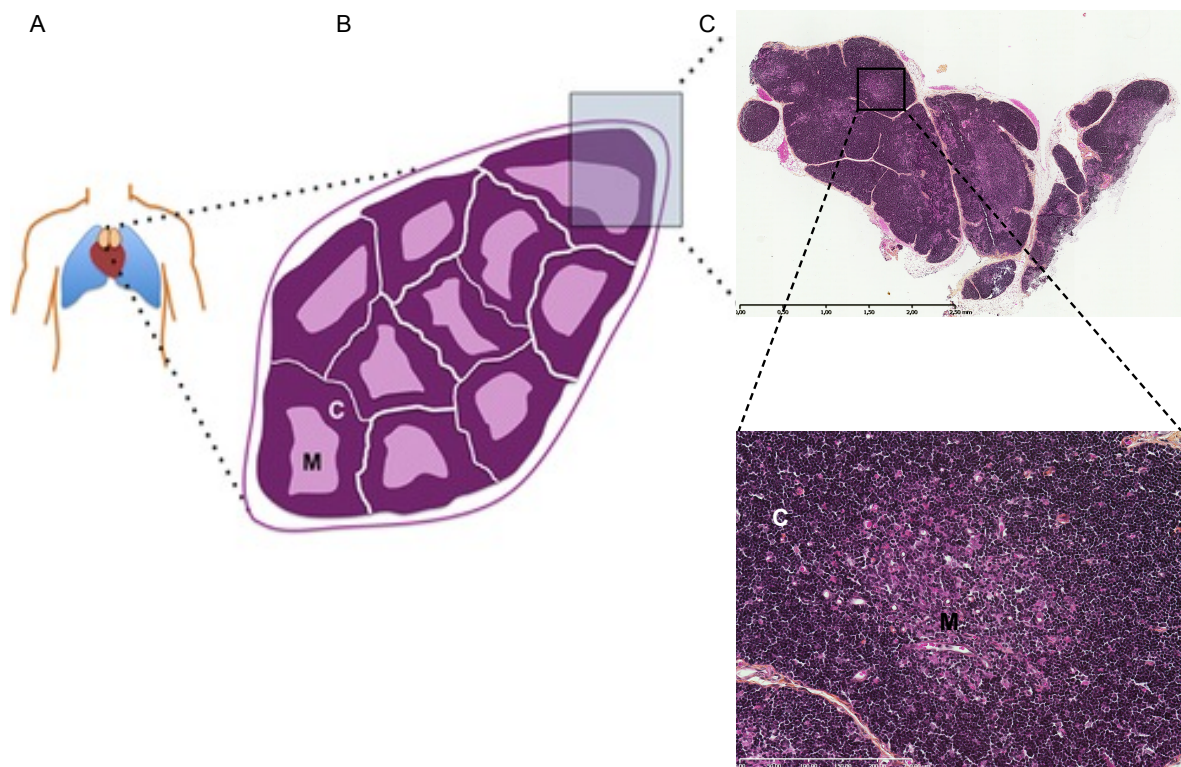


Figure 4 Structure du thymus. A. Le thymus se situe dans la cage thoracique. B et C. Il est constitué de plusieurs lobules dans lesquels on peut distinguer deux zones: une zone sombre, le cortex (C) et une zone claire, la medulla (M). (Figure réalisé à partir de (Vaidya et al., 2016) ainsi que d'histologie de thymus de rat)

1.3. Les cellules épithéliales thymiques

Parmi les cellules stromales, les cellules épithéliales thymiques (TEC) jouent un rôle particulièrement important pour la fonction thymique (Rodewald, 2008). En effet, dans cet

environnement, les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs) ainsi que médullaires (mTEC) vont permettre le développement des précurseurs de thymocytes depuis leur stade immature à la sortie de la moelle osseuse jusqu'à leur stade mature à la sortie du thymus (Takahama, 2006). Des études récentes ont permis de mettre en évidence que les TECs dérivent d'un progéniteur commun capable d'auto-renouvellement et que les cellules passent par un stade où elles expriment des marqueurs de cTECs avant de prendre une voie de différenciation cTEC ou mTEC (Baik et al., 2013; Mayer et al., 2016; Ohigashi et al., 2015) (Figure 5). Néanmoins, actuellement, il n'existe pas de consensus sur le phénotype de ces cellules. En effet, certains auteurs les décrivent comme étant CMH II^{hi} EpCAM⁺ (Ulyanchenko et al., 2016), CMH II^{lo} EpCAM⁺ (Wong et al., 2014) ou bien EpCAM⁻ (Ucar et al., 2014). Ces différentes études ayant été réalisées sur des cellules issues de thymus d'adultes ou sur des cellules issues de cultures 3D, il reste impossible à l'heure actuelle de confirmer le phénotype des progéniteurs de TECs. Néanmoins, les facteurs de transcription qui permettent le développement des TECs sont bien décrits. Ce groupe de facteurs de transcription qui commence à s'exprimer dans le primordium thymique lors du développement embryonnaire inclut : Eya1, Hoxa3, Pax1/9, six1/4 et Tbx1 (Manley and Condie, 2010). L'absence de l'un de ces gènes conduit à un développement incomplet du thymus. Le facteur de transcription qui semble le plus important pour le développement et le maintien des TECs et celui du thymus est Foxn1. Foxn1 est exprimé dans 100% des TECs durant le développement embryonnaire puis est perdu par environ 50% des cellules après la naissance (Cheng et al., 2010; Rode et al., 2015).

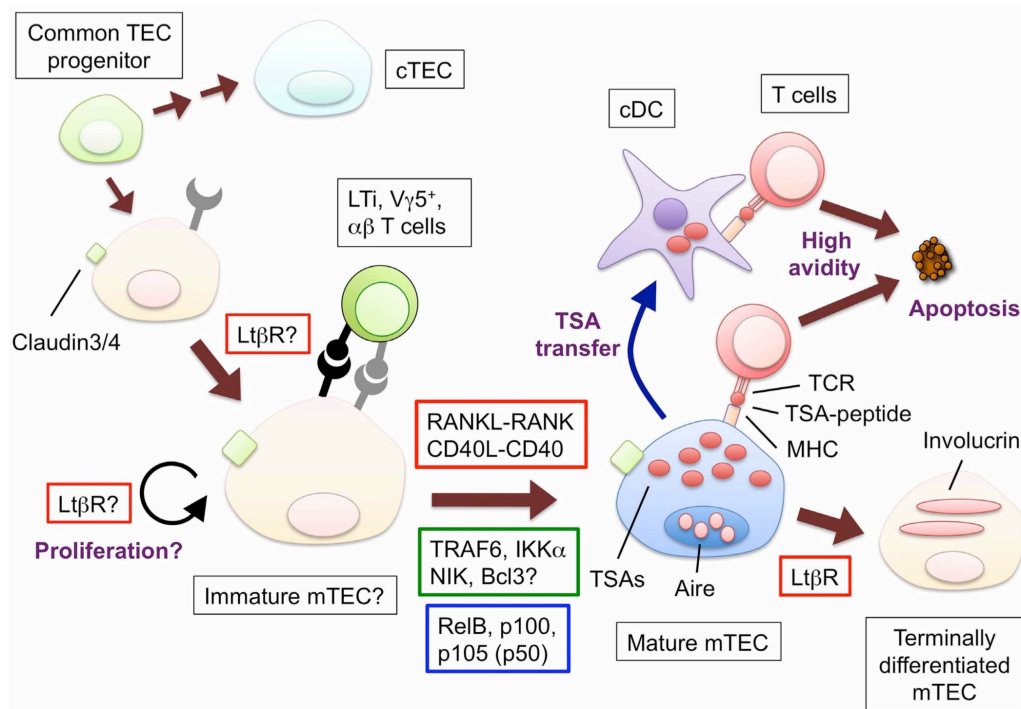


Figure 5 Modèle de développement des mTECs. Les cTECs et mTECs dérivent d'un progéniteur commun, ce progéniteur se différencie en progéniteur de mTECs (claudine-3 et 4⁺). Les différents types cellulaires: LTI, Vγ5⁺, thymocytes αβ sélectionnés positivement produisent RANKL, et les thymocytes αβ produisent également CD40L. L'interaction RANK/RANKL ou CD40/CD40L induit la différenciation ainsi que la prolifération des mTECs. Ces mTECs matures, atteignent leur stade terminal de différenciation sous l'action du récepteur LtβR, à ce stade les mTECs expriment l'involucrine (Akiyama et al., 2012).

(a). Les cellules épithéliales thymiques corticales

Les cellules stromales thymiques expriment les chimiokines CXCL12, CCL19, CCL21 et CCL25 qui attirent les cellules progénitrices T sortant de la moelle osseuse via les récepteurs CXCR4, CCR7 et CCR9 (Zhang and Bhandoola, 2013) (Figure 9 b et c). A l'intérieur du thymus, une multitude de chimiokines est exprimée par les cellules stromales et participent à l'établissement d'un organe fonctionnel (Bleul and Boehm, 2000; Gossens et al., 2009; Plotkin et al., 2003). Les cTECs expriment également certaines chimiokines en particulier CXCL12 et CCL25, ce qui pourrait suggérer un rôle des cTECs dans la colonisation du thymus par les thymocytes. Les cTECs expriment également des molécules essentielles pour le développement et la survie des thymocytes comme l'interleukine-7 (IL-7) ou encore le « Stem Cell Factor » (SCF ou kitL). kitL est très largement exprimé par les cTECs. En effet, dans un modèle de souris rapporteur pour kitL, la grande majorité des

cellules exprimant Ly51 (CD249 ou BP-1), marqueur qui caractérise les cTECs, co-expriment kitL. Quant à elles, les souris IL-7^{YFP} montrent un profil d'expression différent car seules certaines cTECs Ly51⁺ se trouvant à la jonction cortico-médullaire expriment l'IL-7 (Alves et al., 2009). En plus des facteurs solubles, les cTECs expriment des récepteurs de surface essentiels pour le développement des thymocytes comme Delta Like 4 (DLL4), ligand de Notch 1, qui par son interaction avec les cellules récemment immigrées dans le thymus va induire l'engagement dans la lignée T et cette interaction est également nécessaire pour la maturation des thymocytes jusqu'au stade Double négatif CD4⁻CD8⁻ 3 (DN3) (Ferrero et al., 2013; Hozumi et al., 2008; Koch et al., 2008). Même si les mécanismes moléculaires conduisant à la différenciation des progéniteurs TEC en cTEC restent aujourd'hui peu décrite, une hypothèse est que les progéniteurs TEC mûrissent par défaut dans la voie cTEC en l'absence de signaux d'activation NF-κB (Alves et al., 2014).

(b). Les cellules épithéliales thymiques médullaires

Les mTECs sont définies en cytométrie par les marqueurs CD45⁺EpCAM⁺Ly51^{-low}. L'association de ce phénotype avec les marqueurs CD80, CMHII ou Aire va permettre d'identifier les différents stades de maturation des mTECs. Ainsi, les mTECs immatures présentent le phénotype CMHII^{-low}CD80^{-low}Aire⁻ et le stade mature des mTECs est défini par CMHII^{hi}CD80^{hi}Aire⁺ (Gäbler et al., 2007; Gray et al., 2007a; Rossi et al., 2007). Les mTECs exprimant Aire ont longtemps été considérés comme le dernier stade de différenciation des mTECs. Le renouvellement important de cette population a été interprété comme permettant le transfert des TSA aux cellules dendritiques par l'intermédiaire des corps apoptotiques (Gray et al., 2007a). Des études récentes ont néanmoins remis en question cette hypothèse du fait de la découverte d'un stade de différenciation post-Aire des mTECs (Metzger et al., 2013). La moitié des mTECs Aire⁺ semble suivre cette voie et perdre l'expression de Aire, leur phénotype évolue alors vers CMHII^{low}CD80^{low}Aire⁻ ainsi que des marqueurs de kératinocytes (Metzger et al., 2013; Wang et al., 2012). Le stade final de différenciation des mTECs consiste alors à perdre leur noyau puis à fusionner pour former les corpuscules de Hassall qui vont être identifiés par l'expression des marqueurs involucrine, cytokératines 6/10, desmogléins 1/3 et LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal Type related Inhibitor) (Wang et al., 2012) (Figure 5).

Des études ont montré la présence, dans des thymus adultes, de cellules progénitrices de TECs capables de se différencier à la fois en cTECs ou en mTECs (Ucar et al., 2014; Wong et al., 2014).

Dans le thymus fœtal, une population de cellules progénitrices a été mise en évidence. Cette population exprime certains marqueurs d'expression des cTECs comme CD205, $\beta 5t$ et un haut niveau d'expression de l'IL-7. Néanmoins, ces cellules ont le potentiel de générer des mTECs (Baik et al., 2013; Ohigashi et al., 2013).

Contrairement aux cTECs, la différenciation des mTECs requiert l'activation de la voie de signalisation NF- κ B par certains récepteurs membres de la famille des récepteurs aux TNF : RANK, CD40 et LT β R (Boehm et al., 2003; Hikosaka et al., 2008; Rossi et al., 2007) (Figure 5). En effet, l'absence de ces récepteurs altère fortement le développement des mTECs, ce qui mène au développement de maladies auto-immunes (Anderson and Takahama, 2012). Les premières études suggéraient une implication de la voie de la lymphotoxine β dans la régulation du développement des mTECs exprimant Aire (Chin et al., 2003) mais des études plus récentes montrent que ce n'est pas le cas (Martins et al., 2008; Venanzi et al., 2007).

Au cours du développement embryonnaire du thymus, plusieurs acteurs vont jouer un rôle particulièrement important pour le développement des mTECs Aire⁺. Il a été démontré que les cellules inductrices de tissus lymphoïdes (LTi) CD3⁻CD4⁺IL-7R α ⁺ sont présentes dans le thymus embryonnaire au moment de l'apparition des premières mTECs Aire⁺ (Rossi et al., 2007). Ces cellules permettent la différenciation des premières mTECs qui apparaissent pendant la gestation (Gäbler et al., 2007; Rossi et al., 2007). C'est la protéine RANKL, présente à la surface des LTi qui a été identifiée comme responsable de la différenciation des mTECs Aire⁺ lors du développement thymique (Figure 6). En effet, l'importance de l'interaction du récepteur activateur de facteur nucléaire kappa-B (RANK), exprimé par les mTECs, avec son ligand RANKL a été étudié par plusieurs équipes. Il a été démontré que des animaux déficients pour RANK ou RANKL n'ont pas de mTECs Aire⁺ dans le thymus embryonnaire (Akiyama et al., 2008; Rossi et al., 2007). D'autres études complémentaires sur des cultures ex-vivo de thymus fœtal ont permis de montrer que l'addition au milieu de culture de RANKL ou d'une molécule agoniste à RANK permet le développement de mTECs Aire⁺ (Irla et al., 2012; Mouri et al., 2011). De manière intéressante également, le blocage de RANKL par l'ostéoprotégérine ou par la protéine RANK-fc empêche

totale du développement des mTECs Aire⁺ embryonnaires (Akiyama et al., 2008; Roberts et al., 2012). L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de l'axe RANK/RANKL dans la génération des mTECs Aire⁺ dans le thymus embryonnaire, cette interaction est notamment due aux LTi. Néanmoins, des études faites chez la souris *Rorc*^{-/-}, ne possédant pas de LTi, montrent une présence de mTECs Aire⁺ dans le thymus embryonnaire suggérant le rôle d'autres cellules dans la mise en place des mTECs (White et al., 2008).

Au cours du développement embryonnaire, avant que l'éducation des lymphocytes T $\alpha\beta$ ne soit mise en place, le thymus embryonnaire génère tout d'abord des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Havran and Allison, 1988; Pennington et al., 2003). Notamment, au moment de l'émergence des premières mTECs Aire⁺, une population de progéniteurs dendritiques épidermiques V γ 5⁺TCR⁺ exprimant RANKL est présente. Il a été démontré que cette population induit la génération des mTECs Aire⁺ par l'intermédiaire de RANKL (Roberts et al., 2012) (Figure 6). Pour cela, des thymocytes V γ 5⁺ ou des LTi ont été ajoutés à des cultures ex-vivo de thymus réaggrégés. Dans ces conditions, ces deux types cellulaires sont capables d'induire la différenciation de mTECs matures. Les souris double déficientes *Rorc*^{-/-} x *Tcrd*^{-/-} montrent une diminution plus importante du nombre de mTECs Aire⁺ que les souris simple déficientes. Néanmoins, les souris doubles déficientes n'ont pas une absence totale de mTECs Aire⁺ ce qui suggère qu'au moins un autre type cellulaire est impliqué dans la différenciation des mTECs dans le thymus embryonnaire (Roberts et al., 2012).

Tout comme lors du développement fœtal du thymus, l'interaction RANK/RANKL joue un rôle crucial dans le développement des mTECs Aire⁺ dans le thymus post-natal. En effet, la déficience pour RANK ou RANKL entraîne une diminution importante du nombre de mTECs Aire⁺ ainsi que de l'expression des TSAs mais pas une totale absence comme dans le thymus fœtal (Akiyama et al., 2008; Hikosaka et al., 2008; Rossi et al., 2007). Dans le thymus post-natal, il semble donc que d'autres facteurs jouent un rôle sur le développement des mTECs Aire⁺. L'importance de cette interaction est également observée dans les souris déficientes pour l'ostéoprotégérine (récepteur soluble de RANKL empêchant l'interaction RANK/RANKL) qui présentent une médulla large avec un nombre de mTECs Aire⁺ augmenté (Hikosaka et al., 2008).

Il a été démontré qu'à la fin du développement embryonnaire, un autre membre de la superfamille des TNFs émerge dans le thymus. En effet, l'analyse transcriptionnelle révèle l'apparition de CD40 à partir de E17 et atteint un plateau après la naissance (Akiyama et al., 2008). Les animaux déficients pour CD40 ou CD40L montrent une diminution du pourcentage de mTECs Aire⁺ mais celle-ci est moins drastique que chez les souris RANK^{-/-} ou RANKL^{-/-} (Akiyama et al., 2008; Irla et al., 2008). De manière intéressante, des animaux doubles déficients pour RANK et CD40 présentent une diminution plus importante du nombre de mTECs que les animaux simples déficients pour chacune de ces protéines, démontrant l'importance de ces deux protéines dans le développement des mTECs Aire⁺ (Akiyama et al., 2008). De plus, ces animaux doubles déficients développent des symptômes d'auto-immunité dus à la diminution du nombre de mTECs matures qui entraîne une diminution du nombre de TSA ainsi qu'un défaut de sélection négative.

Un troisième membre de la superfamille des TNFs joue un rôle dans l'organisation de la médulla thymique. Le récepteur à la lymphotoxine β (LT β R) est exprimé à la surface des mTECs. L'interaction avec son ligand, l'hétérodimère LT α 1 β 2, exprimé à la surface des thymocytes simples positifs, est impliquée dans plusieurs processus (Figure 6). Notamment, chez des animaux déficients pour LT β R, l'architecture de la médulla est désorganisée du fait d'un manque de développement des stades matures des mTECs (UEA-1⁺) et du stade terminal de différenciation (involucrine⁺) (Boehm et al., 2003; Venzani et al., 2007; White et al., 2010). Le LT β R a également été associé à la régulation de l'expression des TSAs indépendants de Aire ainsi qu'à l'expression de CCL19. CCL19 est particulièrement important car il s'agit de l'un des ligands, avec CCL21, de CCR7 qui est exprimé par les thymocytes SP. C'est ce couple de chimiokine/récepteur à chimiokine qui est impliqué dans la migration des thymocytes du cortex à la médulla (Ueno et al., 2004). Les animaux déficients CCR7^{-/-} ou déficients pour ses ligands ont un défaut de migration des thymocytes vers la médulla et une structure anormale de cette médulla caractérisée par des régions médullaires de petite taille distribuées au sein du thymus (Nitta et al., 2009; Ueno et al., 2004) (Figure 9 e). Ces défauts sont associés à des signes d'auto-immunité soulignant l'importance de LT β R (Zhu et al., 2007).

Il existe plusieurs sources de RANKL et CD40L dans le thymus post-natal. Il a notamment été montré que RANKL est exprimé à la surface des thymocytes, surtout CD4⁺ mais également de manière moindre sur les CD8⁺ (Desanti et al., 2012). CD40 n'est exprimé qu'à la surface des thymocytes CD4⁺ (Hikosaka et al., 2008; Irla et al., 2008) (Figure 6).

Des études au niveau de la cinétique d'acquisition de ces marqueurs révèlent que RANKL est acquis par les thymocytes immatures ($CD4^+CD69^+$) alors que CD40L est acquis par les thymocytes matures ($CD4^+CD69^-$) (Desanti et al., 2012). Le rôle majeur des thymocytes a été mis en évidence par l'utilisation d'animaux déficients en thymocytes $CD4^+$ ou $CD8^+$. Ces travaux ont montré que les animaux n'ayant pas de thymocytes $CD8^+$ ($\beta 2m^{-/-}$) ne présentent qu'une très faible altération du nombre de mTECs matures. Au contraire, les souris H2-Aa $^{-/-}$ présentant un défaut de sélection positive des thymocytes $CD4^+$ ont une forte diminution du nombre de mTECs $CD80^{hi}$ Aire $^+$ (Irla et al., 2008). Ces résultats démontrent le rôle crucial des interactions entre les thymocytes $CD4^+$ et les mTECs (Irla et al., 2010). Des études complémentaires avec des animaux déficients pour le CMHII uniquement dans les mTECs ont montré que l'interaction cellulaire entre ces 2 acteurs est nécessaire et que la différenciation en mTECs matures n'intervient que lorsque les thymocytes interagissent via leur TCR avec le complexe CMHp présenté par le mTECs (Irla et al., 2008, 2012) (Figure 6). En effet, alors que les animaux OTII-Rag2 $^{-/-}$ montrent un important défaut d'organisation de la médulla, ces mêmes animaux croisés avec des souris Rip-mOVA (qui expriment OVA à la surface des mTECs) retrouvent un phénotype normal de la médulla (Irla et al., 2012). Il a également été montré que cette interaction met en jeu l'engagement des molécules de co-stimulation CD28-CD80/86 et CD40-CD40L (Williams et al., 2014) (Figure 6).

Ces observations mettent donc en évidence l'importance du dialogue entre les thymocytes $CD4^+$ autoréactifs et les mTECs. Cette discussion peut être résumée ainsi : l'engagement du TCR auto-réactif des thymocytes $CD4^+$ avec le complexe CMH/peptide du soi des mTECs et de l'interaction CD40/CD40L et CD28/CD80/86 induit une sur-régulation de LT $\alpha 1\beta 2$ par les thymocytes $CD4^+$ (Irla et al., 2012; Williams et al., 2014). L'interaction LT $\alpha 1\beta 2$ avec LT βR induit l'expression de RANK, qui interagit avec RANKL menant à l'expression de CD40 par les mTECs (Desanti et al., 2012; Irla et al., 2012; Mouri et al., 2011), créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive car cette interaction se fait entre un TCR ciblant un auto-antigène et un peptide du soi. Les thymocytes autoréactifs permettent donc l'induction de la population cellulaire qui les empêche de migrer en périphérie. Ce phénomène est possible par le fait que les thymocytes autoréactifs ne sont pas immédiatement élimés par apoptose mais restent vivants et motiles pendant une courte période avant d'être éliminés (Le Borgne et al., 2009).

La déficience en thymocytes $CD4^+$ n'induisant pas une absence totale de mTECs matures, cela suggère qu'il y a d'autres populations qui permettent d'induire des mTECs matures dans le thymus post-natal. L'analyse dans les thymus d'animaux $Id2^{-/-}$ ayant une absence de LTi ne montre aucune altération dans le développement de ces mTECs ce qui écarte un rôle de ces cellules (Hikosaka et al., 2008). De la même manière, un rôle des $T\gamma\delta$ a été écarté (Hikosaka et al., 2008). En 2014, White et al. ont montré que les iNKTs expriment également RANKL (Figure 6) et que les animaux ne possédant pas de iNKTs avaient un développement anormal des mTECs. De manière intéressante, l'absence de mTECs empêche le développement des iNKTs montrant encore l'importance du « crosstalk » entre les différents types cellulaires présents dans le thymus (White et al., 2014).

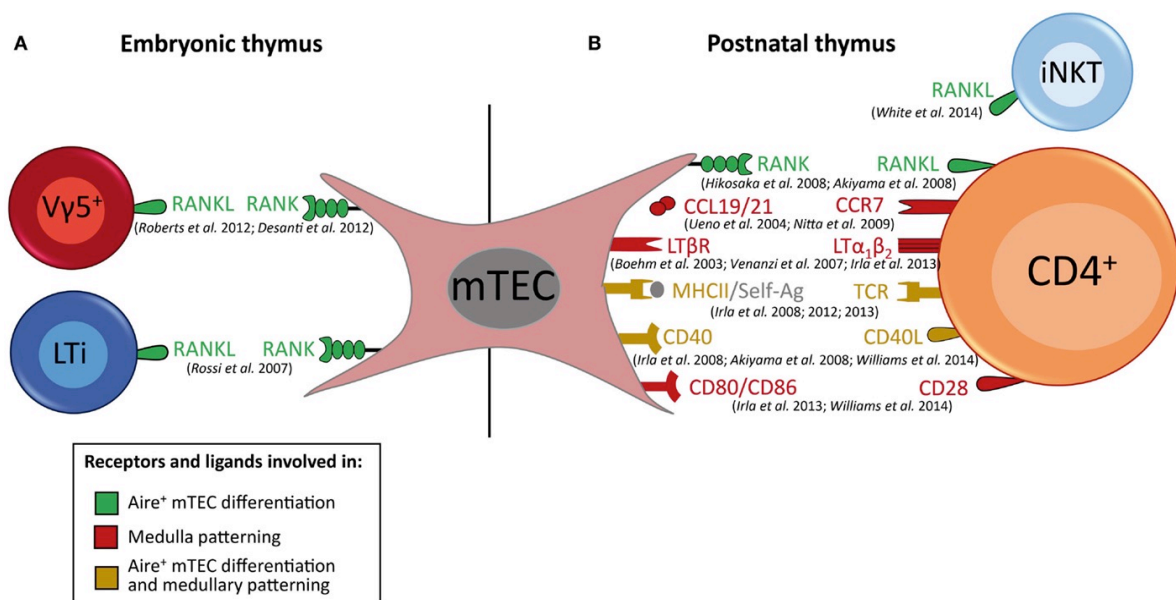


Figure 6 Les acteurs cellulaires, ligands et récepteurs impliqués dans la différenciation des mTECs Aire⁺. A. Les acteurs cellulaires impliqués dans la différenciation des mTECs Aire⁺ dans le thymus embryonnaire : V γ 5⁺ et LTi. Leur mode d'action passe par l'interaction RANK/RANKL. B. Les acteurs cellulaires impliqués dans la différenciation des mTECs Aire⁺ dans le thymus postnatal : iNKT et thymocytes CD4⁺. Leur mode d'action passe par l'interaction RANK/RANKL. Les interactions CD40/CD40L, CMH II-peptide du soi/TCR induisent à la fois la différenciation des mTECs Aire⁺ et la mise en place de la medulla. Les interactions CCL19-21/CCR7, LT β R/LT α 1 β 2 et CD80-86/CD28 servent à la mise en place de la structure de la medulla. (Lopes et al., 2015)

En parallèle de la signalisation NF- κ B, le rôle de l'histone déacétylase 3 (Hdac3) a également été souligné pour la différenciation des mTECs (Goldfarb et al., 2016). En effet, Hdac3 permet l'expression de gènes spécifiques des mTECs comme Ascl1, SpiB ou Fezf2

tout en inhibant des gènes caractéristiques des cTECs. Ces facteurs de transcription vont être exprimés dès le stade précoce de mTEC^{lo} CD80^{lo} Aire⁻CMH II^{lo} (Goldfarb et al., 2016). Cette population va ensuite se différencier en mTECs^{hi} CD80^{hi} Aire⁻UEA-1⁺CMH II^{hi}, une population à haut taux de prolifération. Enfin, ce stade de différenciation voit intervenir l'expression du régulateur de l'auto-immunité (Aire) qui va permettre l'expression d'antigènes spécifiques de tissus permettant d'accomplir le mécanisme de la sélection négative décrit en partie 2.3. Cette population de mTECs se définit également par une forte expression d'antigènes ectopiques (Gray et al., 2007a).

1.4. Les antigènes spécifiques de tissus

Les premières études suggérant que la sélection négative dépend de l'expression ectopique au niveau du thymus d'un large nombre de gènes incluant des gènes codant pour des protéines spécifiques de tissus datent de 1989 (Linsk et al., 1989). En effet, Ohki et al. avaient montré que la transplantation d'épithélium de thymus dans des animaux thymectomisés permet l'induction d'une tolérance vis-à-vis d'organes périphériques (Ohki et al., 1987). Par la suite, dans les années 90, de nombreuses études ont apporté des preuves de l'expression ectopique dans le thymus d'antigènes spécifiques de tissus périphériques. Parmi eux, l'expression du transcrite du récepteur à l'acétylcholine (Kirchner et al., 1988), des antigènes spécifiques du pancréas (Jolicœur et al., 1994; Smith et al., 1997; Sospedra et al., 1998), de la thyroïde (Sospedra et al., 1998), des protéines hépatiques (Klein et al., 1998), du système nerveux et cerveau (Pribyl et al., 1996; Wekerle et al., 1996). Un gène est considéré comme spécifique de tissus s'il est exprimé dans moins de 5 organes sur 45 testés (Derbinski et al., 2005). A cette époque, ces études reçoivent très peu d'attention de la communauté scientifique. En effet, la majorité des scientifiques estime que la tolérance aux antigènes de la périphérie est induite en périphérie. De plus, l'identification d'une population de cellules thymiques capable d'exprimer des antigènes périphériques n'est pas encore reconnue. L'identification des mTECs comme étant la population capable d'induire l'expression de TSA est démontrée en 2001 (Derbinski et al., 2001). Une autre étape majeure de la compréhension de ce phénomène d'expression ectopique d'antigènes de tissus est l'identification et le clonage du gène responsable de la maladie auto-immune dite Auto-immune Poly Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy (APECED) ou Auto-immune Polyendocrine Syndrome type 1 (APS-1)

(Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine et al., 1997). De manière pertinente, ce gène fut appelé *Auto-immune regulator (AIRE)*, car codant pour un régulateur de transcription dont l'expression est presque exclusivement restreinte aux mTECs (Björnsen et al., 1999). Le rôle crucial de AIRE dans l'établissement de la tolérance et son expression dans les mTECs a conduit de nombreux groupes à s'interroger sur l'éventualité que AIRE pourrait être le facteur clé pour expliquer la capacité des mTECs à exprimer des antigènes spécifiques de tissus. En 2002, Anderson et al. ont montré que des mTECs isolées à partir de souris déficientes pour Aire avaient un défaut d'expression de certains TSA (Anderson, 2002). Récemment, plusieurs laboratoires ont mené des études de RNAseq et ont pu montrer que les mTECs^{hi} expriment plus de 18000 gènes, ce qui représente environ 85% de la région codante du génome (Danan-Gotthold et al., 2016; Sansom et al., 2014). Ces résultats démontrent à quel point les mTECs sont différentes par rapport à l'ensemble des autres types cellulaires qui en moyenne expriment entre 12000 et 14000 gènes, soit environ 60-65% des régions codantes du génome. De manière intéressante, même en l'absence de Aire, les mTECs expriment plus de gènes que dans tous les autres tissus périphériques excepté les testicules, qui en expriment environ le même nombre ($\approx$ 15000 gènes). Dans la mesure où Aire contrôle la transcription d'environ 3000 à 4000 gènes, ces études suggèrent qu'un grand nombre de TSA exprimés dans les mTECs, environ 30-40%, est exprimé indépendamment de Aire (Derbinski et al., 2005). De manière très intéressante, Danan-Gotthold et al. ont montré que les TSA représentatifs d'un organe sont exprimés dans 70 à 100% des mTECs, certains organes comme le cerveau et les testicules ne sont présentés que par respectivement 55% et 31% des mTECs (Danan-Gotthold et al., 2016). Il est intéressant de constater que ces deux organes bénéficient d'un privilège immunitaire. En effet, même si les mTECs, prises en tant que population sont capables d'exprimer quasiment l'ensemble de la région codante du génome, l'analyse du transcriptome à l'état de cellule unique révèle qu'un faible pourcentage des TSA est exprimé (Brennecke et al., 2015; Sansom et al., 2014). Il a été estimé que seul 1 à 3% des mTECs expriment un même TSA à un instant donné avec de rares exceptions comme *Csnb*, qui est exprimé par plus de 80% des mTECs matures (Tykocinski et al., 2010). Globalement, il a été estimé qu'il faut entre 200 et 500 mTECs pour couvrir l'ensemble des TSA à n'importe quel moment donné (Klein et al., 2014).

2. Les mécanismes de sélection des lymphocytes T

Au cours de la vie, entre 10 et 100 précurseurs hématopoïétiques rentrent dans le thymus chaque jour (Shortman et al., 1990). Durant leur engagement dans la lignée T, ils vont se diviser une vingtaine de fois, sur environ 2 semaines, majoritairement au stade double négatif (DN) (Porritt et al., 2003). Cette expansion massive conduit à la génération d'environ 5×10^7 lymphocytes T par jour, ce qui est très loin des $1-2 \times 10^6$ de lymphocytes T matures qui rejoignent réellement la circulation chaque jour. Le premier *check point* intervient au stade DN3, cette étape appelée la sélection beta fait intervenir la signalisation au niveau du pré-TCR et s'assure que seuls les thymocytes DN qui ont correctement réarrangé leur chaîne beta du TCR (associée à la chaîne invarion pT α) puissent passer au stade double positif (DP) CD4⁺CD8⁺ (von Boehmer et al., 2003). Une fois le stade DP atteint et le réarrangement de la chaîne alpha effectué, toutes les décisions développementales vont être dépendantes de l'interaction entre le TCR et des complexes CMH/peptide présentés par les cellules stromales du thymus. Des études d'incorporation de BrdU ou de thymidine *in vivo* ont permis de mettre en évidence par calcul du ratio SP/DP qu'environ 95% des thymocytes vont échouer à passer la sélection positive (Penit, 1986; Shortman et al., 1990). Sur les 5% de cellules ayant réussi à passer la sélection positive, 50 à 70% vont échouer à passer la sélection négative (van Meerwijk et al., 1997). Ce paradigme d'un récepteur capable d'engendrer des réponses cellulaires non-seulement différentes mais diamétralement opposées, i.e. différenciation, prolifération ou apoptose, a captivé les immunologistes depuis la découverte des bases de la sélection positive et négative (Starr et al., 2003).

2.1. Les mécanismes de la diversité du TCR

Au cours de leur sélection, les thymocytes vont subir plusieurs étapes de réarrangements somatiques des gènes codant pour le TCR. Ce phénomène appelé recombinaison V(D)J consiste en un assemblage aléatoire de segments de gènes V et J pour la chaîne alpha et de V, D et J pour la chaîne bêta (Chien et al., 1984; Gascoigne et al., 1984). Cette recombinaison va permettre de sélectionner des segments d'ADN génomique initialement distants de plusieurs kilobases. De nombreuses enzymes vont être impliquées dans ce processus (Clatworthy et al., 2005). Ces enzymes sont guidées par des motifs au niveau des segments codant pour le TCR. Ces motifs sont nommés séquences signal de recombinaison

(SSRs). Une SSR se compose d'une séquence conservée de 7 nucléotides, suivie d'une séquence intercalante de 12 (SSR12) ou 23 (SSR23) nucléotides et se termine par une autre séquence conservée de 9 nucléotides. Ces séquences, ainsi que la structure particulière des gènes du TCR permettent l'appariement des segments V J pour la chaîne alpha et V D J pour la chaîne bêta. Durant ce processus faisant intervenir des coupures et des ligations, l'ADN subit également une édition aléatoire qui entraîne une augmentation considérable de la diversité de séquences possibles de TCR.

(a). Les enzymes de la recombinaison, RAG1 / RAG2, la recombinaison V (D) J

Afin que les chaînes du TCR soient exprimées, elles doivent être composées d'une région variable associée à une région constante. C'est le réarrangement de la portion variable qui va faire intervenir les segments V D J. Pour avoir une chaîne fonctionnelle, il est important que la recombinaison ne puisse pas se faire entre deux segments de la même catégorie. C'est à ce niveau de régulation que les SSRs interviennent. En effet, la recombinaison des gènes du TCR n'est possible qu'entre une SSR12 et une SSR23, il s'agit de la « règle 12/23 » (Tonegawa, 1983). Ainsi, ces séquences permettent de s'assurer que la recombinaison se fasse entre V et J pour la chaîne alpha et entre V et D puis VD J pour la chaîne bêta. Les segments V sont flanqués d'un SSR 23, les D d'un 12 et d'un 23 et les J d'un 12. Cette règle 12/23 ainsi que la séparation chronologique de ces événements au cours du développement des T permettent de garantir le bon appariement des parties variables des chaînes TCR.

Les deux enzymes RAG (Recombination Activating Gene) sont les acteurs majeurs de ce mécanisme. L'enzyme RAG1 est capable de reconnaître et de se lier au nonamère de la SSR. Une fois cette liaison effectuée, RAG2 est recrutée et va venir former un complexe stable en établissant un contact protéine/ADN avec l'heptamère de la SSR (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989) (Figure 7). Une fois ce complexe formé sur une SSR12 et une SSR23, ces deux séquences vont se rapprocher pour former une synapse sous l'action de protéines HMG (High Mobility Group). Les recombinases induisent alors une coupure simple brin en 5' de l'heptamère de chaque région. Cette coupure simple brin libère un groupement OH à l'extrémité de la région codante. Ce groupement va « attaquer » le groupe phosphate qui délimite la région non-codante et induire ainsi une jointure en épingle à cheveux au niveau de la région codante. Ce processus a également pour

conséquence de libérer la séquence non codante (Morrow and Peng, 1993). La séquence d'ADN initialement présente entre les deux SSRs se retrouve sous la forme d'un cercle d'excision. Ce cercle est formé par le complexe DNA-PK (DNA-PKcs, KU70 et KU80), ce complexe est capable de réparer les coupures doubles brins de l'ADN par NHEJ. Bien que de nombreuses enzymes interviennent durant la recombinaison V (D) J, RAG1/2 sont particulièrement intéressantes car elles ne sont exprimées que dans les lymphocytes (Figure 7).

L'étape suivante de la recombinaison est la ré-ouverture des extrémités en épingle à cheveux des séquences codantes. La protéine responsable de cette ré-ouverture est Artémis, cette protéine appartient à la famille des β -lactamases, qui catalyse l'hydrolyse des liaisons covalentes. Le rôle d'Artémis dans la recombinaison V (D) J a été mis en évidence dans les animaux déficients pour cette protéine qui présente un arrêt du développement des lymphocytes. L'analyse de ces lymphocytes révèle une accumulation de fragments d'ADN avec des extrémités codantes fermées avec une structure en épingle à cheveux (Rooney et al., 2003). Artémis peut induire 3 types de coupures : soit de manière asymétrique, en laissant l'extrémité 3' ou 5' plus longue soit symétrique en générant une extrémité franche. A ce stade, plusieurs mécanismes permettent d'induire une augmentation de la diversité du répertoire TCR. Ces mécanismes seront détaillés par la suite.

Plusieurs protéines impliquées dans la NHEJ vont alors entrer en jeu afin de lier les 2 segments d'ADN. La protéine majeure impliquée dans cette réparation est la DNA-Ligase IV associé à XRCC4 (Li et al., 1995).

(b). Génération de la diversité du répertoire

(i). La diversité combinatoire

Le premier mécanisme générant la diversité du répertoire TCR est le nombre de combinaisons possibles dues au nombre important de segment V, D et J. Chez l'Homme, il existe 61 segments V β (42 fonctionnels, 6 ORFs et 13 pseudogènes), 2 segments D β fonctionnels et 14 segments J β (12 fonctionnels et 2 ORFs) (Donnés issus de IMGT). Néanmoins, certaines associations ne sont pas retrouvées chez l'adulte bien qu'elles soient théoriquement possible selon la règle 12/23.

(ii). *La diversité d'appariement*

Cette diversité vient des différentes possibilités d'appariement entre une chaîne α et β ou γ et δ . Des analyses de séquençages par PCR sur cellule unique ont permis de montrer qu'une même chaîne β peut s'apparier avec différentes chaînes α (Hamrouni et al., 2003). Dans cette étude, les lymphocytes T ont été triés après immunisation en utilisant des tétramères. On peut donc imaginer que la réponse est biaisée par l'immunisation et qu'en conditions physiologiques cette diversité est encore plus importante.

(iii). *La diversité jonctionnelle*

Ce processus de diversité est celui apportant la plus grande variabilité de séquence car il est lié au hasard. On peut définir trois types de diversité jonctionnelle : les nucléotides palindromiques, les délétions et les additions de nucléotides N.

Lors de la ré-ouverture de l'épingle à cheveux durant la recombinaison V (D) J, Artémis peut couper l'ADN de manière asymétrique. Cette coupure induit donc un brin avec une extrémité plus longue (Schlissel, 1998). Cette séquence palindromique sera alors complétée par l'ajout de nucléotides « P » par la machinerie NHEJ (Lafaille et al., 1989).

A cette même étape, il a été montré que de nombreuses délétions interviennent. L'enzyme (exonucléase) responsable de ces délétions *in vivo* n'a pas encore été identifiée. Il pourrait s'agir d'Artémis étant donné qu'il a été démontré qu'elle possède une activité exonucléase *in vitro* (Li et al., 2014).

Au moment de la jonction des segments, une autre enzyme spécifique des lymphocytes intervient. Cette enzyme, la Terminal déoxynucleotidyl Transférase (TdT) va ajouter N nucléotides de façon aléatoire (en moyenne 3) (Candéias et al., 1996; Kallenbach et al., 1992). Cette addition de nucléotides permet de générer l'importante diversité de la séquence hypervariable CDR3 (complementary determining region 3). La région CDR3 est générée par la juxtaposition des segments V (D) et J et possède donc au vu des mécanismes précédemment décrits la plus grande variabilité de séquence. Le contact entre le TCR et le complexe CMH/peptide se fait au niveau de cette région d'une longueur d'environ 12AA c'est l'une des plus importantes pour la reconnaissance de l'antigène. On comprend donc bien l'importance de ce processus dans la diversité du répertoire TCR (Gilfillan et al., 1993). En outre, la diversité est diminuée d'un facteur 10 dans les thymocytes $\alpha\beta$ d'animaux déficients pour TdT (Cabaniols et al., 2001) (Figure 7).

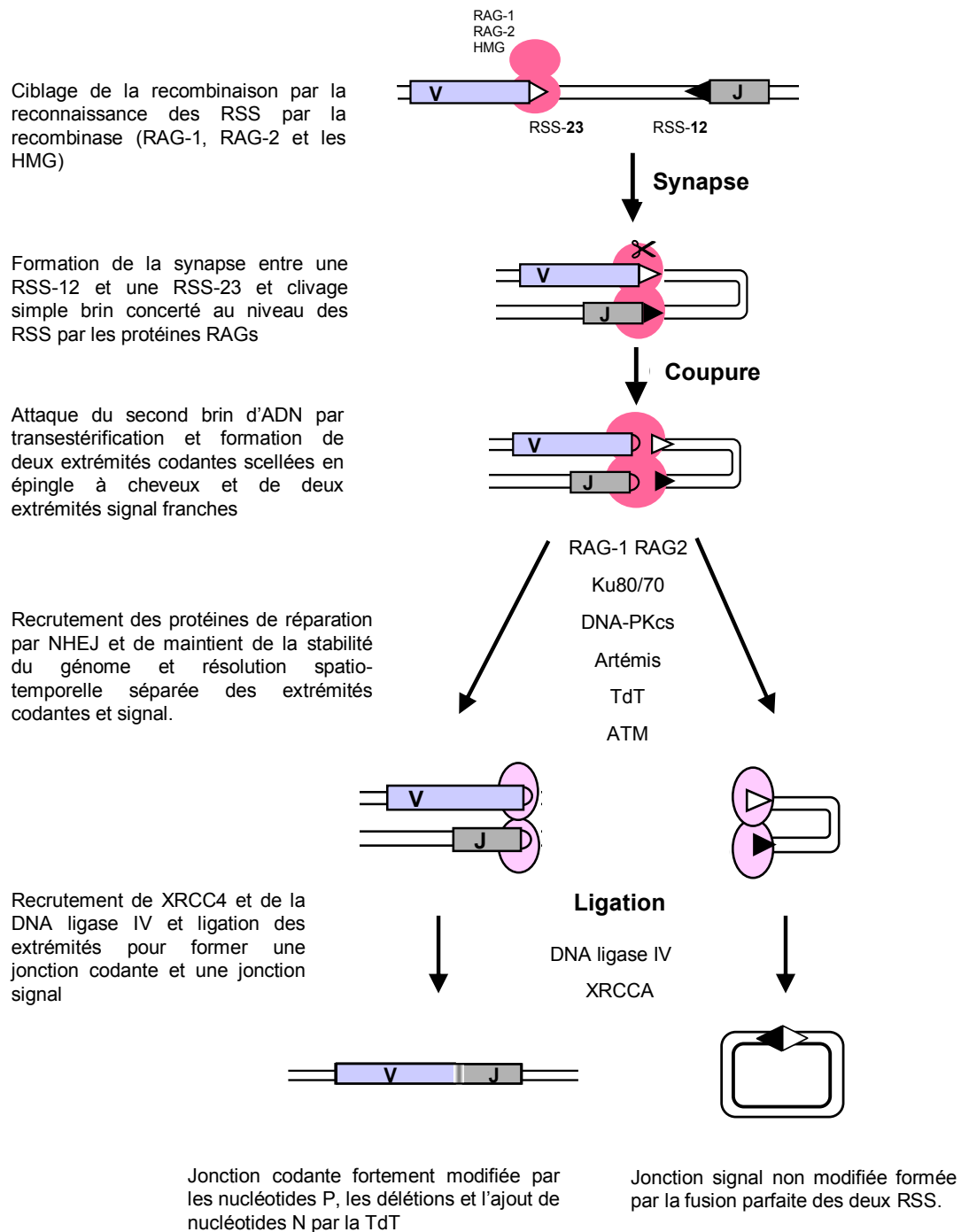


Figure 7 Les mécanismes de la recombinaison V(D)J. Les étapes majeurs de la recombinaison V(D)J. Les gènes V et J sont représentés par des rectangles, les séquences signals par des triangles et les enzymes impliquées par des ronds. D'après (Krangel, 2003).

(c).Engagement dans la lignée $\alpha\beta$

Les lymphocytes T conventionnels passent par une série de stades de développement définis par le réarrangement de la chaîne alpha pour mener à l'expression du TCR $\alpha\beta$. Ces différents stades sont aussi définis par le niveau d'expression de CD44, CD25 et c-kit (stem cell growth factor receptor), par CD3 ainsi que par les co-recepteurs CD4 et CD8. La plupart des stades de développement des thymocytes se déroulent dans le cortex alors que la medulla ne contient presque que des thymocytes SP. Lors de leur arrivée par voie sanguine au niveau de la jonction cortico-médullaire, les thymocytes n'expriment ni le CD4 ni le CD8. C'est pourquoi à ce stade, ils sont nommés double négatif (DN). La maturation des thymocytes DN se déroule en 4 étapes : DN1 à DN4. Au stade DN1, au moment de l'entrée dans le thymus, les thymocytes expriment $c\text{-kit}^{++}CD44^{+}CD25^{-}$. Rapidement, après exposition au microenvironnement du thymus, les thymocytes transitent au stade DN2 défini par le phénotype $c\text{-kit}^{++}CD44^{+}CD25^{+}$. Le stade DN2 est également défini par le début du réarrangement des chaînes γ , δ et β . La région codante pour la chaîne α n'est pas encore accessible à ce stade de développement. La transition entre le stade DN2 et DN3 se traduit par une diminution d'expression de c-kit et CD44. Au stade DN3 le thymocyte est pleinement engagé dans la lignée T. C'est à ce stade que le thymocyte s'engage soit dans la voie $T\gamma\delta$ ou dans la voie $T\alpha\beta$. Les DN3 réussissant le réarrangement de la chaîne β perdent l'expression de CD25, réarrangent la chaîne α , se mettent à proliférer et deviennent DN4 $c\text{-kit}^{\text{low/-}}CD44^{-}CD25^{-}$ et vont pouvoir directement maturer au stade DP (Figure 9).

(d).La sélection beta

Les mécanismes de diversité qui viennent d'être décrits provoquent de manière aléatoire des additions et délétions de nucléotides. Ainsi, la plupart des réarrangements vont produire un décalage du cadre de lecture dans le gène codant la chaîne réarrangée et donc ne produiront pas de protéine. Le premier *check point* qui intervient dans la sélection des lymphocytes se déroule au stade DN3 et consiste à vérifier que les gènes du TCR sont réarrangés d'une manière productive. Pour les précurseurs $\alpha\beta$, ce premier *check point* est appelé sélection bêta et consiste en une vérification du cadre de lecture du TCR β . Pour passer ce *check point*, le thymocyte doit recevoir un signal via le complexe TCR β /CD3/Pre-TCR α , le pre-TCR α est une glycoprotéine de 33kDa qui va, à ce stade, remplacer la chaîne α qui n'est

pas réarrangée (Von Boehmer, 2005; Fehling et al., 1995). Le pré-TCR ne va pas être exprimé à la surface. De plus, aucun ligand pour le pre-TCR n'est connu le signal est donc déclenché par une oligomérisation du pré-TCR (Irving et al., 1998; Yamasaki et al., 2006).

2.2. La sélection positive

Jusqu'à l'expression du TCR $\alpha\beta$, le développement des T est indépendant de l'antigène. Les précurseurs T qui sont engagés dans la lignée $\alpha\beta$ au stade DN3 vont subir une étape de prolifération importante dans la région subcapsulaire, ce qui définira le stade DN4. Chez la souris, ces cellules vont passer par un stade immature transitoire où elles vont exprimer le CD8 seul avant de co-exprimer le CD4 et atteindre alors le stade de développement double positif (DP). Une fois l'expression de ces 2 co-recepteurs acquise, les thymocytes DP vont migrer plus profondément dans le thymus. Les DP ont une durée de vie de 3-4 jours. Leur survie au-delà de ces 3-4 jours va dépendre de leur capacité d'engager leur TCR. Ce processus d'échappement à l'apoptose par l'engagement du TCR et l'engagement du thymocyte au stade simple positif (SP) CD4 ou CD8 est nommé sélection positive. Seulement 10 à 30% des TCR générés par le réarrangement aléatoire des gènes du TCR vont être capables de reconnaître un complexe peptide du soi/CMH du soi (Merkenschlager et al., 2004). Ces thymocytes reçoivent un signal de survie et continuent leur développement. La sélection négative peut également intervenir à ce stade. En effet, si la reconnaissance du complexe est trop forte, le thymocyte meurt par apoptose. L'importance du CMH dans le développement des thymocytes a été mise en évidence dans des modèles de souris transgéniques pour un TCR réarrangé. Dans ce modèle, des souris transgénique de CMHb pour un TCR issu d'un clone T mature d'une souris CMHa est transfecté dans une souris. Les gènes du TCR étant déjà réarrangés dans les thymocytes, l'exclusion allélique va empêcher le réarrangement de la chaîne bêta et fortement diminuer celui de la chaîne alpha. Ainsi, la majorité des thymocytes de la souris CMHb va exprimer le TCR $\alpha\beta$ codé dans le transgène. Ces études ont montré que les thymocytes portant le TCR du transgène peuvent se développer jusqu'au stade DP dans un thymus qui exprime un CMH différent de celui dont le TCR transgénique est issu. Néanmoins, ces thymocytes ne peuvent pas dépasser ce stade et vont mourir au bout de 3-4 jours par apoptose (Huesmann et al., 1991).

Si le TCR $\alpha\beta$ est capable de reconnaître un complexe CMH I ou II / peptide du soi, le thymocyte va recevoir des signaux de survie et va migrer dans la médulla thymique. Si le TCR est incapable de reconnaître le complexe CMH/peptide avec une certaine affinité, le thymocyte ne reçoit pas de signal de survie, il est considéré comme ayant une spécificité « inutile » car incapable d'interagir de manière correcte avec le CMH. Le thymocyte va alors mourir par négligence. La majorité de l'apoptose observée dans le thymus est attribuée à un échec à accomplir la sélection positive, bien plus que l'apoptose des thymocytes auto-réactifs qui intervient lors de la sélection négative (Surh and Sprent, 1994). En effet, il a été estimé qu'environ 90 à 95% de l'apoptose des thymocytes est dû à la mort par négligence (Huesmann et al., 1991; Shortman et al., 1991). Les thymocytes reconnaissant un peptide présenté par le CMH vont s'engager dans le lignage CD4⁺ ou CD8⁺. Deux modèles s'opposent pour expliquer le choix du lignage : le modèle stochastique (le choix se fait au hasard) et le modèle instructif (le thymocyte s'engage dans la voie pour lequel le co-récepteur donne le meilleur signal TCR et inhibe l'expression de l'autre co-récepteur) (Bhandoola et al., 1999). L'observation la plus importante soutenant le modèle stochastique est le fait que dans des souris déficientes pour le CMH II, des LT CD4⁺ sont tout de même présents en périphérie suggérant que le choix du lignage s'est fait indépendamment de l'interaction du TCR avec un CMH II. A noter que la proportion de ces cellules est faible comparée aux animaux WT (Robey et al., 1994), suggérant la possibilité du modèle instructif. De plus, plusieurs études ont montré que la durée du signal TCR contrôle le choix du lignage CD4 ou CD8 (Liu and Bosselut, 2004; Yasutomo et al., 2000). En effet, pour que l'engagement dans la lignée CD4⁺ se fasse, le signal TCR doit se prolonger au-delà du stade DP. Des études chez des souris n'exprimant ZAP70 que dans les DP, il n'y a pas de signal dans les SP, les thymocytes ne mûrissent qu'en SP CD8⁺. Ces résultats suggèrent que le choix du lignage s'effectue en deux étapes : la stimulation TCR d'un thymocyte DP provoque une diminution de CD8, si la stimulation continue, la cellule devient CD4⁺ et en cas d'arrêt de stimulation du TCR, le CD8 est ré-exprimé (Brugnera et al., 2000). Le choix du lignage semble donc dépendre du modèle instructif et semble se dérouler en plusieurs étapes. De plus, l'implication de Notch appuie ce modèle. En effet, un modèle dans lequel une surexpression de la forme activée de Notch-1 sous le contrôle du promoteur de Lck induit une augmentation du nombre de T CD8⁺ et une diminution du nombre de T CD4⁺ (Robey et al., 1996).

Le concept de sélection positive des lymphocytes T a été découvert lors d'expériences sur la restriction des LT au CMH. Dans ces expériences utilisant des souris chimériques par transplantation de moelle osseuse, il a été démontré que les LTs dérivées de la moelle osseuse du donneur n'induisent des réponses spécifiques d'antigène que dans le contexte des molécules MHC identiques à ceux exprimés dans le thymus receveur (Bevan, 1977; Zinkernagel et al., 1978). Des expériences complémentaires ont montrées que la transplantation de thymus de différents CMH dans des souris athymiques induit des T périphériques restreints au CMH exprimé dans le thymus greffé et pas de celui de la souris receveuse (Kruisbeek et al., 2018). Par la suite, les études utilisant des souris avec un TCR transgénique ont permis de confirmer l'implication de la sélection positive dans le développement des T au travers de la reconnaissance spécifique du TCR. Le TCR H-Y (antigène spécifique mâle) est restreint aux molécules de CMH I H-2D^b. Ce TCR est sélectionné positivement chez les femelles H-2^b, négativement chez les mâles H-2^b et les thymocytes meurent par négligence dans des souris H-2^d (Kisielow et al., 1988a; Teh et al., 1988). De plus, les thymocytes positivement sélectionnés chez la femelle H-2b ne se différencient qu'en SP CD8⁺ (Teh et al., 1988).

Les mécanismes qui permettent aux cTECs de pouvoir effectuer cette sélection positive sont encore peu décrits. Néanmoins, l'analyse transcriptionnelle des cTECs montre la particularité de ces cellules, bien que d'autres CPA soient capables de faire de l'autophagie. Notamment, les cTECs expriment de manière constitutive des gènes impliqués dans l'autophagie, comme *atg5* ce qui leur permet de pouvoir présenter des complexes CMH/peptides du soi en dégradant leurs protéines intracellulaires. En effet, les souris *Atg5*^{-/-} montrent une génération altérée de SP CD4⁺ (Nedjic et al., 2008).

Les études sur la machinerie de dégradation des protéines des cTECs montrent que celle-ci comporte plusieurs particularités. Notamment, le protéasome, complexe enzymatique impliqué dans le clivage des protéines cytoplasmiques et la génération de protéines présentées par le CMH I (Rock and Goldberg, 1999) possède des particularités dans les cTECs. Dans ces cellules, le gène *Psmbl1* code pour la sous-unité β5t, cette sous-unité remplace la β5i de l'immunoprotéasome et forme alors un autre type de protéasome appelé thymoprotéasome (Murata et al., 2007). L'expression de la sous-unité β5t est restreinte aux cTECs et aux progéniteurs de TECs mais pas dans d'autres types cellulaires y compris les mTECs ou les cellules dendritiques du thymus (Ohigashi et al., 2013; Ripen et al., 2011). Des souris déficientes pour β5t ont été générées. Chez ces souris, les cTECs expriment

alors l'immunoprotéasome « classique » ($\beta 5i$). L'architecture du thymus est altérée ainsi que la sélection positive des thymocytes SP $CD8^+$. Une diminution de 20-30% des T $CD8^+$ en périphérie est observée comparé aux souris WT (Murata et al., 2007; Nitta et al., 2010). De plus, une étude récente montre que les T $CD8^+$ produits en l'absence de $\beta 5t$ ont des fonctions immunologiques amoindries : réponse TCR diminuée, maintien du pool de T naïfs en périphérie réduit (Blanco and Saban, 2015). Les T $CD8^+$ restants sont certainement sélectionnés par des peptides générés par un autre mécanisme (Takahama et al., 2012). Ainsi, le thymoprotéasome permet aux cTECs d'exprimer un répertoire de peptides du soi unique (Florea et al., 2010; Murata et al., 2007).

De manière très intéressante, il a été montré que la machinerie de présentation par le CMH II des cTECs fait intervenir des composants, lysosomes et protéases différents des autres types cellulaires capables de présenter des peptides par le CMH II comme les DCs ou les mTECs. Notamment, lors de la génération de molécules de CMH II, les CPAs comme les cellules dendritiques ou les mTECs utilisent la cathepsine S pour dégrader la chaîne invariante (CD74) liée au CMH II dans le réticulum endoplasmique. Les cTECs, elles, utilisent la cathepsine L qui est codée par le gène *Ctsll* (Honey et al., 2002; Nakagawa et al., 1998). Les souris *Ctsll*^{-/-} montrent une diminution de 60-80% des thymocytes SP $CD4^+$ et des T $CD4^+$ en périphérie alors que l'expression de CMH II à la surface des cTECs est normale chez ces animaux. Ces résultats suggèrent l'importance de la cathepsine L dans la sélection positive $CD4$.

Une autre protéine a été mise en évidence lors de l'analyse des cTECs, la sérine protéase spécifique du thymus (TSSP) est très fortement exprimée dans ce type cellulaire (Bowlus et al., 1999; Carrier et al., 1999). La déficience pour cette protéase n'induit pas de diminution en terme de nombre de T $CD4^+$ (Viret et al., 2011). Néanmoins, la sélection positive de certains TCR transgéniques restreints au CMH II comme OT-II et Marilyn est altérée dans les souris déficientes pour TSSP (Gommeaux et al., 2009). Ces souris répondent également faiblement à une immunisation par « hen egg lysozyme » (HEL). Cette observation a été associée au fait que la distribution du répertoire TCR Vb β est altérée chez ces animaux (Viret et al., 2011), suggérant l'importance de cette protéase dans la sélection positive.

2.3.La sélection négative

La question de la distinction entre le soi et le non-soi par le système immunitaire a été pendant longtemps l'une des questions majeures dans le domaine de l'immunologie. Les premières preuves expérimentales montrant que les LTs auto-réactifs sont sélectionnés négativement dans le thymus ont été amenées dans les années 80 par deux études indépendantes (Kappler et al., 1987; Kisielow et al., 1988b). Pour cela, Kappler et al. ont utilisé un anticorps monoclonal (KJ23a) ciblant les lymphocytes T portant un TCR V β 17a. Ce TCR interagit fortement avec le CMH II IE. L'analyse dans différents fonds génétiques de souris a révélé une présence de T en périphérie portant ce TCR sauf dans le fond génétique C57BR qui exprime le CMH II IE. Ils ont ensuite montré que des thymocytes DP portant ce TCR étaient présents dans le thymus des souris C57BR mais qu'ils étaient absents au stade SP ainsi qu'en périphérie suggérant alors la délétion de clones au sein du thymus pendant le développement des thymocytes. La sélection négative n'est possible que par rapport au stade de différenciation précoce des thymocytes lorsqu'ils arrivent dans la medulla. En effet, au lieu de répondre à une stimulation de leur TCR par une prolifération (Arora et al., 2015), la reconnaissance avec une forte affinité d'un complexe CMH/peptide va induire l'apoptose de la cellule (Figure 8).

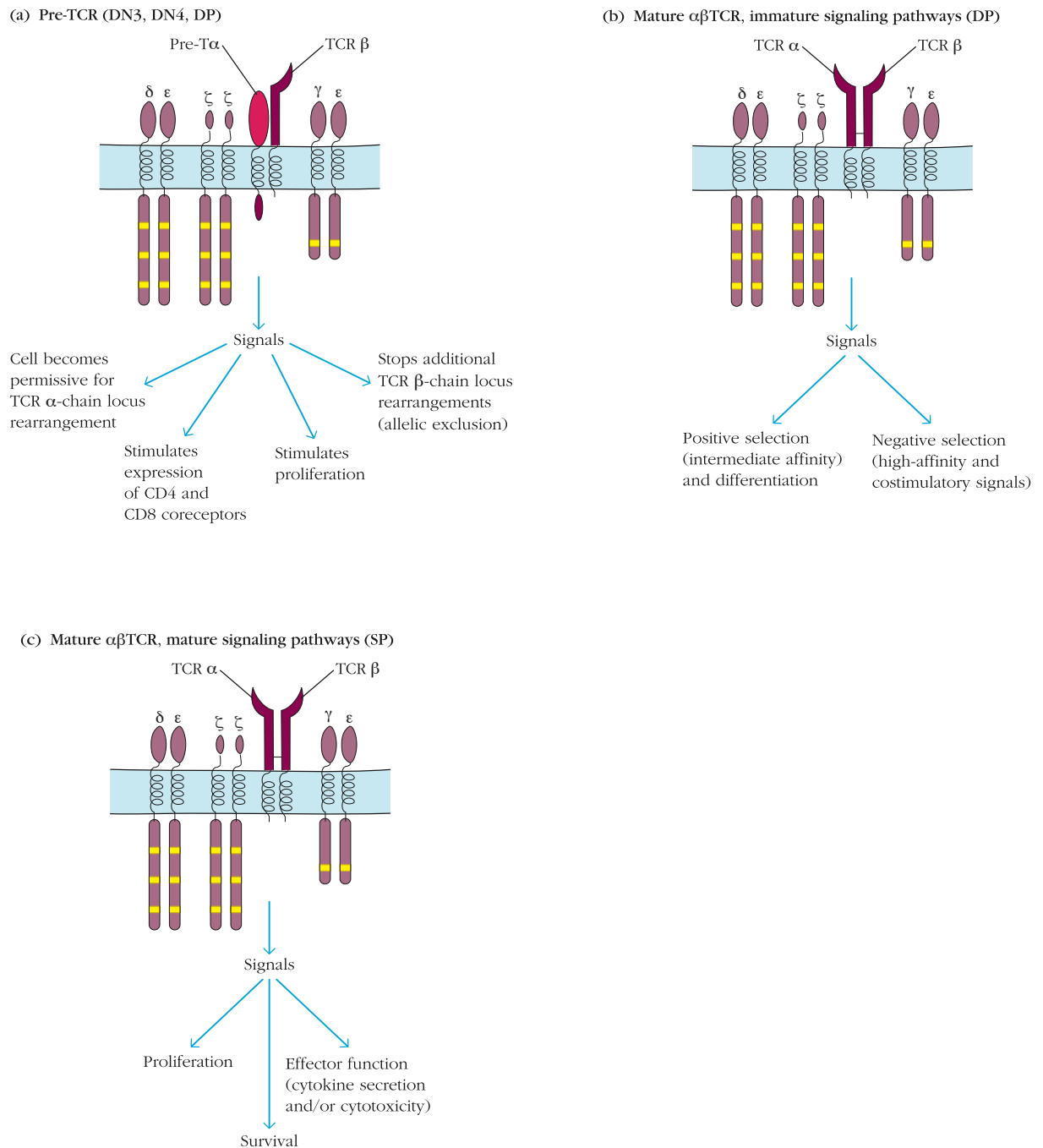


Figure 8 Evolution de la signalisation TCR en fonction du stade de développement d'un thymocyte. a. Réponses induites suite à la stimulation du pré-TCR. b. Réponses induites par la stimulation du TCR au stade DP. c. Réponses induites par la stimulation du TCR d'un lymphocyte T mature.

Bien que les peptides présentés dans la medulla sont des peptides du soi, ce phénomène va permettre la délétion des thymocytes présentant un TCR auto-réactif avant de migrer vers la périphérie (Klein et al., 2014). Environ 50 à 70% des thymocytes ayant passé la sélection positive vont échouer à passer la sélection négative (Fukui et al., 1997; van Meerwijk et al., 1997). Les cellules mTECs sont l'un des acteurs majeurs jouant un rôle

dans la sélection négative par leur capacité à présenter des antigènes spécifiques de tissus (décrit en partie 1). Cependant, en plus de cette présentation directe par les mTECs, il existe un transfert d'antigènes entre les mTECs et les cellules dendritiques qui va permettre une présentation croisée de peptides (Gallegos and Bevan, 2004). Les DCs vont donc jouer un rôle extrêmement important dans le mécanisme de la sélection négative (Taniguchi et al., 2012). En effet, Anderson et al., dans un modèle de culture de thymus ré-agrégé, montrent que les TECs sont bien moins efficaces pour médier la sélection négative que les DCs (Anderson et al., 1998). En effet, il a été démontré que les mTECs ont plus tendance à induire l'anergie plutôt que la délétion de ces thymocytes auto-réactifs (Ramsdell et al., 1989). De plus, presque toutes les cellules stromales thymiques ou même des cellules non-thymiques, sont capables *in vitro* d'induire un signal de mort par apoptose des thymocytes dès lors qu'elles expriment un CMH approprié (Pircher et al., 1993), ce qui est compatible avec la notion que la sélection négative peut intervenir aussi bien dans le cortex que dans la medulla (Baldwin et al., 1999). Et bien que la medulla ait été considérée pendant longtemps comme le site majeur de la sélection négative, il est maintenant clair que la majorité de la sélection négative a lieu dans le cortex. Plusieurs études récentes ont confirmé que, en plus de la sélection positive, une grande partie de la sélection négative a lieu au sein du cortex thymique (McCaughy et al., 2008; Stritesky et al., 2013). Le type cellulaire responsable de cette sélection négative est le sous-type de cellules dendritiques résidentes du cortex CD11c⁺ (McCaughy et al., 2008). Toutefois, le microenvironnement de la medulla thymique fournit une représentation unique des antigènes du soi. Néanmoins, il a été reconnu que le mécanisme de la sélection négative n'est pas absolu étant donné que de nombreux T auto-réactifs sont retrouvés en périphérie. Pour expliquer la raison de cette évocation de T auto-réactifs, l'hypothèse la plus développée est celle de l'existence d'un seuil. Seuls les thymocytes ayant une affinité au dessus d'un certain seuil sont éliminés. Un argument pour cette hypothèse est que les T auto-réactifs présents en périphérie ont une affinité faible (Yu et al., 2015). Ainsi, ces lymphocytes peuvent également reconnaître utilement des peptides d'origine infectieuse. Il paraît ainsi utile que la sélection négative ne soit pas trop drastique. En effet, il a été montré que la tolérance au soi peut induire des trous dans le répertoire TCR et ainsi empêcher des réactions contre du non-soi (Vidović and Matzinger, 1988). De plus, il a été suggéré que de nombreux auto-antigènes ne sont pas exprimés dans le thymus et donc ne peuvent pas mener à une sélection négative. Le fait que dans des conditions « normales », ces T auto-réactifs ne conduisent pas à des lésions

auto-immunes a conduit à l'hypothèse qu'il existe des mécanismes de tolérance en périphérie en complément de la tolérance centrale (Miller et al., 1989).

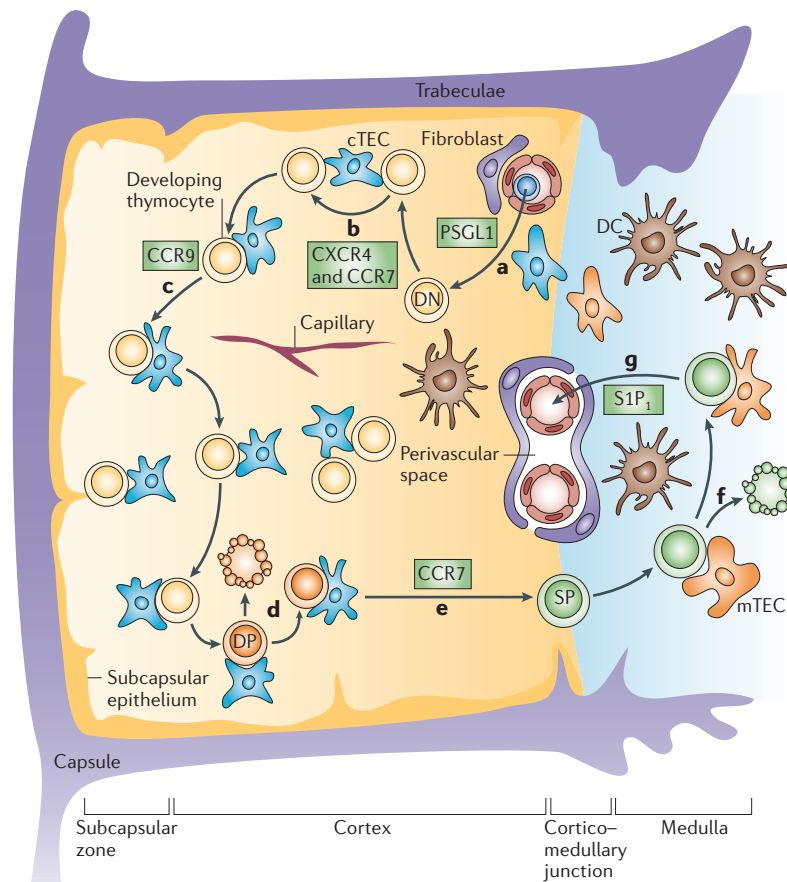


Figure 9 Les étapes de sélection positive et négative dans le thymus. a. Les thymocytes arrivent au niveau de la jonction cortico-medullaire via le flux sanguins. b et c. Les thymocytes mûrissent dans le cortex jusqu'au stade DP. d. Etape de sélection positive, la majorité des thymocytes vont mourir par négligence, environ 5% vont être sélectionnés négativement et moins de 5% vont passer cette étape. e. Migration des thymocytes SP vers la médulla. f. Etape de sélection négative, les thymocytes reconnaissant les TSAs présentés par les mTECs ou les DCs vont mourir par apoptose ou devenir anergique. g. Les thymocytes matures migrent vers la périphérie (Takahama, 2006).

(a).Sélection des T régulateurs

Bien que la sélection négative soit un mécanisme bien décrit et largement admis, sa contribution à la tolérance n'est pas complète (Davis, 2015). En effet, la délétion seule des thymocytes auto-réactifs n'est pas suffisante pour empêcher le développement de MAIs. Même si l'injection expérimentale de tétramères CMH/peptide dans des thymus de souris

WT permet une délétion des thymocytes spécifiques de ce peptide (Malhotra et al., 2016). Pour certains auto-antigènes, cette stratégie ne fonctionne pas et donc ceux-ci ne peuvent être contrôlés que par la génération intra-thymique de Tregs Foxp3⁺ (Legoux et al., 2015). L'importance de la medulla pour l'induction de tolérance ne dépend donc pas uniquement de la capacité des mTECs à induire l'apoptose ou l'anergie des T conventionnels mais également à permettre la génération de Tregulateurs FoxP3⁺ (Aschenbrenner et al., 2007; Coquet et al., 2013; Wirnsberger et al., 2011). Deux sous-types de thymocytes ont été identifiés comme précurseurs des Tregs CD4⁺Foxp3⁺ : les Foxp3⁺CD25⁻ et les Foxp3⁻CD25⁺ (Lio and Hsieh, 2008; Tai et al., 2013). Néanmoins, les mécanismes conduisant à ce phénotype de précurseurs de Tregs ne sont pas clairement définis, même si des études semblent montrer la nécessité des mTECs pour la différenciation des progéniteurs Foxp3⁺CD25⁻ par l'interaction avec des molécules de co-stimulation telles que OX40/OX40L, GITR/GITRL et CD70/CD27 (Coquet et al., 2013; Mahmud et al., 2014). Les Tregs sélectionnés dans le thymus portent un TCR d'affinité moyenne à forte pour des auto-antigènes. Il existe à l'heure actuelle plusieurs modèles pour expliquer les mécanismes de sélection des Tregs. Certains sont basés sur l'auto-réactivité du TCR (Hsieh et al., 2004), la dépendance à certaines cytokines comme l'IL-2 (Malek et al., 2002) et l'interaction avec les CPAs du thymus notamment les mTECs (Yang et al., 2015). Les premières indications suggérant l'importance du TCR dans la sélection des Tregs viennent de l'observation du niveau d'expression relativement important de CD25, CD5 et CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) car ces marqueurs sont connus pour être induits par la stimulation du TCR. CD5 permet de moduler l'intensité du signal TCR via le recrutement de SHP-1 (Azzam et al., 2001). L'une des études montrant que la sélection des Tregs passe par une forte stimulation du TCR vient de l'analyse d'animaux déficients pour CD5 ou SHP-1 qui possèdent un plus grand nombre de Tregs que les animaux WT (Carter et al., 2005). D'autres études ont permis de démontrer l'importance du TCR dans cette sélection. Des souris Rag^{-/-} exprimant un TCR transgénique spécifique de la MBP (myelin basic protein) développent spontanément une EAE. Au contraire, des souris Rag^{+/+} exprimant ce même TCR plus les TCRs endogènes produisent une population de Tregs capable d'empêcher le développement de la maladie (Lafaille et al., 1994; Olivares-Villagómez et al., 1998). Des études plus approfondies sur ces animaux ont montré que pour obtenir des Tregs à partir de ce TCR spécifique de MBP, il fallait une expression du ligand de ce TCR par un autre transgène. Ces animaux sont alors protégés de la maladie à la fois par la sélection négative mais également par la génération de Tregs spécifiques (Apostolou et al.,

2002; Bensinger et al., 2001; Kawahata et al., 2002). L'observation à la fois de sélection négative et de génération de Tregs suggère que l'expression de FoxP3 induit des mécanismes de survie à la sélection négative (van Santen et al., 2004). Néanmoins, l'analyse du répertoire TCR des thymocytes précurseurs de Treg et des non-Treg montre qu'il y a un chevauchement partiel de séquences (Hsieh et al., 2006). Cette observation suggère que le signal TCR n'est pas le seul facteur permettant l'induction de FoxP3 et la différenciation en Treg.

D'autres molécules ont également été décrites comme jouant un rôle dans la génération des Tregs comme la molécule de co-stimulation CD28. En effet, les souris déficientes pour CD28 ont un nombre réduit de Tregs (Salomon et al., 2000). Une autre étude a montré que CD28 serait capable d'induire un signal intrinsèque en plus de sa capacité à induire la production d'IL-2 qui permet d'induire l'expression de FoxP3, GITR et CTLA-4 (Tai et al., 2005). CD28 a donc un rôle important en intervenant à la fois dans la phase dépendante du TCR pour la génération de Tregs mais également dans la phase indépendante du TCR.

En effet, d'autres facteurs comme l'IL-2 et dans une moindre mesure l'IL-7 et IL-15 ont été identifiés comme importants dans la génération des Tregs. Les souris déficientes pour l'IL-2 ou l'IL-2R α ont une diminution de 50% des thymocytes FoxP3. La déficience pour l'IL-7 ou l'IL-15 seule ne perturbe pas la génération des Tregs FoxP3⁺. Néanmoins, les souris triples déficientes pour l'IL-2, IL-7 et IL-15 ont une absence complète de thymocytes FoxP3⁺ ainsi que de cellules FoxP3⁺ en périphérie (Burchill et al., 2007; Fontenot et al., 2005; Malek, 2008). De plus, les mTECs sont capables d'induire une survie et prolifération des Tregs via l'interaction ICOS/ICOS-L en présence d'IL-2 (Nazzari et al., 2014).

Le rôle du TGF- β dans la génération des Tregs a également été exploré. Des animaux déficients pour le récepteur TGF- β RI ont un défaut de génération de Tregs chez les nouveaux-nés, ce défaut peut ensuite être compensé par l'expansion des Tregs en périphérie (Liu et al., 2008). De manière intéressante, le TGF- β joue un rôle non pas par l'induction de facteur de Tregs comme FoxP3 mais par l'inhibition de l'apoptose de ces cellules. En effet, les Tregs déficients pour TGF- β RI ont une expression réduite de Bcl2 et une augmentation de Bim, Bax et Bak (Ouyang et al., 2011). Les souris déficientes pour les récepteurs au TGF- β et à l'IL-2 montrent une absence totale de Tregs (Liu et al., 2008).

Un facteur important est à prendre en compte lorsqu'on étudie la génération intra-thymique de Tregs. En effet, il existe un phénomène de ré-émigration des Tregs depuis la périphérie vers le thymus (Hale and Fink, 2009). Ces Tregs peuvent être mis en évidence par leur phénotype $CCR6^+CCR7^-$ (Cowan et al., 2016) et également dans le modèle de souris Rag2pGFP qui permet de mettre en évidence les Tregs « fraîchement » générés (GFP^+) et les Tregs revenant de la périphérie (GFP^-) (McCaughy et al., 2007). Ce phénomène de ré-émigration des Tregs est extrêmement important car les Tregs venant de la périphérie vont également jouer un rôle dans le développement des Tregs. En effet, la simple présence des Tregs $CCR6^+CCR7^-$ va entraîner une compétition vis-à-vis de la disponibilité en IL-2 venant des DCs du thymus (Davis et al., 2015; Thiault et al., 2015). Cette compétition crée une boucle de rétrocontrôle négative suggérant que le thymus n'est pas le seul acteur de l'établissement de la tolérance centrale.

On peut ainsi voir que le rôle de la medulla thymique pour l'induction de la tolérance passe non seulement par la délétion clonale et l'anergie mais aussi par la génération de Tregs $Foxp3^+$ (Aschenbrenner et al., 2007). Une étude récente renforce l'importance du thymus dans la sélection des Tregs ; en effet, cette étude montre que les Tregs dont la différenciation est induite par des CPAs du thymus (DCs ou mTECs) présentent une méthylation plus importante de FoxP3. Cette augmentation de méthylation permet un phénotype plus stable des Tregs ainsi qu'une meilleure capacité à contrôler le rejet de greffe (Garg et al., 2017).

II-Tolérance périphérique

Le terme tolérance ne s'applique pas uniquement aux mécanismes centraux qui viennent d'être abordés. Il existe une multitude de couches de protection qui permettent au système immunitaire de prévenir toute réaction de ces cellules ou anticorps contre les composants du soi. Il a été montré, depuis plusieurs années maintenant que les cellules immunitaires jouent également un rôle très important dans l'inhibition sélective des réponses contre le soi. L'exemple le plus éloquent est la découverte ainsi que la caractérisation des lymphocytes T régulateurs, qui sont spécifiques du soi (Romagnoli et al., 2002). Cette découverte a, à l'époque, révolutionné le domaine de la tolérance, de l'auto-immunité et évidemment de la transplantation (Goodnow et al., 2005). Ici, nous allons décrire certains mécanismes mis en jeu dans la périphérie afin d'inhiber les réponses immunitaires contre le soi.

1.La tolerance passive

1.1.La délétion clonale/l'apoptose

Les mécanismes de maintien de la tolérance périphérique peuvent impliquer l'induction de la mort cellulaire. La mort cellulaire joue un rôle important à la fois dans la tolérance centrale et périphérique. Cela a été démontré dans des souches de souris présentant des mutations de Fas ou FasL qui développent spontanément des maladies auto-immunes systémiques. Pour les lymphocytes B comme pour les lymphocytes T, l'engagement de Fas par FasL conduit à une mort rapide par apoptose connue sous le nom d'AICD (Activation-Induced Cell Death) (Kennedy et al., 1999). Or, les lymphocytes T activés augmentent leur expression de Fas et FasL, ce qui permet une sorte de rétrocontrôle inhibant une réponse exacerbée qui serait inappropriée (Siegel, 2006).

1.2.L'anergie

Dans des conditions de présentation immunogène, la rencontre d'un lymphocyte mature avec un antigène conduit à une stimulation de la réponse immunitaire. De manière simplifiée, l'activation d'un T naïf mature dans un OLS conduit à la génération de T effecteurs et mémoires. Cette activation fait intervenir des interactions entre l'APC et le LT ainsi que des signaux médiés par des cytokines. Les cellules effectrices T helpers vont moduler la réponse immunitaire par l'intermédiaire de cytokines et chimiokines et les effecteurs CD8⁺ acquièrent un phénotype cytotoxique permettant la lyse des cellules infectées. Néanmoins, les conditions dans lesquelles se déroule cette interaction sont extrêmement importantes. En effet, les facteurs extérieurs à cette interaction peuvent conduire à l'établissement de tolérance plutôt que de réponse immunitaire. Dans ce cas, la présentation est appelée tolérogène plutôt qu'immunogène. Un même antigène peut être tolérogène ou immunogène, tout dépend du contexte dans lequel il est présenté. Par exemple, un antigène présenté à un lymphocyte T en l'absence de signaux de co-stimulation adéquats va résulter en la mise en place d'une forme de tolérance appelée anergie (Schwartz, 2003) qui se définit par une réponse de la cellule la rendant insensible aux stimulation. Alors que ce même antigène présenté avec les signaux de co-stimulation appropriés conduira à l'activation de la cellule T.

1.3.L'ignorance

Certains antigènes sont tout simplement isolés et donc non atteignables par le système immunitaire, le plus souvent en raison d'une barrière anatomique. Par exemple, la chambre antérieure de l'œil est considérée comme un site de privilège immunitaire. Dans ce site, il n'y a pas de drainage lymphatique, il est donc isolé des interactions avec le système immunitaire. L'inconvénient de ce mécanisme est que comme ces antigènes n'ont jamais été présentés au système immunitaire, en cas de rupture du confinement et exposition au système immunitaire, ils seront reconnus comme du non-soi. Une réaction importante se met donc en place et il est fréquent que lors d'un incident entraînant une blessure à un œil, les patients présentent une inflammation des 2 yeux suite à l'inflammation causée par la réaction immunitaire contre les tissus de l'œil reconnus comme non-soi (Simpson, 2006). Il s'agit du phénomène classique d'ophtalmie sympathique.

2.La tolérance active

La régulation passe également par un troisième mécanisme pour maintenir la tolérance en plus de l'apoptose ou de l'anergie. Ce mécanisme met en jeu des acteurs cellulaires et notamment les lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Tregs sont capables de reconnaître via leur TCR des antigènes du soi, contrôle des MAIs, et également certains antigènes du non-soi comme dans le rejet de greffe (Taflin et al., 2010). Ils peuvent agir dans les organes lymphoïdes secondaires mais également sur le lieu de l'inflammation comme par exemple dans le cas d'une greffe où il a été démontré que le recrutement de Tregs au sein du greffon joue un rôle important dans le contrôle du rejet (Taflin et al., 2010). Dans tous les cas, ils vont être capables d'inhiber les réponses immunitaires lorsqu'ils sont stimulés par des CPAs présentant un antigène reconnu par leur TCR. Les Tregs peuvent être générés de deux façons, soit naturellement dans le thymus (nTreg), soit après avoir été induits en périphérie (iTregs). Les caractéristiques de ces cellules seront décrites dans la suite de ce manuscrit.

2.1.Les lymphocytes T régulateurs

L'existence de cellules T inhibitrices a été abordée pour la première fois dans les années 70. Cette activité inhibitrice a tout d'abord été observée dans les T CD8, qui ont alors été

appelés T CD8 suppresseurs (Gershon and Kondo, 1970, 1971; Gershon et al., 1972). Malheureusement, les moyens techniques de l'époque n'ont pas permis de les isoler, les cultiver, ni de les caractériser sur le plan phénotypique. L'évolution des techniques a permis de reprendre, 25 ans plus tard, la recherche sur les T régulateurs avec S. Sakaguchi qui a caractérisé les Tregs $CD4^+CD25^+$ possédant des capacités immunosuppressives (Sakaguchi et al., 1995).

(a). Les lymphocytes T régulateurs $CD4^+$

(i). Les Tregs $CD4^+FoxP3^+$

Les Tregs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ sont les Tregs les plus étudiés et donc les mieux caractérisés. Il existe deux sous-types de Tregs $CD4^+$, une population dite Tregs « naturels » (nTregs) et une population induite (iTregs). La population de nTregs est issue du thymus et représente 5 à 10% du répertoire des T $CD4^+$ (Suby et al., 2011). Durant plusieurs années, de nombreux groupes de recherche ont proposé des marqueurs de surface comme CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4) (Takahashi et al., 2000), GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor family-related protein) (Shimizu et al., 2002), CD62L (Szanya et al., 2002) ou LAG-3 (Huang et al., 2004) afin de discriminer ces Tregs. Cependant, ces marqueurs ne permettent pas une discrimination absolue. En effet, leur expression est modifiée après activation et ils sont communs aux Tconv et Tregs ce qui rend impossible l'identification des Tregs versus des T conventionnels. Depuis les expériences de Sakaguchi et al. en 1995 démontrant que le transfert de cellules TCD4⁺ déplétées avec un anticorps anti-CD25 dans des souris nude athymiques induit une auto-immunité et que le transfert de TCD4⁺CD25⁺ permet de contrôler cette auto-immunité, le CD25 est devenu le marqueur de référence pour caractériser les Tregs (Sakaguchi et al., 1995). Ce marqueur est toujours à l'heure actuelle l'un des plus importants associés avec l'absence d'expression du CD127. C'est pourquoi le phénotype utilisé pour définir les Tregs sans utiliser de marqueurs intracellulaires est CD25^{hi} CD127^{low}, défini par Liu et al en 2006. Le CD127, chaîne alpha du récepteur à l'IL-7, corrèle de manière inverse avec l'expression de FoxP3 et permet donc de définir les Tregs CD4 (Liu et al., 2006). FoxP3 (Forkhead box P3) est le facteur de transcription caractéristique des T régulateurs CD4. Ce facteur de transcription a été décrit comme majeur pour leur développement, leur identité et leur fonction (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Chez l'Homme, l'importance de FoxP3 est soulignée par le fait qu'une mutation dans le gène FoxP3 induit un syndrome auto-immun nommé IPEX (Immune

dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked) (Bacchetta et al., 2006) dans lequel les Tregs sont absents ou non-fonctionnels. Même si l'expression de FoxP3 peut être induite de manière transitoire lors de l'activation des lymphocytes T (Morgan et al., 2005), il reste aujourd'hui le marqueur le plus fiable pour identifier les Tregs CD4⁺ chez l'Homme. De manière intéressante, il a également été montré que le CD45RA permet de distinguer deux états distincts pour les Tregs FoxP3 : CD45RA⁺FoxP3^{low} (Tregs au repos) et CD45RA⁻FoxP3^{hi} (Tregs activés) (Miyara et al., 2009).

La seconde population, les Tregs induits (iTregs) sont dérivés de T conventionnels naïfs de la périphérie, de manière préférentielle pour des T récemment émigrés du thymus (Paiva et al., 2013). Des études ont notamment montré que le TGF-β peut induire l'expression de FoxP3 par des T naïfs et induire leur différenciation en iTregs (Chen et al., 2003). Néanmoins, même si les iTregs acquièrent certaines propriétés des nTregs comme leur capacité suppressive, elles ne possèdent pas les mêmes marqueurs épigénétiques et vont donc rapidement perdre l'expression de FoxP3 *in vivo* (Floess et al., 2007). Au contraire, les iTregs induite *in vivo* sont très proches des nTregs et vont posséder des propriétés très proches de ceux-ci en termes de suppression et de stabilité. Plusieurs mécanismes pour l'induction de Tregs *in vivo* et *in vitro* sont définis (Schmitt and Williams, 2013). L'induction *in vitro* de T naïfs CD4⁺CD25⁻ de souris extraits à partir des OLS ou du sang en Tregs CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ se fait en présence de TGF-β1 et d'IL-2 (Chen et al., 2003; Davidson et al., 2007). La génération de iTregs *in vivo* a également été montré dans des modèles d'inflammation chronique type asthme ou colite (Haribhai et al., 2009; Weiss et al., 2012). *In vivo*, la rencontre avec un peptide peut favoriser l'induction de iTregs notamment dans des modèles utilisant des minipompes osmotiques (Apostolou and von Boehmer, 2004; Picarda et al., 2014).

Afin de distinguer les nTregs des iTregs, plusieurs marqueurs ont été proposés comme Helios ou Nrp-1 (neuropilin-1) (Thornton et al., 2010; Yadav et al., 2012). Cependant, ces marqueurs semblent plutôt refléter un état d'activation des cellules et ont donc été remis en question (Akimova et al., 2011). Un facteur permettant de différencier les nTregs des iTregs est la spécificité du récepteur. En effet, les nTregs sont spécifiques du soi, ces Tregs vont être exposés de manière quasiment continue à leur antigène et vont proliférer en périphérie ce qui pourrait expliquer leur expression constitutive de marqueurs considérés comme des marqueurs d'activation des cellules T tels CD25, GITR ou CTLA-4 (Fisson et al., 2003). A l'opposé, les iTregs dérivent de T naïfs ayant survécus à la sélection négative

et n'ayant donc pas de spécificité contre le soi. Néanmoins, il est possible de dériver *in vitro* des iTregs capable de contrôler le développement du diabète de type 1 (Glisic et al., 2010).

Les Tregs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ont été étudiés dans de nombreuses conditions. Leur rôle a, par exemple, été décrit dans un modèle murin de greffe de peau dans lequel les Tregs sont capable d'inhiber l'activation des T $CD8^+$ dans les ganglions drainants et empêchant la génération de T $CD8^+$ mémoire (Carvalho-Gaspar et al., 2008).

(ii). Les mécanismes de suppression des Tregs $CD4^+FoxP3^+$

Les mécanismes de suppression par lesquelles vont agir les Tregs peuvent être regroupés en 3 catégories qui sont : la suppression par contact cellulaire, la perturbation métabolique et la sécrétion de cytokines.

(a). La suppression par contact cellulaire

Les molécules exprimées à la surface des Tregs impliqués dans la suppression par contact cellulaire sont CTLA-4 et LAG-3. Elles vont agir sur les DCs, la liaison CTLA-4/B7 permet de diminuer l'expression de CD80-86 à la surface de celle-ci et ainsi réduire leur capacité à activer les LTs. La déficience pour CTLA-4 dans les Tregs induit une lymphoprolifération et le développement spontané de maladie auto-immune chez la souris (Wing et al., 2008). Cette interaction va également jouer un rôle sur le catabolisme du tryptophane par la surexpression d'IDO dans la DC. IDO va dégrader l'acide aminé essentiel tryptophane et ainsi va empêcher la prolifération des LT activés en induisant une mort cellulaire (Mellor et al., 2004).

LAG-3 est une protéine appartenant à la superfamille des immunoglobulines, elle est capable d'interagir avec le CMH-II ce qui induit une inhibition de l'activation des cellules dendritiques (Liang et al., 2008). Enfin, les Tregs sont capables d'induire la mort cellulaire par cytolysse via le contact cellulaire et la sécrétion de granzymes B avec ou sans perforine (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004). Les Tregs peuvent également agir via l'interaction PD-1/PD-L1 en induisant l'apoptose des lymphocytes B (Gotot et al., 2012).

(b). La perturbation métabolique

Le principe de la perturbation métabolique repose sur le fait de modifier l'environnement d'une cellule afin de le rendre inadéquat pour celle-ci. L'un des exemples les plus connus de perturbation métabolique par les Tregs est la déprivation en IL-2 du milieu. Les Tregs

consomme l'IL-2 présent dans le milieu et peuvent ainsi induire l'apoptose des LTs effecteurs en les privant de leur facteur de croissance (de la Rosa et al., 2004; Pandiyan et al., 2007).

(c). Les cytokines immunosuppressives

Plusieurs cytokines ont été décrites comme jouant un rôle dans la fonction des Tregs et notamment l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35. L'IL-10 semble être tout particulièrement importante du fait que son rôle de suppression a été mis en évidence dans des modèles d'auto-immunité, d'infection, de transplantation et d'inflammation (Sakaguchi, 2004). Chez la souris, il a également été montré que le TGF- β agit non-seulement via une inhibition de prolifération des Teffs mais également via la génération de iTregs CD4⁺FoxP3⁺ (Andersson et al., 2008). De la même manière, l'IL-35 va inhiber la prolifération des Teffs tout en induisant une population de iTregs (Collison et al., 2007, 2010).

(b). Les Tr1

Les Tr1 sont une population de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs induits décrite en 1997 (Groux et al., 1997). Cette population est principalement caractérisée par ses fonctions de régulation des cellules effectrices par la sécrétion d'IL-10 (Roncarolo et al., 2006). Mais également par des fonctions cytotoxiques via le granzyme B et la perforine (Magnani et al., 2011). L'étude des Tr1 a connu un essor en 2013 grâce à l'identification de marqueurs extracellulaires spécifiques des Tr1 (CD4⁺CD49b⁺LAG-3⁺CD226⁺) (Gagliani et al., 2013). Les Tr1 ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques et montrent des résultats encourageants notamment dans le contrôle de la GVHD après greffe de moelle osseuse (Bacchetta et al., 2014), mais également dans le traitement de la maladie de Crohn (Brun et al., 2009).

(c). Les Tregs CD8⁺

Bien que le rôle des Tregs CD8⁺ en condition d'homéostasie ne semble pas aussi majeur que pour les Tregs CD4⁺, les Tregs CD8⁺ sont des acteurs majeurs de l'immunité dans plusieurs conditions. Les études de ces dernières années ont permis de décrire le phénotype de nombreux sous-types de Tregs CD8⁺ chez l'Homme, la souris et le rat. Leur rôle a notamment été démontré dans l'immunité intestinale, l'auto-immunité, la tolérance orale, la prévention de la GVHD ainsi que du rejet de greffe (Guillonnet et al., 2007a; Li et al.,

2010; Picarda et al., 2014; Pomié et al., 2008a). Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés en particulier aux sous types $CD8^+CD45RC^{low}$.

(i). *Les Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$*

Le CD45, également connu sous le nom « Leucocyte Common Antigen » (LCA) est un récepteur commun à tous les leucocytes. Il s'agit d'une tyrosine phosphatase transmembranaire impliquée dans la signalisation du TCR et du BCR lors de son engagement, notamment par la régulation des kinases Src nécessaires à la transduction des signaux (Hermiston et al., 2003). Le CD45 peut être exprimé sous plusieurs formes du fait de l'épissage alternatif de trois exons (Figure 16). Ces isoformes diffèrent par leur domaine extracellulaire. Au sein des lymphocytes T, l'isoforme de CD45 exprimée évolue en fonction du stade d'activation et permet notamment de dissocier les T naïfs des T mémoires (Birkeland et al., 1989). De manière générale, les isoformes les plus longues comme CD45RA sont exprimées par les LTs naïfs alors que les isoformes les plus courtes facilitant l'activation, comme CD45RO sont exprimées à la surface des LTs activés et mémoires.

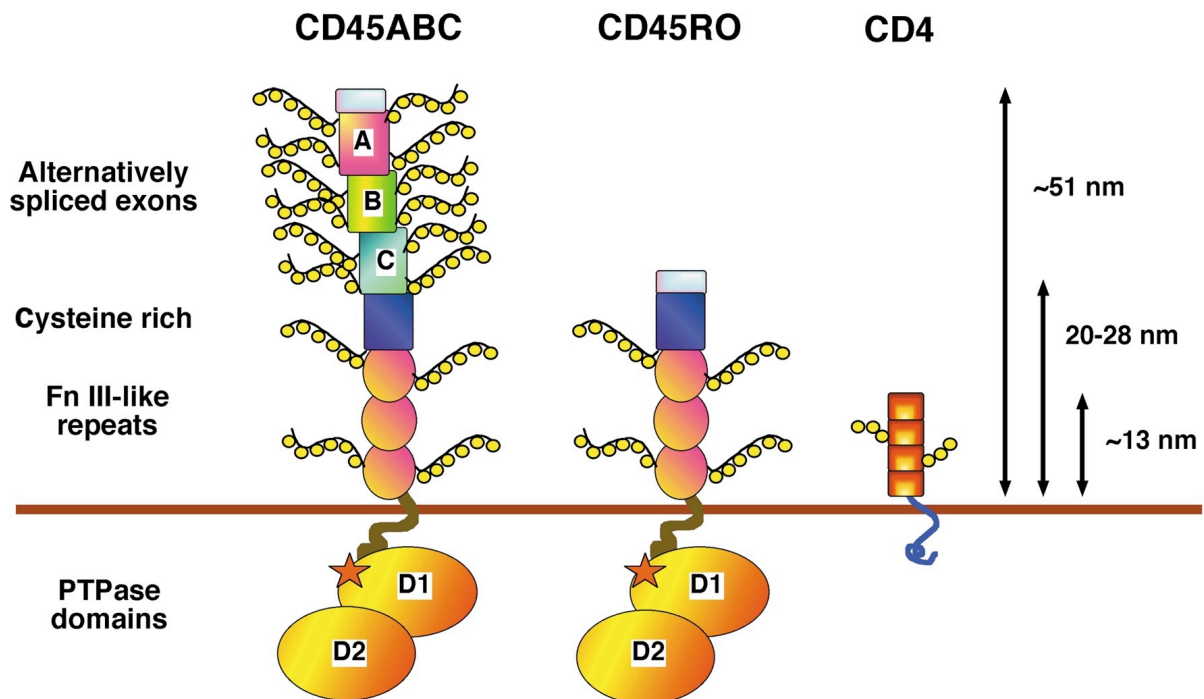


Figure 10 La molécule CD45 et ses isoformes générées par épissage alternatif, l'épissage alternatif de la molécule CD45 conduit à l'expression membranaire de 4 isoformes possible CD45 RA, RB, RC ou RO. (Penninger et al. 2001)

Chez l'Homme, il a été montré que le niveau d'expression de CD45RC permet de discriminer 2 populations dans les TCD4⁺ et 3 populations parmi les TCD8⁺. Chez le rat, ce même marqueur permet de discriminer 2 populations au sein des LTs CD4⁺ et CD8⁺. Ces populations se différencient également par leur fonction. Les lymphocytes T CD45RC^{hi} produisent de manière préférentielle des cytokines de type Th1 comme l'IFN γ ou l'IL-2 alors que les lymphocytes T CD45RC^{low} produisent plutôt des cytokines anti-inflammatoires de type Th2 comme l'IL-4, IL-13 ou IL-10 (Subra et al., 2001; Xystrakis et al., 2004a). De manière intéressante, il a également été montré que la répartition des lymphocytes T en fonction de CD45RC varie en fonction des souches de rat et est génétiquement contrôlée par les mêmes régions chromosomiques que celles influençant la susceptibilité aux maladies auto-immunes (Fournié et al., 2001; Subra et al., 2001). Chez le rat Brown Norway, lignée pure consanguine dite « inbred » susceptible aux maladies auto-immunes de type Th2, les T CD45RC^{low} sont prépondérants. Au contraire dans la souche Lewis, souche inbred susceptible aux maladies auto-immunes médiées par réponse Th1, ce sont les T CD45RC^{hi} qui sont prépondérants.

En 2004, Xystrakis et al. ont montré que l'expression de CD45RC permet de définir une population de nTregs dans le compartiment CD8⁺ (Xystrakis et al., 2004b). Ils ont défini chez le rat Lewis une population de nTregsCD8⁺CD45RC^{low} dont l'analyse transcriptionnelle a révélé une forte expression de FoxP3 et CTLA-4 comparée aux CD8⁺CD45RC^{hi}. Ces cellules stimulées *in vitro* produisent de l'IL-4, IL-10 et IL-13. Une étude plus poussée a montré que chez le rat Lewis seuls 2,6% des CD8⁺CD45RC^{low} expriment FoxP3 (Han et al., 2007). Chez l'Homme, l'analyse des trois populations de TCD8⁺ CD45RC⁺, CD45RC^{int} et CD45RC^{low} a montré que les proportions sont très variables entre les individus (Ordóñez et al., 2009). L'analyse de la réponse *in vitro* à une stimulation allogénique identifie les CD8⁺CD45RC^{low} comme étant la population produisant la plus forte quantité d'IL-17, IL-4, IL-5 et IL-10. La population CD45RC^{int} exprime un niveau intermédiaire de ces mêmes cytokines ainsi que de l'IFN γ (Ordóñez et al., 2013).

La fonction de ces Tregs a également été étudiée *in vitro*, dans un modèle de co-culture avec des splénocytes semi-allogéniques déplétés en T. Les nTregs CD8⁺CD45RC^{low} inhibent la prolifération ainsi que la sécrétion d'IFN γ par les CD8⁺CD45RC⁺

(Xystrakis et al., 2004b). Cette équipe a également démontré que cette fonction n'était pas due à un mécanisme de cytotoxicité. Des expériences de culture avec des anticorps bloquants ou des cultures en transwell semblent indiquer que cette suppression est dépendante d'un contact cellulaire. L'hypothèse de l'existence de mécanismes de cytotoxicité a également été écartée. *In vivo*, la présence de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} a été associée à des effets bénéfiques dans différents modèles. En auto-immunité, elles sont capables de prévenir le développement de l'uvéite auto-immune expérimentale. Elles sont également capables d'inhiber la GVHD induite par le transfert de TCD4⁺ (Xystrakis et al., 2004b). Dans un modèle d'induction de tolérance à l'allogreffe cardiaque par le blocage de l'interaction CD40/CD40L via un AdCD40Ig, notre équipe a décrit le rôle de cette population de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} (appelés Tregs CD8⁺CD40Ig). Ces Tregs sont notamment caractérisés par une augmentation au niveau transcriptionnel de GITR, TGF-beta, IL-2 et CD25 en comparaison des nTregsCD8⁺CD45RC^{low} (Guillonnet et al., 2007b). Environ 30% des Tregs CD8⁺CD40Ig sécrètent de l'IFN γ après stimulation. L'étude du répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} de la rate par immunoscope a révélé un répertoire naïf polyclonal et non biaisé alors que le répertoire des Tregs CD8⁺CD40Ig montre un biais vers la chaîne Vbeta11. L'analyse approfondie des TCR Vbeta 11 dans ce modèle révèle un biais privé (Picarda et al., 2014) (Figure 11).

In vivo, leur fonction suppressive passe notamment par leur sécrétion d'IFN γ qui induit l'expression d'IDO par les cellules endothéliales du donneur (Guillonnet et al., 2007b). Dans un modèle d'allogreffe cardiaque Lewis 1W sur Lewis 1A associée à une injection d'adénovirus codant pour CD40Ig au moment de la greffe, nous avons montré que les TregsCD8⁺CD45RC^{low} jouent un rôle majeur. En effet, les receveurs traités avec l'adéno-CD40Ig montrent une survie à long terme du greffon et le transfert de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} des animaux greffés et traités permet d'induire une tolérance à une greffe dans la même combinaison chez les animaux transférés (Guillonnet et al., 2007b). Les greffes tierce-partie de cœur de rat Brown Norway sur un receveur tolérant de greffon 1W sont rejetées, montrant la spécificité des Tregs induits lors de la première greffe. Nous avons également identifié dans cette population de Tregs CD8⁺CD40Ig, une population de Tregs capable de reconnaître un peptide dérivé du CMH du donneur. Cette population est capable à elle seule d'induire une tolérance à long terme du greffon (Picarda et al., 2014). Dans cette même combinaison de greffe, nous avons pu mettre en évidence que le traitement transitoire avec un anticorps anti-CD45RC permet une déplétion rapide par

apoptose des T $CD45RC^+$ permettant le contrôle de la réponse allogénique humorale sans altérer la réponse primaire ni la réponse mémoire. Ce traitement induit la tolérance du greffon en potentialisant la capacité des cellules régulatrices $CD4$ et $CD8^+CD45RC^{low}$. Ce traitement avec un anticorps humain est également capable d'inhiber la GVHD dans un modèle de souris humanisées (Picarda et al., 2017). *In vitro*, la co-culture de ces Tregs avec des TCD4 et des pDCs allogéniques montre une capacité suppressive supérieure à celles des nTregs $CD8^+CD45RC^{low}$. Les cultures en système transwell indiquent que leurs fonctions suppressives passent à la fois par le contact par l'intermédiaire de l' $IFN\gamma$ et FGL2 (Bezie et al., 2015; Li et al., 2010) mais aussi par des facteurs solubles comme l'IL-34 (Bézie et al., 2015a) (Figure 17).

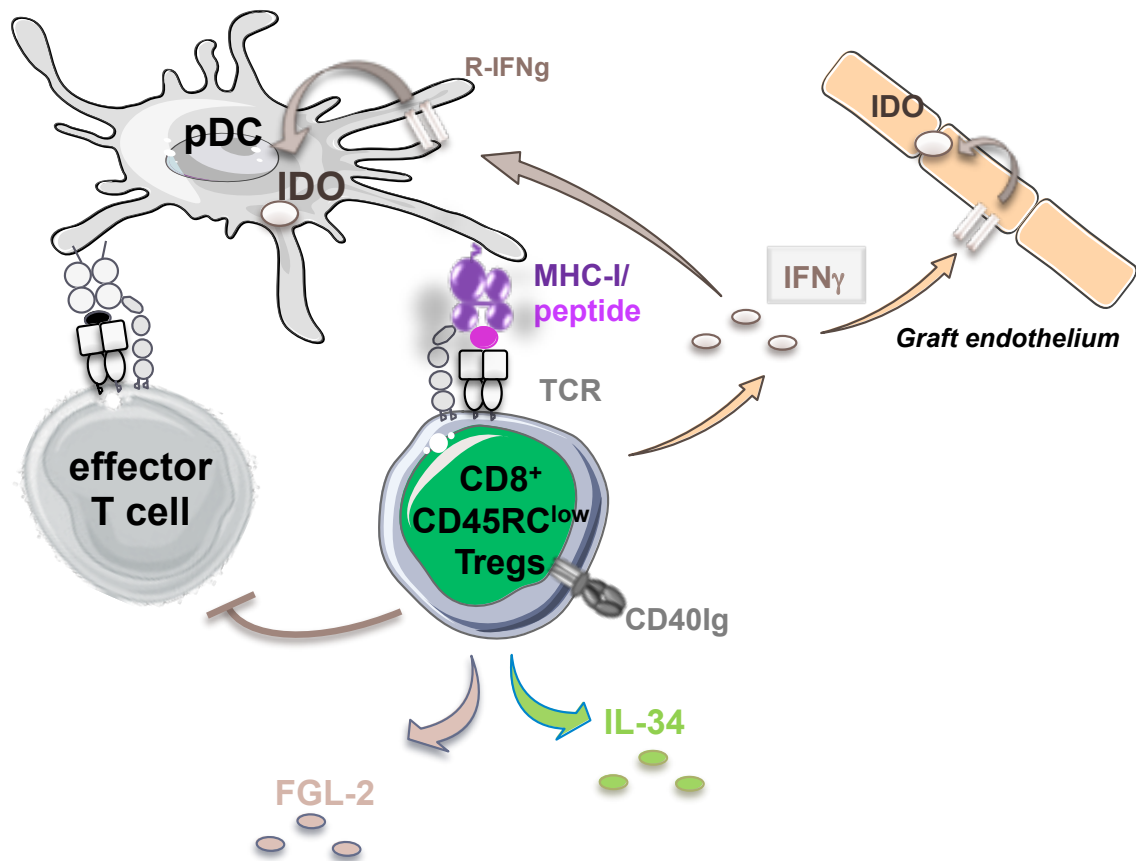


Figure 11 Résumé des travaux de caractérisation des Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$ réalisé par notre équipe chez le rat. Ces Tregs sont capables d'inhiber la GVHD et le rejet d'allogreffe cardiaque, ils ont un repertoire biaisé vers le $V\beta11$ et reconnaissent un peptide dominant. Ils agissent via la sécrétion d' $IFN\gamma$ qui induit la sécrétion d'IDO par les cellules endothéliales du greffon, via la sécrétion de FGL2 en induisant des Bregs ainsi que par l'IL-34 qui induit des Tregs par l'intermédiaire de cellules myéloïdes.

(ii). *Les T régulateurs CD8⁺CD28⁻*

Chez l'Homme, ces Tregs sont caractérisés par l'expression de FoxP3, GITR, CTLA-4 et CD62L (Scotto et al., 2004), ils sont également restreints aux molécules du CMH de classe I (Liu et al., 1998), Néanmoins, une étude chez les transplantés rénaux a remis en question l'expression de FoxP3 par ces Tregs (Korecka-Polak et al., 2011). Chez l'Homme, il a également été démontré que les Tregs CD8⁺CD28⁻ peuvent être générés *in vitro* en stimulant des PBMCs par différents moyens, notamment, en les stimulant par des peptides synthétiques ou des protéines solubles (Jiang et al., 1998), par des stimulations répétées avec des cellules présentatrices d'antigènes allogéniques (Ciubotariu et al., 1998). Cette stimulation pouvant être combinée à l'usage de cytokines comme l'IL-2 IL-7 et IL-15 (Yu et al., 2011). Enfin, par stimulation via des CPAs xénogéniques (Ciubotariu et al., 1998). Le rôle de ces Tregs a été largement décrit dans le contexte de la transplantation mais également dans le modèle de souris déficientes pour Aire par l'équipe du professeur Van Meerwijk. Cette population est la première population régulatrice décrite comme ayant un défaut de fonction dans le modèle de souris Aire KO (Pomié et al., 2008b).

B. Aire, le régulateur de l'auto-immunité

La protéine Aire (Auto-Immune Regulator) est l'un des acteurs majeurs de la mise en place de la tolérance. Cette protéine est majoritairement exprimée dans le thymus, par les mTECs matures (CD80^{hi}UEA-1⁺CMHII^{hi}). Aire est un activateur de la transcription, en effet, son mode d'action diffère de celui des facteurs de transcription classiques. Ce mode d'action consiste en l'induction d'expression d'un très large panel de gènes et en particulier, ceux codant pour des antigènes spécifiques de tissus qui sont des auto-antigènes. L'expression de ces TSA permet la sélection négative des lymphocytes T autoréactifs. Chez l'Homme, la déficience pour Aire conduit au développement d'une maladie auto-immune nommée APECED (*Auto-immune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*) ou APS-I (*Auto-immune Polyendocrine Syndrome Type I*).

I- L'APECED ou APS-1

L'APECED est une immunopathologie constitutive rare, se caractérisant par une triade de symptômes qui sont :

- une candidose cutanéomuqueuse, elle correspond à une infection opportuniste par *Candida Albicans*. Elle est habituellement le premier signe de l'APECED et finit par atteindre 100% des patients. Cette candidose augmente le risque de carcinome oral en causant une inflammation chronique. Elle est également corrélée avec la présence d'anticorps dirigé contre les cytokines de la classe des Th17 (IL-22, IL-17A, IL-17F), acteur de la défense antifongique (Kisand, Lilic et al. 2011) ;

- un hypoparathyroïdisme qui se traduit par une hypocalcémie et est généralement diagnostiquée à l'âge de 3-5 ans ;

- une insuffisance surrénalienne ou maladie d'Addison caractérisée par une fatigue profonde, une hypotension artérielle, une coloration bronzée de la peau, et des troubles gastriques. Cette maladie est diagnostiquée entre 11 et 15 ans. Ces deux endocrinopathies sont progressives et de nouveaux symptômes apparaissent au cours de la vie.

De nombreux auto-anticorps sont retrouvés chez les patients APECED et se traduisent par différentes affections. Notamment, des anticorps dirigés contre les interférons de type 1 sont retrouvés chez 100% des patients. La défaillance gonadique est également une composante commune, surtout chez la femme, 65% des femmes APECED sont touchées au début de l'âge adulte alors que la défaillance testiculaire a une prévalence de 25% et

apparaît plus tard dans la vie. Les patients présentent également des manifestations ectodermiques incluant une hypoplasie dentaire, une alopécie, une dystrophie onguilaire et la keratopathie oculaire. L'alopécie et le vitiligo (affection de la peau causant une dépigmentation) touche 30-40% des patients d'âge moyen (Figure 12). L'évolution de la maladie est imprévisible, le type de mutation ne prédit pas le parcours de la maladie. Cette triade a été rapportée pour la première fois en 1946 (LEONARD, 1946). De manière classique, un individu doit présenter au moins 2 des 3 symptômes de la triade pour être diagnostiqué comme souffrant de l'APECED, en général avant l'âge de 10 ans. Les patients développent également le plus souvent une pléiade d'autres symptômes, comme une alopécie, une dystrophie des dents ou des ongles, une hépatite ou encore un diabète de type 1 (Figure 12). Ces symptômes secondaires varient totalement d'un individu à l'autre même entre des jumeaux ayant exactement la même mutation du gène *aire* et vivant dans le même environnement (Kogawa et al., 2002a). L'APECED est l'une des rares maladies auto-immunes monogéniques (Vogel et al., 2002). En effet, elle se transmet par un mode autosomal récessif. Bien que l'APECED nécessite une mutation sur les 2 allèles, il existe maintenant de nombreuses preuves que des mutations de *Aire* mono alléliques peuvent conduire à une susceptibilité aux maladies auto-immunes (Cetani et al., 2001; Oftedal et al., 2015; Su et al., 2008). Bien qu'ayant une prévalence très faible à l'échelle mondiale, l'APECED peut atteindre une fréquence importante dans certains pays/régions comme la Finlande, la Sardaigne et l'Iran. Cette forte prévalence pourrait certainement s'expliquer par un effet de fondateur portant une mutation du gène *aire* dans ces régions (Björnses et al., 1996). Une avancée majeure dans l'étude de l'APECED fut faite en 1997 lorsque deux groupes ont identifié le gène responsable de cette maladie qu'ils nommèrent *aire* (Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine et al., 1997). Néanmoins la majorité des avancées dans la compréhension des mécanismes de cette maladie ont été faites grâce à des modèles génétiquement modifiés. On peut donc se poser la question de comment ces différents mécanismes peuvent s'imbriquer chez des animaux sauvages et chez l'Homme. Quel est le mode de tolérance dominant ? A quel point sont-ils redondants ? A quel point la variation génétique ou environnementale joue-t-elle un rôle ? L'un des moyens de répondre à ces questions et de comprendre comment l'état de tolérance est maintenu est de l'étudier dans le cas d'une rupture de cet état de tolérance.

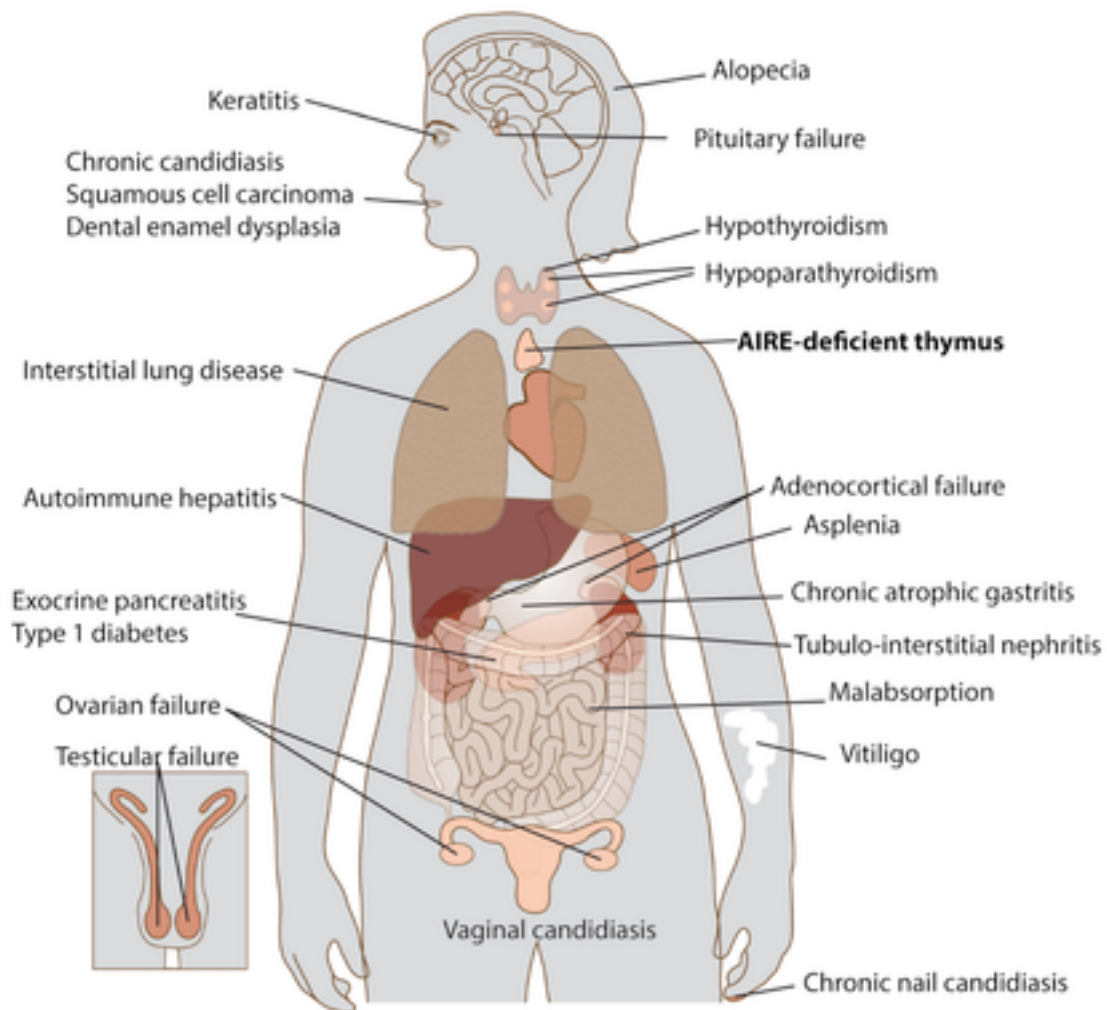


Figure 12 Représentation des symptômes associés à l'APECED

II- Les modèles de déficience pour Aire

Depuis la première description du modèle de souris Aire KO en 2002 par Anderson et al. (Anderson, 2002), plusieurs équipes ont émis l'hypothèse que Aire pourrait jouer une fonction différente ou avoir plus de fonctions chez l'Homme que chez la souris. L'argument le plus souvent avancé est que les modèles initialement décrits ne présentent qu'un phénotype léger comparé aux symptômes importants des patients APECED. De plus, les organes touchés dans ces modèles étaient très différents de ceux des patients (Ramsey et al., 2002). Les cibles des auto-anticorps des souris B6 Aire^{-/-} sont très différentes de celui des patients déficients pour Aire (Pöntynen et al., 2006). Néanmoins, il est vrai que le type, ainsi que le nombre d'organes visés par l'auto-immunité varient de

manière importante avec le fond génétique (Hubert et al., 2009) (Figure 13) . Notamment, l'induction d'une déficience pour Aire dans le fond génétique NOD (Non-Obese Diabetic) conduit au développement rapide d'une maladie très sévère associé à la présence de nombreux auto-anticorps causant la mort des animaux vers 15 semaines (Jiang et al., 2005; Niki et al., 2006). A noter tout de même que le fond génétique NOD possède de manière constitutive des lymphocytes T auto-réactifs impliqués notamment dans le développement du diabète de type 1. Afin d'expliquer ces importantes différences entre le modèle souris et la maladie humaine, Diane Mathis et Christophe Benoist suggèrent que la déficience pour Aire se traduit par une réponse immunitaire et que, comme toute réponse immunitaire, celle-ci est sujette à la restriction au CMH ce qui implique que 2 fonds génétiques de souris ou 2 patients ne vont pas forcément répondre à un même auto-antigène (Mathis and Benoist, 2009). Un autre argument important suggérant un rôle plus important de Aire chez l'Homme est le fait qu'une étude a démontré un défaut de fonction des T régulateurs chez les patients APECED (Arstila Talvensaari et al., 2007). A l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul modèle de souris déficiente pour Aire montrant un défaut de fonction des Tregs $CD4^+$. Dans les souris NOD, il a été démontré que les Tregs générés à la période périnatale sont essentiels pour contrôler l'auto-immunité. En effet, le KO conditionnel pour Aire déclenché à 35 jours n'induit pas le développement de l'auto-immunité comme chez les souris NOD-Aire KO (Yang et al., 2015). Néanmoins, Pomié et al. ont démontré que bien que la fonction suppressive des T régulateurs $CD8^+CD28^{low}$ soit normale in vitro, ces Tregs issus de souris Aire KO sont incapables de contrôler le développement d'une colite expérimentale (Pomie et al., 2011).

	Peltonen's mice						Mathis's mice						Matsumoto's mice	Scott's mice
	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	NOD and BALB/c	C57BL/6J	BALB/cJ	NOD/LtJ	SJL/J	C57BL/6 (mixed background)	NOD/Shi.Jic
strain	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6J	BALB/cJ	NOD/LtJ	SJL/J	C57BL/6 (mixed background)	NOD/Shi.Jic
generation analysed	gen?	gen?	F6	gen?	F2	F6	F2/F3		> 8 gen	> 8 gen	> 8 gen	> 8 gen	gen?	F6 to F9
thymic epithelial cells							Increase twice							
thymus: morphology	no altered morphology, atrophy 42%		increase B cells	contracted medullary compartment										normal
thymic selection					negative selection defect of SP CD4 and CD8 T cells	positive selection defect							normal	not altered morphology
T/B cells	normal distribution excepted in LN twice, alteration of TCR repertoire V18, V19 & V20						Increased activation/memory markers on CD4 T cells						normal number of B220, CD3, CD4, Foxp3 and CD8 cells in the spleen, no difference markers (CD25, CD62L, CD69) unchanged on CD4 T cells but CD44 is increased	normal T reg, altered activation/memory markers, few alteration of the repertoire
Autoantibodies (% of affected)	liver (20%), testis (54%), pancreas (47%), adrenal (20%)	normal capacity to proliferate							pancreas (0%), eyes (64%), SG (10%), stomach (0%), ovary (16%)	pancreas (0%), eyes (33%), SG (0%), stomach (100%), ovary (0%)	pancreas (100%), eyes (100%), SG (100%), stomach (67%), ovary (33%)		pancreas (100%), stomach (100%), kidney (100%), liver (100%)	testis (50%), lung (75%), SG (100%), liver (75%), eyes (75%), pancreas (100%)
sara test		negative against: 2-OH-Tp17-OH, TPst, P450scd, AADC, Gad65, IA2, Cyp1a2, ANA						auto-Abs against mucin 6					auto-Abs against a-fodrin	negative against: Gad65, Cyp1a2, Insulin, Alp4a, endolase I, II, III, Hsp90, anti-type I IFN
histology: infiltration (% of affected)	liver (60%), pancreas (0%), thyroid (0%), no adrenal gland		pancreas, lung, adrenal, thyroid, and ovary, with the highest frequency observed in the liver and lung				thyroid (35%), adrenal (65%), stomach (35%), ovary (77%), pancreas (65%)		eyes (67%), stomach (9%), SG (100%), lung (36%), prostate (100%), liver (0%), ovary (0%), pancreas (0%), thyroid (0%)	eyes (80%), stomach (100%), SG (20%), lung (40%), liver (40%), prostate (100%), ovary (100%), pancreas (100%), thyroid (0%)	eyes (93%), stomach (87%), SG (100%), lung (100%), liver (86%), prostate (100%), ovary (88%), pancreas (100%), thyroid (54%)	eyes (0%), stomach (100%), SG (100%), lung (100%), liver (83%), prostate (100%), ovary (50%), pancreas (81%), thyroid (71%), thyroid (0%)	SG (100%), lacrimal gland (100%), stomach (100%), pancreas (10%), thyroid (0%), heart (0%), lung (0%), kidney (0%), pancreas (0%), small intestine (0%), testis (0%), ovary (0%)	eyes (80%), parotid gland (80%), sublingual gland (40%), pancreas (0%), epineurium (0%), stomach (0%), kidney (0%), epididymus (0%), thyroid (0%), SG, thyroid, prostate
fertility problem	yes (65%) same ratio for male and female												yes, both male and female Aire-/- mice are fertile when crossed with wild type mice, no vigorous crossing produced offspring any occasionally	yes, only males are sterile
Spontaneous candidiasis														
Susceptibility to candidiasis														no
Reference	Ramsey et al, Hum. Mol. Genet. 2002	Pontynen et al, J. Autoimmun. 2006	Hassler et al, Blood 2007	Gillard et al, J Immunol. 2007	Liston et al, Nat. Immunol. 2003	Li et al, PNAS 2007	Anderson et al, Science 2002	Gavarruescu et al, PNAS 2007		Jiang et al, J. Exp. Med. 2005			Kuroda et al, J. Immunol. 2005	Niki et al, J. Clin. Invest. 2006

Figure 13 *Tableau comparatif des différentes souches de souris Aire^{-/-}, (Hubert et al. 2009). Dans ce tableau, les colonnes représentent les souches de souris utilisées par différentes équipes et les lignes, les données étudiées.*

III-Rôle de Aire

1. Dans la tolérance centrale

1.1. Activité transcriptionnelle

L'analyse transcriptionnelle des mTECs isolées de souris WT et Aire KO a révélé que Aire contrôle l'expression des TSA exprimés de manière ectopique dans le thymus (Figure 15) (Anderson, 2002; Derbinski et al., 2001). Néanmoins, plusieurs aspects au niveau de la structure de Aire ainsi que le profil d'expression des gènes dont il permet la transcription ont conduits à l'hypothèse qu'il ne s'agit pas d'un facteur de transcription classique. Premièrement, des études bio-informatiques sur l'impact transcriptionnel de Aire dans les mTECs révèle que Aire influence l'expression non pas de centaines mais de plusieurs milliers de gènes, or il est peu probable qu'il existe une séquence consensus sur laquelle Aire peut se lier (Derbinski et al., 2001, 2005; Villaseñor et al., 2008). Cette analyse montre donc que Aire a un impact 5 à 8 fois plus important que d'autres facteurs de transcription classiques comme FoxP3 ou Runx. De manière intéressante, les gènes de TSA transcrits dans les mTECs ne vont pas nécessiter la présence du facteur de transcription utilisé pour transcrire ce gène en périphérie. De plus, le site d'initiation de la transcription peut être différent de celui utilisé en périphérie. Par exemple, l'initiation de la transcription du gène de l'insuline peut commencer 30,9 kb en amont de son site « classique » dans les cellules beta du pancréas (Villaseñor et al., 2008).

Aire est composé de quatre domaines majeurs, un domaine de recrutement de caspase (CARD), un domaine SAND (Sp100, Aire1, Nup41/p75 et Deaf1), un domaine PHD1 (plant homeodomain 1) et PHD2 (Mathis and Benoist, 2009). Le domaine CARD est connu pour son rôle dans le recrutement et l'activation des caspases. Il va jouer un rôle dans l'homodimérisation de Aire via des interactions homotypiques. Ces interactions permettent d'orienter les protéines ainsi que d'activer des protéines effectrice permettant cette dimérisation (Ferguson et al., 2008). Le domaine PHD1 joue un rôle important dans la liaison aux histones H3 non-méthylées en lysine-4 (H3K4m0), caractéristique de la chromatine condensée qui sont associés à des zones où la transcription est réprimée (Chakravarty et al., 2009; Org et al., 2008). La reconnaissance de ces zones va diriger Aire

vers ses sites de transcription mais ce n'est pas le seul mécanisme qui va permettre la transcription de TSAs. En effet, la mutation de la protéine Aire l'empêchant de se lier à ces histones va grandement diminuer la synthèse de TSA Aire-dépendant mais pas la supprimer (Koh et al., 2010). Le domaine PHD2 va servir de site de fixation pour des complexes protéiques pouvant être impliqués dans la levée du blocage de la polymérase et ainsi permettre la transcription (Yang et al., 2013). Le rôle du domaine SAND va consister à se lier à des partenaires protéiques de Aire en effet ce domaine ne contient pas le domaine permettant de se fixer à l'ADN. L'analyse des domaines de Aire montre donc que cette protéine va induire la transcription d'une manière particulière.

L'activité transcriptionnelle de Aire va consister en la transcription des TSAs. Les mécanismes d'actions de Aire ne sont pas totalement élucidés néanmoins plusieurs études ont révélé une partie des mécanismes impliqués (Derbinski et al., 2005). L'interaction de Aire avec l'ADN se fait par l'intermédiaire du domaine PHD1, l'un des mécanismes qui va permettre la transcription des TSAs est la levée du blocage de la polymérase II. Ce mécanisme est décrit pour des gènes peu exprimés ou ayant besoin d'une réponse rapide à un stimulus (Muse et al., 2007). Dans ce cas, l'initiation de la transcription a bien lieu, mais l'ARN polymérase s'arrête après avoir transcrit une cinquantaine de pb. Cet arrêt a lieu suite à l'action de facteurs de régulation négatifs de la transcription comme le facteur négatif de l'élongation (NELF) ou DSIF (DRB Sensitivity-Inducing Factor). C'est une étude sur le génome de la drosophile qui a permis de mettre en évidence que des centaines de gènes sont régulés par ce mécanisme (Muse et al., 2007). Dans le cas de Aire, le modèle proposé est que Aire est attiré par les régions hypo-méthylées sur lesquelles il va se fixer via le domaine PHD1. Aire recrute ensuite le facteur positif de transcription et d'élongation b (P-TEFb) qui va phosphoryler DSIF ou NELF le transformant en activateur de la transcription et induisant une reprise de la transcription via le déblocage de L'ARN pol II. Ce modèle pourrait ainsi expliquer la capacité de Aire à induire l'expression d'un aussi large panel de gène (Giraud et al., 2012). Néanmoins ce modèle ne prend pas en compte l'ensemble des partenaires de Aire. Un autre modèle serait que les partenaires de Aire permettent la formation du complexe d'initiation de la transcription et que l'ensemble Aire + partenaires permettrait de faire de manière simultanée l'ensemble des mécanismes de la transcription qui sont l'initiation, élongation, terminaison et maturation.

Aire possède un grand nombre de partenaires lui permettant d'exercer ses fonctions (Figure 14). Nous allons décrire ici la fonction de quelques uns d'entre eux. Le premier partenaire

ayant été mis en évidence est le CBP (cyclic AMP response element-binding protein) (Pitkänen et al., 2000). Cette protéine est un coactivateur de transcription commun et il est retrouvé co-localisé avec Aire au sein du noyau (Pitkänen et al., 2005). L'importance de cette protéine est notamment montrée chez les patients APECED de Finlande portant la mutation R257X (la plus fréquente dans cette population). Cette mutation empêche la liaison entre Aire et CBP et conduit au développement de l'APECED. Une étude a montré que la fonction de Aire nécessite son acétylation et que c'est CBP qui va jouer ce rôle (Saare et al., 2012).

Un autre partenaire particulièrement important pour Aire est le facteur positif de transcription et d'élongation b (P-TEFb) (Figure 14). Ce facteur va phosphoryler plusieurs des partenaires de Aire. La phosphorylation de ces protéines va permettre de les « débloquer » et ainsi permettre la transcription des TSAs (Giraud et al., 2012). Des patients présentant une mutation dans la séquence de Aire empêchant la fixation de P-TEFb développent également l'APECED (Žumer et al., 2011).

L'expression ectopique des TSA dans les mTECs n'est pas sous un contrôle absolu de Aire. En effet, même en cas d'absence de Aire, de nombreux gènes de TSAs considérés comme dépendants de Aire restent exprimés bien qu'ils soient fortement diminués. A noter qu'il existe des exceptions comme le gène de l'insuline qui dans les mTECs Aire^{-/-} n'est pas du tout exprimé. Ces observations tendent à montrer que Aire n'est pas un facteur de transcription classique et que son activité est plus d'amplifier des programmes de transcription qui sont déjà en place plutôt que de dominer son propre programme de transcription.

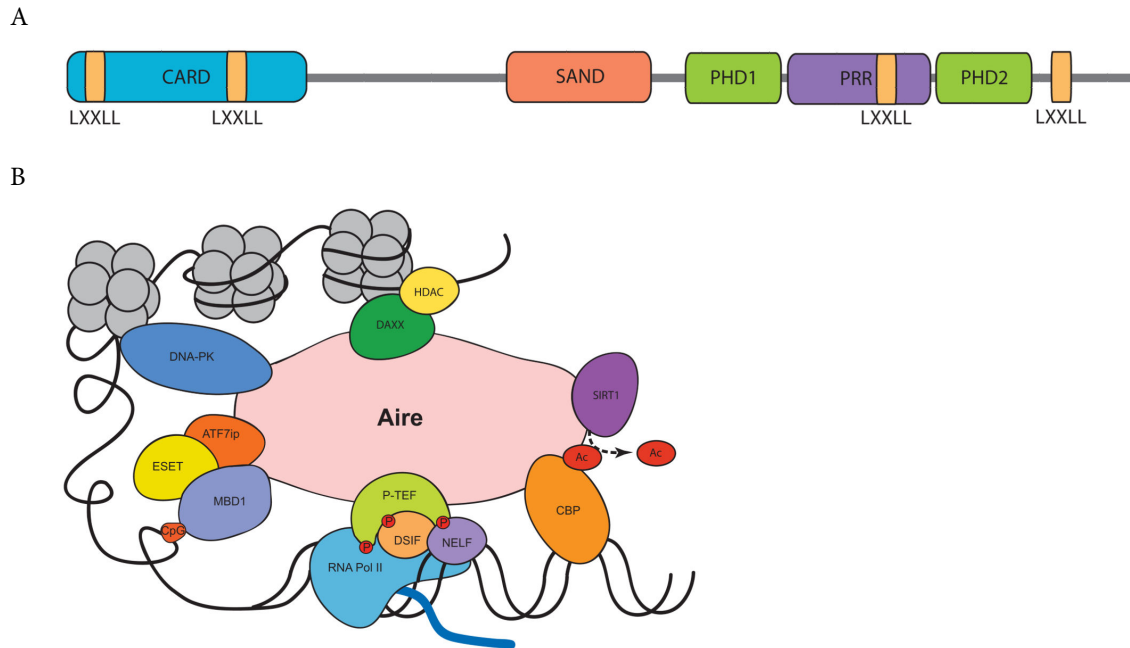


Figure 14 Représentation schématique des différents domaines de la protéine Aire et de ses partenaires. A. Les différents domaines fonctionnels de Aire, le domaine de recrutement de caspase (CARD), SAND, les deux domaine PHD, la région riche en proline (PRR) et les quatre motifs LXXLL. B. représentation schématique du complexe formé par Aire et ses partenaires. B. Vue d'ensemble des principaux partenaires de Aire. (Chan and Anderson, 2015).

1.2. Mise en évidence de la fonction de Aire

Le rôle de Aire dans la tolérance centrale et notamment dans la sélection négative a été montré pour la première fois dans un modèle de souris transgéniques pour un néoantigène (HEL sous le contrôle du promoteur de l'insuline) et possédant un TCR reconnaissant ce néoantigène (TCR transgénique 3A9, possédant une forte avidité pour HEL). Ces souris Aire^{+/+} ne génèrent pas de LT matures portant ce TCR tandis que les souris déficientes pour Aire les génèrent (Liston et al., 2003). Ces résultats ont également été observés dans le cas où le TCR transgénique reconnaît un auto-antigène (Taniguchi et al., 2012). Bien que le rôle des mTECs dans la sélection négative reste prédominant, des études récentes ont montré que les lymphocytes B du thymus, mais pas ceux de la périphérie, peuvent exprimer Aire et pourraient donc également participer à la sélection des lymphocytes T (Yamano et al., 2015a). Ces cellules B exprimant Aire expriment également plus fortement le CMH II ainsi que CD80. De plus, Yamano et al. ont démontré un cross talk entre les B Aire⁺ du thymus et les T semblable à l'interaction retrouvée dans les centres germinatifs.

Ce qui dans le contexte autoréactif du thymus permettrait de maintenir ce pool de lymphocytes B exprimant Aire.

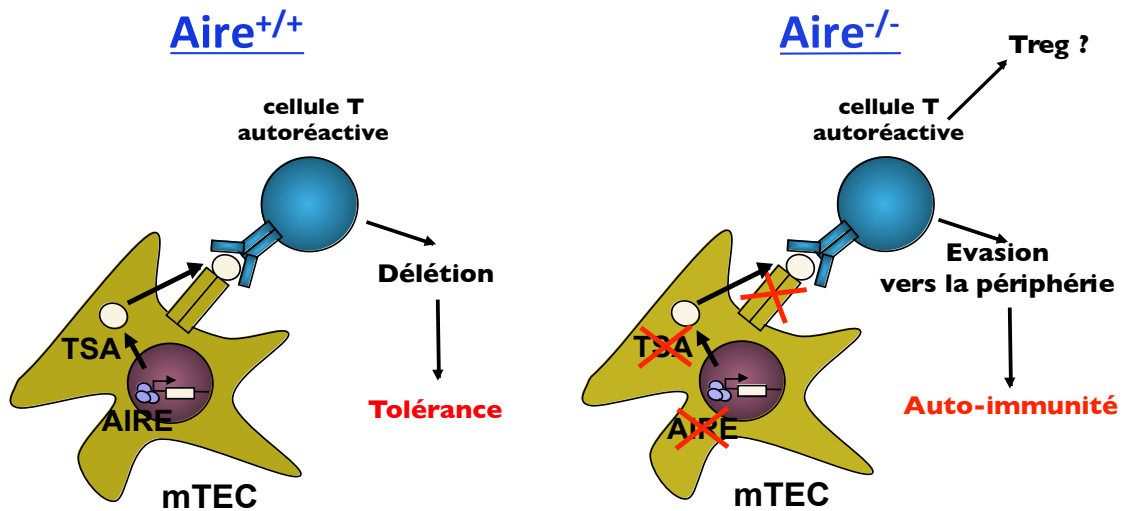


Figure 15 Rôle du régulateur Aire dans les mTECs et conséquence de sa déficience.
Mode d'action de Aire dans des conditions physiologiques (à gauche) et conséquences d'une mutation de Aire (à droite).

2. Dans la tolérance périphérique

Comme décrit précédemment, Aire joue un rôle dans le thymus en permettant l'expression d'antigènes spécifiques de tissus et donc la sélection des lymphocytes T « conventionnels ». Qu'en est-il de son rôle dans la sélection des lymphocytes T régulateurs ? La question du développement des nTregs CD4 et l'impact de Aire sur leur sélection a été largement adressée. Chez la souris, il a été montré que le pourcentage de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ des animaux Aire^{-/-} ne diffère pas de celui des animaux Aire^{+/+} dans la rate et les ganglions mais est diminué d'un facteur 2 dans le thymus (Aricha et al., 2011; Lei et al., 2011). Egalement, le niveau d'expression de FoxP3 ne diffère pas entre ces animaux (Anderson et al., 2005; Kuroda et al., 2005). Chez les patients APECED, bien que le pourcentage de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ ne soit pas altéré, le niveau d'expression de FoxP3 lui est diminué (Laakso et al., 2010). Un groupe a également montré que la fonction suppressive des Tregs en culture *in vitro* était diminuée chez les patients APECED (Arstila Talvensaari et al., 2007). Les premières preuves expérimentales montrant que les mTECs

exprimant Aire peuvent contrôler la génération des Tregs ont été réalisées dans un modèle de souris transgéniques exprimant l'hémagglutinine (HA) croisées avec des souris exprimant l'hémagglutinine sous le contrôle du promoteur de Aire (Aschenbrenner et al., 2007). Dans ce modèle, environ 24% des $\text{TCD4}^+\text{TCR-HA}^+$ expriment FoxP3 alors que cette quantité est négligeable dans les souris n'exprimant pas HA sous le contrôle de Aire. Par la suite, ces résultats furent confirmés pour un antigène endogène pour lequel les Tregs spécifiques ne se développaient pas chez les animaux Aire KO (Malchow et al., 2013). Etant donné le rôle de Aire sur la sélection des Tregs, des études ont été menées sur le répertoire TCR dans un modèle de répertoire restreint chez des souris exprimant uniquement la chaîne V β 14-J β 2.6. Cette étude ne montre pas de rôle de Aire sur ce répertoire restreint (Daniely et al., 2010). Une autre étude (Perry et al., 2014) a montré que Aire joue un rôle sur la sélection des Tregs et notamment sur les TCRs très peu représentés. Enfin, il a récemment été démontré que Aire joue un rôle majeur dans la génération de Tregs durant la période périnatale. En effet, il a été montré qu'une population de Treg $\text{CD4}^+\text{FoxP3}^+$ est générée chez la souris WT. Cette population est maintenue chez la souris adulte. Les souris NOD Aire^{-/-} ne génèrent pas cette population et développent des symptômes d'auto-immunité alors que le KO conditionnel pour Aire déclenché à 35 jours n'induit pas le développement de l'auto-immunité comme chez les souris NOD-Aire KO (Yang et al., 2015). Ces Tregs montrent une activité suppressive plus importante et l'expression de Aire durant cette période périnatale est donc suffisante pour permettre la génération de ces Tregs et ainsi un contrôle du développement de la maladie (Yang et al., 2015). Les mécanismes de génération de ces Tregs, ainsi que le rôle de Aire sur la génération et la mise en place du répertoire TCR restent aujourd'hui une question majeure à comprendre et qui a notamment été étudiée pour les Tregs $\text{CD8}^+\text{CD28}^-$ (Pomie et al., 2011).

L'expression de Aire a également été montrée à l'extérieur du thymus dans les organes lymphoïdes secondaire (Kogawa et al., 2002b). L'expression de *aire* en périphérie chez la souris à tout d'abord été montrée uniquement au niveau du transcrit dans une population de cellules stromales des ganglions (Lee et al., 2007). Cette population de cellules est capable d'exprimer certains TSAs et est capable d'induire la délétion de TCD8^+ . Néanmoins, l'expression de la protéine n'a pas pu être démontrée par cytométrie en flux en utilisant la même technique de marquage que celle permettant de révéler la protéine dans le thymus. De plus, l'expression du messager de Aire en périphérie a été mise en évidence par des

techniques extrêmement sensibles et le niveau d'expression est 10 fois moins important que celui retrouvé dans les mTECs. Une autre étude a mis en évidence des cellules exprimant Aire à l'extérieur du thymus (eTACs). Dans cette étude l'expression de la protéine a été observée par l'intermédiaire de la GFP sous contrôle du promoteur de Aire (Gardner et al., 2008). Le profil d'expression des TSA dans ces cellules n'est impacté que de manière minime et semble assez différent de celui observé dans les mTECs. Néanmoins, ces cellules sont capables d'induire l'anergie de T CD4⁺ en périphérie. Dans cette étude, Gardner et al. ont décrit 2 types cellulaires exprimant Aire en périphérie. La première avec l'expression la plus forte de la GFP (EpCam⁺ UEA1⁻ gp38⁻ CD80⁻ CD86⁻) et un type de DC CD11c⁺ avec une faible expression de GFP. Bien que cette découverte ait engendré un grand nombre de suppositions sur un rôle de Aire dans la tolérance périphérique, il n'y a aucune preuve que ce mécanisme soit d'une réelle importance. En effet, des expériences de chimérisme par greffe de thymus ont montré que les symptômes chez la souris Aire KO se développent de manière indépendante des cellules périphériques (Liston et al., 2003).

C. La technologie des ZFNs

Les protéines en doigt de zinc (Zinc Finger Protein, ZFP) ont été découvertes suite aux travaux de Robert Roeder et Donald Brown sur le facteur de transcription TFIIIA (Sakonju et al., 1981). Cette structure protéique particulière est rencontrée dans de nombreux facteurs de transcription. Ces protéines se caractérisent par des domaines dits en « doigt de zinc ». Un atome de zinc central stabilise le repliement de la séquence polypeptidique en établissant quatre liaisons avec deux résidus cystéine et deux résidus histidine, formant ainsi une sorte de pince. La séquence peptidique est d'une longueur de 30 à 50 acides aminés. Elle se replie d'une part en un feuillet β antiparallèle contenant une boucle et exposant 2 résidus cystéine et d'autre part en une hélice α exposant 2 résidus histidine. Ces deux structures secondaires sont maintenues en doigt de zinc par la liaison avec l'ion Zn. Afin de réaliser des ZFN, le domaine de reconnaissance a été couplé au domaine endonucléasique de l'enzyme de restriction FokI. Ce domaine de clivage est indépendant de son site de fixation spécifique. Cette protéine hybride nous permet donc de cibler n'importe quelle séquence nucléotidique choisie. Les domaines endonucléasiques FokI agissent par paire, il est donc nécessaire qu'il y ait une dimérisation de la ZFN. L'ensemble des deux ZFN couvrira donc une séquence de vingt-quatre nucléotides, qui sera clivée au niveau des six nucléotides médians. Les conséquences de ce clivage peuvent être diverses.

La coupure du double brin entraînera l'activation des voies naturelles de réparation. Deux cas de figure se présentent. La réparation peut être du type jonction d'extrémité non-homologue (NHEJ) aboutissant à des délétions ou des insertions dites indels, généralement, de 1 paire de base à 10 pb, la réparation peut donc être imparfaite. La NHEJ peut ainsi être exploitée en vue d'effectuer des *Knock-out* ciblés, c'est-à-dire, rendre un gène non fonctionnel par modification de sa séquence (décalage du cadre de lecture). Le second cas de figure est la réparation par « recombinaison homologue ». Dans ce cas, la machinerie cellulaire utilise la chromatine soeur en tant que modèle pour resynthétiser la séquence altérée. Cela aboutit à une réparation parfaite. Cependant, il est possible d'apporter une autre séquence d'ADN donneur, avec la modification voulue, pour que celle-ci soit incluse par recombinaison homologue à la place du gène clivé. Il est nécessaire que les extrémités de ce fragment exogène soient identiques aux extrémités du gène clivé. Cette technique permet d'effectuer des intégrations ciblées de gènes, autrement dit des Knock-In (Carroll, 2008). Cette technique a déjà été utilisée dans plusieurs projets de générations de rats KO notamment par notre laboratoire (Geurts et al., 2009).

Objectifs de la thèse

Comme décrit en introduction, l'APECED reste aujourd'hui une maladie dont l'ensemble des mécanismes n'est pas élucidé. Ce manque de connaissance fait qu'aujourd'hui les traitements utilisés pour soigner les patients restent purement symptomatiques. Les modèles de déficience pour Aire chez la souris ont permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes de sélection des lymphocytes T ainsi que sur l'établissement de la tolérance. Parmi les différents modèles de souris Aire^{-/-} générés à l'heure actuelle, il semble important de faire une dichotomie entre les souris Aire^{-/-} générées dans le fond génétique NOD et les autres fonds génétiques. En effet, le modèle de déficience pour Aire chez la souris NOD conduit au développement d'une maladie bien plus importante que les autres fonds génétiques (Tableau 1). Ces souris NOD Aire^{-/-} présentent des lésions importantes notamment au niveau du pancreas. Des auto-anticorps spécifiques d'organes sont également présents de manière reproductible chez les animaux étudiés et ces souris présentent également une perte de poids comparé aux souris NOD WT littermate (Niki et al., 2006). Il a été suggéré que les souris NOD pourraient avoir un défaut au niveau de la génération des Tregs. En effet, des études sur le pourcentage de Tregs dans plusieurs fond génétique de souris révèle que dans la plupart des souches étudiées, le pourcentage de Tregs au sein des T CD4 est de 7 à 10% alors que chez la souris NOD il représente 5 à 6 % des T CD4 (Salomon et al., 2000). Néanmoins, ces résultats sont controversés et pour plusieurs auteurs, il est improbable que les symptômes observés chez la souris NOD Aire^{-/-} soit du à ces observations.

	Human	Mouse	
		NOD	Others
Locus similarity		80% to human	80% to human
Clinical symptoms	++++	++++	++
Triad: hypoparathyroidism, adrenal failure, and candidiasis susceptibility	Yes	No	No
Infertility	Women	Fertile crossed with WT mice, homozygous crossing produced offspring only occasionally	
Organs affected			
Auto-reactive T cells	Yes	Yes	Yes
Auto-antibodies (% of affected)	Yes	Liver (100%); Pancreas (100%); Kidney (100%); stomach (100%)	Background and individual dependant
Specific auto- antibodies	Positive against type II IFNs , Th17 cytokines, GAD1, GAD2, DDC, TGM4, GIF, HSD3B2, BPIFB1, TSGA10, CYP1A2, KCNRG, AQP2, FN ω , IFN α , IL-22, IL17F, IL17A, IFN β , IFN γ	Positive against mucin 6 and afodrin	Negative against: Gad65, Cyp1a, insuline, Atp4a, enolase I, II, III, Hsp90, 21-OH, 17- OH, TPH, P450scc, AADC, IA2, ANA
Expression of Aire in peripheral DCs	Yes	Controversial	

Tableau 1 : Tableau comparatif Homme / souris résumant les différences observées entre le syndrome humain et le phénotype des modèles de souris.

Notre analyse du locus de Aire chez le rat ainsi que le profil d'expression de la protéine présente une similitude plus importante entre l'Homme et le rat qu'entre l'Homme et la souris. Certaines analyses effectuées chez les patients APECED indiquent des différences

significatives entre la maladie humaine et les symptômes provoqués par la déficience pour Aire chez la souris. L'une des différences les plus importantes est le défaut de fonction des Tregs $CD4^+FoxP3^+$ des patients APECED qui semble être dû à une diminution du niveau d'expression de FoxP3 qui n'est observé dans aucun modèle de souris Aire^{-/-} (Anderson et al., 2005; Arstila Talvensaari et al., 2007; Liston et al., 2003). L'étude des populations de lymphocytes T régulateurs chez la souris Aire KO dans le fond génétique C57BL/6 montre l'importance de Aire pour la fonction des Tregs $CD8^+CD28^-$ (Pomie et al., 2011), néanmoins, ces souris ne présentent aucun défaut de fonction des Tregs $CD4^+FoxP3^+$ contrairement à cette même population chez les patients APECED. Chez les patients APECED, la fonction des Tregs $CD8^+$ n'a pas été étudiée. Notre hypothèse était que le rat, présentant de plus fortes similitudes immunologiques et génétiques au niveau du locus de Aire avec l'Homme que la souris, avait le potentiel d'être un modèle plus pertinent de déficience pour Aire. Notamment, le rat présente quelques similitudes importantes avec l'Homme que la souris ne partage pas. Par exemple, la présence de *Candida Albicans* de manière commensale (Samaranayake and Samaranayake, 2001). Notre hypothèse était donc que certains mécanismes d'action de Aire diffèrent entre l'Homme et la souris. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré le modèle de rats Aire^{-/-} et avons analysé plusieurs paramètres dans deux fonds génétiques : Brown Norway et Sprague Dawley. Ces résultats sont présentés dans l'article 1 : Breakdown of immune tolerance in Aire-déficient rats induces a severe APECED-like auto-immune disease. Nous avons également choisi le modèle rat du fait que notre laboratoire a développé depuis de nombreuses années une expertise dans l'étude des populations de Tregs chez le rat. Nous avons notamment développé des stratégies thérapeutiques impliquant les Tregs dans des modèles de transplantation chez le rat. Le modèle de rat Aire^{-/-} nous permettrait de tester l'efficacité de certaines de ces stratégies dans des conditions d'auto-immunité de plus d'un point de vue fondamentale, ce modèle nous permettra d'étudier le rôle de Aire dans la génération des nTregs $CD8^+CD45RC^{low}$.

La caractérisation du modèle de déficience pour Aire était le premier objectif de cette thèse. Ces résultats ont permis de confirmer en partie notre hypothèse. Nous avons certes observé un phénotype plus proche de celui des patients APECED mais il reste néanmoins plusieurs symptômes caractéristiques qui sont absents dans ce modèle rat.

Ce modèle étant établi et caractérisé, nous avons pu nous intéresser à nos autres objectifs qui étaient:

-de comprendre le rôle de Aire sur les Tregs $CD4^{+}FoxP3^{+}$ et $CD8^{+}CD45RC^{low}$. Aire joue-t-il un rôle sur leur sélection dans le thymus, ou en périphérie ? Est-ce-que la déficience pour Aire chez le rat induit un biais du répertoire TCR des Tregs ? La fonction des Tregs est-elle impactée en absence de Aire ?

-de comprendre l'impact de la déficience de Aire sur l'alloréactivité. Quel est l'impact d'un biais vers un répertoire auto-réactif dans les réponses allogéniques notamment dans le cas de la greffe ?

-étudier le potentiel thérapeutique d'un nouveau traitement immunosuppresseur dans cette maladie

Résultats

A. Description du modèle

I-Article 1 : Breakdown of immune tolerance in Aire-deficient rats induces a severe APECED-like auto-immune disease

Après avoir vérifié que l'expression de Aire était semblable entre l'Homme et le rat, nous avons développé un modèle de déficience pour Aire chez le rat Brown Norway. Pour cela nous avons utilisé la technologie des nucléases à doigt de zinc (ZFN) afin d'induire une délétion de 17pb dans l'exon 3 mimant l'une des mutations communes retrouvées chez les patients APECED (R139X) et décalant le cadre de lecture conduisant à un codon stop prématuré. Etant donné l'importante variabilité des symptômes observés en fonction du fond génétique chez les souris Aire^{-/-}, nous avons croisé les rats Brown Norway avec des rats Sprague Dawley. La descendance de ce croisement a été reproduite avec des rats Sprague Dawley WT (non congéniques) et ce sur 8 générations afin d'obtenir des rats Aire^{-/-} sur le fond génétique SPD. Par la suite nous avons également croisé selon le même principe ces animaux dans le fond génétique Lewis 1A (*nous sommes actuellement à la troisième génération de ces croisements*. Résultats non-montrés dans cet article). Nous avons étudié les manifestations cliniques traduisant l'auto-immunité dans ces 2 fonds génétiques. Nous avons également réalisé une étude histologique en collaboration avec une anatomopathologiste du CHU de Nantes. Nous avons également étudié la fréquence ainsi que le nombre absolu des populations cellulaires dans différents organes. Nous avons prélevé le serum des animaux KO ainsi que des WT littermate et avons mis en évidence de nombreux auto-anticorps circulant dirigés contre les organes ainsi que contre des cytokines. La réponse T primaire ainsi que les réponses T et B secondaires ont été étudiées dans un modèle d'immunisation au KLH. L'ensemble de ces résultats de caractérisation du modèle est décrit en détail dans l'article 1 : Breakdown of immune tolerance in Aire-deficient rats induces a severe APECED-like auto-immune disease (actuellement en révision dans *The Journal of Immunology*).

1 **Breakdown of immune tolerance in AIRE-deficient rats induces a**
2 **severe APECED-like auto-immune disease**

3

4 Jason Ossart^{1,2}, Anne Moreau³, Elodie Autrusseau^{1,2}, Séverine Ménoret^{1,2,4}, Jérôme Martin^{1,2},
5 Marine Besnard^{1,2}, Laure-Hélène Ouisse^{1,2,4}, Laurent Tesson^{1,2,4}, Léa Flippe^{1,2}, Kai Kisand⁵,
6 Pärt Peterson⁵, François-Xavier Hubert^{1,2}, Ignacio Anegón^{1,2,4}, Régis Josien^{1,2,6} and Carole
7 Guillonneau^{1,2}

8

9 ¹Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR 1064, INSERM, Université
10 de Nantes, Nantes, France

11 ²Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), CHU Nantes, Nantes, France

12 ³Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Nantes, Nantes, France

13 ⁴Transgenesis Rat ImmunoPhenomic platform, INSERM 1064 and SFR Francois Bonamy,
14 CNRS UMS3556, Nantes, France.

15 ⁵Molecular Pathology, Institute of Biomedicine and Translational Medicine, University of
16 Tartu, Ravila 19, Tartu 50411, Estonia

17 ⁶Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes, Nantes, France

18

19 Address correspondence: Dr. Carole Guillonneau, INSERM UMR1064 – Center for Research
20 in Transplantation and Immunology-ITUN, 30 Bd Jean Monnet, 44093, NANTES Cedex 01,

21 France: (+33) 2 40 08 74 10, Fax: (+33) 2 40 08 74 11. E-mail address:

22 carole.guillonneau@univ-nantes.fr

23

24 Keywords: Aire, APECED, knockout rats, ZFNs, immunodeficiency

25 Running title: AIRE-deficiency in rat induces autoimmune APECED disease

26

27 **ABSTRACT**

28 AIRE-deficiency in human induces a life-threatening generalized autoimmune disease called
29 APECED and no curative treatments are available. Several models of AIRE-deficient mice
30 have been generated and although they have been useful in understanding the role of AIRE in
31 central tolerance, they do not reproduce accurately the APECED symptoms and thus there is
32 still a need for an animal model displaying APECED-like disease. We assessed here the
33 potential of the rat as an accurate model for APECED. We demonstrate here that in rat, AIRE
34 is expressed by MHCII⁺ and MHCII⁻ mTECs in thymus, and CD4^{int} conventional DCs in
35 periphery. We generated the first AIRE-deficient rat model using zinc finger nucleases and
36 demonstrated that they display most of the key symptoms of APECED disease independently
37 of the genetic background including alopecia, skin depigmentation and nail-dystrophy. We
38 observed severe autoimmune lesions in a large spectrum of organs, in particular in the
39 pancreas, and identified several auto-antibodies to organs and cytokines such as type I IFNs at
40 levels similar to APECED. Finally, we demonstrated a biased antibody response to IgG1, IgM
41 and IgA isotypes and an altered primary T cell response to self and non-self, but not
42 secondary response. Altogether, we demonstrate that AIRE-deficient rat is a relevant
43 APECED animal model opening new opportunity to test curative therapeutic treatments.

44

45 INTRODUCTION

46 Breakdown of self tolerance leads to a dysfunction of the immune system and is the
47 cause of development of autoimmune diseases that have serious, disabling and even fatal
48 consequences. In contrast, an increase of the mechanisms of immune tolerance to non-self
49 would also be beneficial in the context of organ and bone marrow transplantation, allergy and
50 gene therapy. Thus, a better knowledge of immunological mechanisms involved in tolerance
51 represents a major challenge to improve both the understanding and treatment of autoimmune
52 diseases. A key player in this equilibrium is the autoimmune regulator (AIRE), a transcription
53 regulator that allows the expression of tissue restricted antigens (TRA) in medullary thymic
54 epithelial cells (mTECs) (1, 2) and auto-reactive T cells deletion. The autoimmune
55 polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) syndrome also known as
56 auto-immune polyglandular syndrome type I (APS 1) is a rare multi-organ autosomal
57 recessive auto-immune disease caused by mutations in the *AIRE* gene (3). In human, this gene
58 is located on locus 21q22.3 (4, 5) and more than 100 mutations have been described to cause
59 APECED with a prevalence of 1-9: 1,000,000 (Orphanet, <http://www.orpha.net>), however,
60 increased in certain populations such as Finnish, Norwegian, Sardinian and Iranian Jews due
61 to consanguinity or founder effects (6-8). Among Sardinians, the over representation of the
62 R139X mutation is observed, present for instance in 90% of Sardinian APECED patients (8).
63 The clinical phenotype of APECED is usually defined by the presence of 2 of the 3 major
64 symptoms: hypoparathyroidism, adrenal insufficiency (Addison's disease) and chronic
65 muco-cutaneous candidiasis (CMC) (7). This disease is also associated with anti-cytokine
66 antibodies (present in all patients and particularly directed to IFN alpha and omega) and
67 multiple autoimmune and ectodermal features such as type 1 diabetes, enamel hypoplasia,
68 vitiligo, premature ovarian failure, keratitis, pernicious anemia, alopecia, exocrine
69 pancreatitis, interstitial lung disease and nephritis and others (7, 9-13).

70 Since the identification of the link between APECED and AIRE (4, 14), several mouse
71 models of AIRE-deficiency have been developed (15). These models have been important in
72 the characterization of the role of AIRE in thymic negative selection of T lymphocytes and
73 Treg differentiation. The first *Aire*^{-/-} mice showed a slight lymphocyte infiltration in the liver
74 of some animals, and few animals displayed circulating auto-antibodies (16). Other AIRE-
75 deficient mice displayed more features of APECED especially the NOD strain mice (1, 17).
76 However, different studies have evidenced that the disruption of *Aire* in mice with different
77 genetic backgrounds lead to a surprisingly mild, background-dependent, auto-immune
78 phenotype that do not properly reproduce and is considerably less severe than the APECED
79 disease in human (15). To date there is a crucial lack of an adequate animal model to study the
80 APECED disease and assess the therapeutic potential of therapies and applicability in
81 patients. To solve this issue, we have generated the first rat model of AIRE-deficiency in
82 using the zinc-finger nucleases (ZFN) technology in order to induce a 17 bp deletion in the
83 exon 3 that emulate the common major human mutation R139X, thus generating the first
84 animal model for a common mutation that has never been examined before. Here, we show in
85 the rat predominant AIRE expression in the thymus by CD45⁺ cells and in the periphery by
86 CD4^{int} conventional dendritic cells (cDCs), a pattern similar to that reported in humans. We
87 demonstrate that two strains of *Aire*^{-/-} rats developed strong auto-immune symptoms
88 characteristic of APECED such as alopecia and vitiligo, numerous circulating autoantibodies,
89 important leukocyte infiltrates of several organs and impaired thymus development. We also
90 observed a biased immunoglobulin (Ig) isotype production, changes in several immune cell
91 subsets, increase in cytokines and an altered T cell primary response. Altogether, these results
92 demonstrate the *Aire*^{-/-} rats present the features of human APECED and will improve our
93 understanding of the disease and of the mechanisms of action of AIRE.

94

95 **RESULTS**

96 **AIRE is expressed by CD45⁺MHCII⁺ mTECs in the thymus and CD4^{int} cDCs in**
97 **mesenteric lymph nodes in wild type rats**

98 We first assessed AIRE expression by flow cytometry in the thymus, quantitative RT-PCR in
99 various organs and tissues, as well as immunofluorescence and confocal microscopy in the
100 thymus and mesenteric LNs (MLNs). For detection of the AIRE protein, we used a cross-
101 reactive anti-mouse AIRE monoclonal antibody (Mab). In the thymus, AIRE was expressed
102 by flow cytometry in a small subset CD45⁺MHC-II⁺ cells (**Fig. 1A**). This is in line with
103 intermediate/mature medullary area TECs (mTECs)-specific expression of AIRE. We also
104 observed some AIRE⁺ cells in the CD45⁺MHC-II⁻ cells (**Fig. 1A**), possibly corresponding to
105 terminally differentiated mTECs (18). Quantitative RT-PCR analysis in lymphoid and non-
106 lymphoid tissues demonstrated a high *Aire* mRNA expression in the thymus and lower levels
107 of expression in spleen, axillary and MLNs, caecum, colon, testis and ovary (**Fig. 1B**). In
108 MLNs, the decreased *Aire* mRNA expression after the DCs depletion supported the
109 hypothesis that AIRE is expressed preferentially by DCs in these tissues (**Fig. 1C**). This was
110 confirmed by measurement of *Aire* mRNA level in cell subsets sorted from the MLNs. In rat
111 MLNs, cDCs subsets can be distinguished according to their differential expression level of
112 CD4 (19, 20). We also sorted B cells, T cells and epithelial cells (EpCAM⁺) (**Fig. 1D**). We
113 observed that *Aire* mRNA was mostly expressed by CD4^{int} cDCs, and to a lesser extent by
114 CD4⁻ and CD4⁺ cDCs and epithelial cells in MLNs (**Fig. 1D**). Immunostaining on thymus and
115 MLNs of AIRE protein expression in combination with MHC-II and EpCAM demonstrated a
116 specific nuclear dot pattern in the mTECs and co-expression with MHC-II⁺ and EpCAM⁺
117 cells, confirming the pattern of expression of AIRE observed at the transcriptional level (**Fig.**
118 **1E**). In addition, we observed that there was less expression of AIRE in the MLNs compared
119 to the thymus as demonstrated by the number of spots for a single cell and less AIRE⁺ cells.

120 Thus, we conclude that, in the rat, AIRE is expressed in mTECS as well as as in a subset of
121 lymph node CD4^{int} cDCs.

122

123 **Induction of ZFNs exon 3-targeted double-strand breaks in *Aire* gene from rats results**
124 **in AIRE-deficiency and strong visible autoimmune and ectodermal manifestations.**

125 To date, AIRE-deficiency has been induced only in mouse strains showing a mild auto-
126 immune phenotype (15). We observed notable similarities in the organization and layout of
127 the *Aire* locus between humans and rats, while mouse *Aire* locus overlaps another gene (**Fig.**
128 **2A**). In humans and rats, the *Aire* promoter is not inserted into another gene in contrast to
129 mice. To generate AIRE-deficient Brown Norway (BN) rats, we used zinc finger nucleases
130 (ZFNs) to cause a double-stranded DNA cut generating deletions through non-homologous
131 end joining (NHEJ) as we had already done in the past (21-23). We targeted the exon 3 to
132 induce a 17 bp deletion in the nuclear localization signal (NLS) sequence causing a premature
133 stop codon that mimic the most common mutation in Sardinian APECED patients R139X
134 (24) (**Fig. 2B**). 279 zygotes were microinjected, 93.43% were transferred, 11.1% were born
135 and 13.6% showed mutations, 1 of them generated a shift in the reading coding frame with the
136 introduction of a premature stop codon. This founder animal was mated with a wild type
137 animal; the mutation was transmitted to the progeny and homozygous *Aire*^{-/-} were generated.
138 The mutation in the genotype of each mutated rat was confirmed by comparing the wild-type
139 littermates with heteroduplex mobility assay on an automated microfluidic chip capillary
140 electrophoresis system (25)(**Fig. 2C**), as well as by sequencing (**data not shown**). The
141 absence of expression of the AIRE protein was further confirmed in the thymus of AIRE-
142 deficient rats (**Fig. 2D, compared to Fig. 1A**). To determine genetic background-dependence
143 of features observed in the *Aire*^{-/-} BN rats, we backcrossed these animals with the Sprague
144 Dawley (SPD) strain for more than 6 generations.

145 Breeding of *Aire*^{+/-} males with *Aire*^{+/-} females led to a normal gender and genotype litter
146 distribution of the progeny (**Table 1A**). We obtained no litter by breeding homozygous *Aire*^{-/-}
147 males with *Aire*^{-/-} females in the BN background. The growth and weight of the rats was not
148 affected by AIRE-deficiency at least during the first 20 weeks compared to their wild type
149 littermate under normal conditions (**Fig. 3A**). However, in stressful condition (i.e.
150 administration of an irrelevant antibody intraperitoneally twice per week), we observe weight
151 loss by week 10 (unpublished data).
152 Altogether, we show that ZFN efficiently disrupted the *Aire* gene leading to the absence of the
153 AIRE protein expression.

154

155 **AIRE-deficiency resulted in strong visible autoimmune and ectodermal manifestations,**
156 **severe histological abnormalities and marked organ infiltration, but slight phenotypic**
157 **modification of cell subsets.**

158 We observed that 100% of AIRE-deficient BN and SPD rats spontaneously developed
159 alopecia and skin depigmentation observable from the age of 6 months compared to their wt
160 littermate (**Fig 3B and C, left**), as well as nail-dystrophy (**Fig 3B and C, right**), symptoms
161 that correlate with a severe auto-immune disease and that are clinical manifestations regularly
162 found in APECED patients. In addition, the presence of these symptoms was independent of
163 the rat strain genetic background, indicating its correlation with the mutation in rat *Aire* gene
164 locus.

165 Measurements of various proteins and enzymes in the blood revealed a slight increase in
166 alkaline phosphatase enzyme and a significant decrease in creatinine levels in *Aire*^{-/-} rats
167 compared to wt (**Fig. 3C**), that could suggest kidney dysfunction or liver disease.

168 To confirm the autoimmune lesions in AIRE-deficient rats, we analyzed various organs and
169 tissues including thymus, pancreas, skin, liver, lung, salivary gland, testis, ovary, thyroid,

170 spleen, lymph nodes, Peyer's patches, stomach, duodenum, ileum, colon, kidney and eye (**Fig.**
 171 **4, Suppl. Fig. 1 and Table 1B**). Among the most striking organ lesions, we observed
 172 complete macroscopic disappearance of the thymus in 73% of old (>12 months) *Aire*^{-/-} rats vs.
 173 33% of old *Aire*^{+/+} rats. In those 27% of *Aire*^{-/-} rats with detectable thymus, the tissue
 174 appeared to have a normal thymic cortico-medullary structure (**Fig. 4**). We also observed
 175 severe lesions in the exocrine pancreas with a decrease in acini and pancreatic fat
 176 accumulation, intra-lobular focal lymphoid infiltration and hyperplasia of Langerhans islets.
 177 We further found rare and fragmented hair follicles associated sometimes to a minimal peri-
 178 and intra-annexial lymphoid infiltrates in skin, a portal lymphoid and plasma cell infiltrate
 179 and piecemeal necrosis in liver and a lymphoid infiltrate in the lung and kidney. Spleen
 180 displayed a follicular hyperplasia, whereas ovary in 27% of *Aire*^{-/-} rats displayed an increase
 181 in follicles and testis showed a discrete lymphoid infiltrate. We also found that the axillary
 182 lymph node (ALN) displayed a discrete but global hyperplasia. In the stomach, we observed a
 183 minimal deep lymphoid infiltrate. We observed no significant lesions in the Peyer's patches,
 184 duodenum, ileum, colon, salivary gland, thyroid or adrenal gland and in the eye. Finally, we
 185 observed that the number of organ with lesions increased over time with the highest incidence
 186 at >10 months (**data not shown**). Altogether, these data confirmed that *Aire*^{-/-} rats developed
 187 most of the histological lesions characteristic of APECED disease in human.
 188 We performed a flow cytometry analysis in the bone marrow, spleen, liver, blood, ALN and
 189 thymus to determine the percentages (**Fig. 5 and Suppl. Fig. 2**) and numbers (**data not**
 190 **shown**) of cell subsets in *Aire*^{-/-} and *Aire*^{+/+} rats. We observed a decrease percentage of NK
 191 cells in the spleen and NKT cells in the bone marrow and the spleen, but an increase of both
 192 subsets in the liver (**Fig. 5A**). The analysis of T cell subsets revealed no significant change but
 193 we saw a trend for an increased percentage of CD4⁺ T cells in the spleen and ALN, an
 194 increase in CD4⁺CD25⁺ T cells whereas the percentages of CD4⁺Foxp3⁺ Tregs in the bone

marrow were decreased (**Fig. 5B**). We also found a decrease of CD8⁺ T cells and CD8⁺CD45RC^{low} Tregs in the blood, a decrease of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs in the ALN and an increase in the bone marrow (**Fig. 5C**). B cells and B cell subsets were diminished in the liver, particularly the IgM^{int}IgD⁺ subset (**Fig. 5D**). We observed an increase in macrophages in the bone marrow, the blood and the thymus and an increase in granulocytes in the blood (**Fig. 5E**). Finally, we observed an increase in CD4⁺ cDCs in the thymus, an increase in CD4⁺ cDCs in the spleen and a decrease in pDCs in the spleen (**Fig. 5F**). Although limited, the data altogether indicate an impact of AIRE-deficiency on the distribution of rat immune cell subsets, with particularly strong effect on NK and NKT cells.

204

***Aire*^{-/-} rats display high level of circulating auto-antibodies targeting organs and cytokines to levels comparable to APECED disease**

We analyzed the expression of TSA in the thymus of *Aire*^{-/-} and *Aire*^{+/+} SPD rats by DGE-RNAseq analysis and focused on some of the TSAs whose expression has been shown to be altered in mice models (15, 26, 27) (**Table 2**). Results showed that in particular *Reg3b*, *Pyy*, *Nts*, *Tac3*, *Mt4*, *Crbp1*, *Gal*, *Sst*, *Ltf*, *Gip* were significantly down-regulated in *Aire*^{-/-} rats with *Reg3b*, a pancreas-associated protein, being the most down-regulated with a 8.21 fold reduction. Altogether, this demonstrates that, similarly to human and mice, some of the genes analyzed here were under the control of AIRE in the rat.

We investigated the organ-specific auto-antibody responses using >6 month old male and female *Aire*^{-/-} and *Aire*^{+/+} BN rat sera in western blotting and immunostaining with confocal microscopy on protein extracts and cryostat sections, respectively, from the tissues of *Rag1*^{-/-} rats, which express low levels of immunoglobulins (Ig) (28) (**Fig. 6 and Suppl. Fig. 3**). Autoantibodies against multiple organ targets were found in all *Aire*^{-/-} sera compared to *Aire*^{+/+} rat sera and this reactivity was particularly evident in liver, duodenum, salivary gland,

220 kidney and lung where several targets per organ were observed, however it did not correlate
 221 with immune infiltrate since for example multiple bands could be observed against the
 222 duodenum while minimal lesions and infiltrate were seen by histology (**Fig. 6A**). Confocal
 223 microscopy analysis of organ-specific antibodies present in the sera of *Aire*^{-/-} rats confirmed
 224 that several histological structures, in particular intestines, kidney, liver, MLN, testis, adrenal
 225 gland, thyroid and exocrine pancreas, were targeted by the auto-antibodies (**Fig. 6B and**
 226 **Suppl. Fig. 3**). In the liver, a major target in APECED patients, all the hepatocytes were
 227 targeted by the auto-antibodies. In the digestive tract (duodenum, colon and ileum),
 228 immunofluorescent labeling was localized in microvilli on the surface of the enterocytes.
 229 Renal tubular epithelial cells were significantly marked in the kidney. Langerhans islets did
 230 not appear to be affected by autoimmunity, however the pancreas is not spared since the
 231 cytoplasm of acini is targeted by autoantibodies which correlates with the previous
 232 histological observations revealing fatty involutions and a rarefaction of acini until the
 233 complete disappearance of the exocrine pancreas. The superficial cortex of the mesenteric
 234 lymph node was marked by autoantibodies. On the testis section, a specific marking of the
 235 interstitial support tissue was observed, suggesting that the Leydig cells responsible for the
 236 production of testosterone were targeted.
 237 To further determine the impact of AIRE-deficiency on antibody production, we measured Ig
 238 isotypes in the sera of *Aire*^{-/-} vs. *Aire*^{+/+} BN (**Fig. 7A**) and SPD (**Suppl. Fig. 4A**) rat strains.
 239 We observed an increase in IgG1, IgM and IgA antibody production while levels of other IgG
 240 isotypes remained unchanged in *Aire*^{-/-} vs. *Aire*^{+/+} BN or SPD rat strains (**Fig. 7A**), suggesting
 241 an abnormal B cell memory compartment and a defect in Ig class switching. The profiling of
 242 anti-cytokine antibodies by luciferase immunoprecipitation systems (LIPS) (29, 30) in both
 243 AIRE-deficient rat revealed a high level of antibodies when we studied a pool of multiple
 244 IFN α as antigens and separately to IFN α 4 and IFN α 11 subtypes, as well as increased anti-IL-

245 17a antibodies to the levels which were comparable to APECED (**Fig. 7B**). We also found
246 high reactivity to IL-6 and Tgm4 in one *Aire*^{-/-} SPD rat only, but not Magea4, Magea10,
247 Magea2 and Pdilt (**Table 3**). We observed a slight but not significant increase in anti-IL-22,
248 anti-IL-17F and anti-IFN ω antibodies measured by ELISA (**Suppl. Fig. 4B**). We observed no
249 differences in the level of anti-dsDNA antibodies (**Suppl. Fig. 4C**). Interestingly, we
250 observed increased levels of circulating IL-1 β , IL-10 and TNF- α cytokines in the sera of *Aire*^{-/-}
251 BN rats compared to wt littermates (**Fig. 7C**).

252

253 ***Aire*^{-/-} rats have altered primary T cell response to self and non-self but unchanged T**
254 **and B cell responses to secondary response to exogenous antigens**

255 We finally analyzed the involvement of AIRE in T cell responses to self and T and B cells
256 immune responses to non-self (i.e. exogenous antigens) following immunization and thus, the
257 impact of AIRE in T cell help to B cells (**Fig. 8**). T cells purified from spleen of *Aire*^{-/-} rats
258 demonstrated a more important proliferation at day 4 in presence of wt syngeneic non-T cells,
259 by contrast to T cells from *Aire*^{+/+} rats in the presence of wt syngeneic non-T cells (**Fig. 8A**),
260 demonstrating that T cells are biased toward autoreactivity in AIRE-deficient rats. We also
261 stimulated T cells from the lymph node with OVA and analyzed for proliferation 4 days later
262 and observed that the primary T cell response with OVA *in vitro* is also increased in *Aire*^{-/-}
263 rats compared to wt littermates (**Fig. 8B**), demonstrating that T cell reactivity to exogenous
264 antigens is also altered in AIRE-deficient rats.

265 Then, *Aire*^{-/-} rats were immunized with keyhole limpet hemocyanin (KLH) and complete
266 Freund adjuvant, and 11 days later the sera were analyzed for presence of anti-KLH
267 antibodies. Following immunization, *Aire*^{-/-} rats and wt littermates developed anti-KLH
268 antibody immune responses in a similar manner (**Fig. 8C left**), demonstrating that T cell help
269 to B cells is not altered in absence of AIRE. We also re-stimulated T cells from the lymph

270 node with KLH and analyzed for proliferation 4 days later. We observed that the secondary T
271 cell response to KLH is not changed in *Aire*^{-/-} rats compared to wt littermates following the
272 KLH re-stimulation in vitro (**Fig. 8C right**), demonstrating that secondary T cell reactivity to
273 exogenous antigens is not altered in AIRE-deficient rats.
274

275 **DISCUSSION**

276 Altogether, our data demonstrate that the *Aire*^{-/-} rat is the first animal model that reproduces
277 accurately several characteristics of human APECED disease, independently of the genetic
278 background, opening new possibilities to test and identify treatment for APECED patients.
279 In this paper, we describe in rat a natural expression of AIRE in subsets of TECs in the
280 thymus i.e. a subset in MHCII^{hi} CD45⁻ and a subset in MHCII⁻ CD45⁻ cells. This expression
281 of AIRE in MHCII⁻ CD45⁻ cells suggests that mTECs can express AIRE at distinct maturation
282 status, i.e. terminally differentiated mTECs that have lost MHC-II expression but are still
283 expressing AIRE (31, 32) or that subset of cells from distinct structure such as Hassall's
284 corpuscles, thought to be post-AIRE mTECs that lost their nuclei and merged, can still
285 express some level of AIRE (18). In the periphery, interestingly, we observed that significant
286 levels of *Aire* expression can be detected by RT-qPCR in several organs, but more particularly
287 in the MLN, caecum and testis. This was confirmed in the MLN by confocal microscopy
288 demonstrating direct typical dotted nucleic AIRE protein expression. This is in accordance
289 with human AIRE expression in the periphery as shown by transcriptomic analysis (33) and
290 recently published data using immunohistochemical staining and RT-qPCR suggesting that
291 peripheral AIRE expression support TSA expression in peripheral lymphoid tissues and
292 negative selection and play a complementary role to the thymus (34, 35). This peripheral
293 expression has remained controversial for a long time as *Aire* mRNA could be barely detected
294 in peripheral tissues and blood in mice (36, 37) and AIRE protein expression outside the
295 thymus rely mostly on detection with polyclonal antibodies or reporter systems (1, 36, 38-41),
296 while Hubert et al. could not detect AIRE protein expression in mice using a more specific
297 monoclonal antibody (5H12) provided to us and used in our study (38). Thus, we believe that
298 our results firmly demonstrate the expression of AIRE in the periphery in the rat.

299 While the different models of AIRE-deficient mice generated to date have provided important
300 information in understanding the establishment of central tolerance, they do not seem to
301 reproduce accurately the human APECED disease since they display differences in the
302 development of the clinical symptoms compared to observation made in humans
303 (mucocutaneous candidiasis, chronic hypoparathyroidism and adrenal insufficiency
304 (Addison's disease)) and AIRE-deficiency in mice strains results in a mild auto-immune
305 phenotype in most background and a strong phenotype in the NOD background (**Table 3**) (15,
306 42-44). Analysis of rat, mice and human genomes highlighted the existence of large genomic
307 differences between rats and mice (45), but strong similarity (90%) in the number, order and
308 sequence of genes between rat and human, while mouse and human have only 80%
309 similarities (45-47). We observed notable similarities in the organization and layout of the
310 *Aire* locus between humans and rats, while mouse *Aire* gene overlaps another gene,
311 suggesting that significant differences could be observed in the absence of AIRE in the rat
312 compared to mice (**Figure 2**). Thanks to the zinc finger nucleases technology (21, 23), we
313 generated a double strand break in exon 3 of the *Aire* gene, mimicking a common mutation in
314 APECED patients (24). Our data confirmed that *Aire*^{-/-} rats developed histological
315 autoimmune lesions characteristic of APECED with unique observation of severe alopecia
316 areata observable from 6 month of age in the two different strains, a vitiligo-like disease and
317 nail dystrophy (7). These symptoms were associated with severe organ damages such as
318 involution of thymic structure, probably due to the dysregulation of the thymopoiesis, and
319 disappearance of exocrine pancreas. Potential for off target effects was excluded as the rats
320 have been derived for several generations and the symptoms were preserved. In addition,
321 potential off targets edits were all contained within introns and intergenic non-coding regions.
322 The most significant observations made in the mouse model for APECED were observed in
323 the NOD background and were distinct for a number of features to observations made in

324 APECED patients with distinct profile of autoantibodies and different range of organs
 325 affected by the deficiency (48)(**Table 3**). Thus, symptoms were dependent on the genetic
 326 background with more severe symptoms observed in the NOD background of the Mathis's
 327 and Matsumoto's mice with in particular significant damages in liver, pancreas, kidney and
 328 stomach (17, 49). However, they did not observe alopecia, vitiligo and nail dystrophy in
 329 contrast to human and rat APECED, thus *Aire*^{-/-} rats will be important to provide new insights
 330 into the role of AIRE in hair and nail growth and pigmentation of the skin. We did not find
 331 major targets of autoantibodies in the skin, nor did we find a severe infiltration, although we
 332 observed that the cells at the base of the hair are stained by autoantibodies, altogether
 333 suggesting that hormones might be targeted by autoantibodies and that APECED is a disease
 334 associated with a dysregulation of hormones. In human APECED patients, nail and hair
 335 lesions have been associated to candidiasis, an infection caused by fungus *C. albicans*, that is
 336 likely favored by auto-antibodies against Th17-associated cytokines, notably IL-17, and IFN
 337 subtypes (7, 50, 51). Although we could not test the susceptibility for candidiasis in our rat
 338 model, we observed a strong increase in the levels of neutralizing auto-antibodies directed to
 339 IL-17 and type 1 IFN subtypes suggesting that they are associated to the lesions.
 340 The presence of serum auto-antibodies in the AIRE-deficient rats was another indicator of an
 341 autoimmune B cell response. The liver appeared to be a major target of autoimmunity. In
 342 human subjects with APECED, depending on their origins, 3 to 20% have autoimmune
 343 hepatitis, which in the most severe cases is often responsible for death. The enterocytes from
 344 the digestive tract were also targeted by auto-antibodies. One hypothesis is that the target of
 345 these antibodies is the glycocalyx located at the apical pole of these cells. In addition,
 346 bronchioles were marked on the lung section, and the broncho-alveolar epithelial cells also
 347 have a glycocalyx on the apical surface. In the testis, the target cells were probably Leydig

348 cells responsible for the production of testosterone, correlating with the reproductive disorders
349 observed in these animals and also present in patients.

350 AIRE-deficient mice do not have anti-interferon antibodies and only IgG antibodies to IL17A
351 at older age (30). We were able to demonstrate high levels of neutralizing IgG anti-IFN
352 antibodies to some subtypes and anti-IL-17 α in *Aire*^{-/-} rat to similar levels observed in
353 APECED patients (52). The presence of several types I IFNs auto-antibodies in this model is
354 one of the most interesting finding. Meyer at al. reported recently the presence of high affinity
355 neutralizing autoantibodies to cytokines in APECED patients (53). Antibodies to type I IFNs
356 in mouse models of type I diabetes were shown to contribute to the disease (54). However, the
357 role of these antibodies in APECED is not clear and Meyer et al. proposed that naturally
358 arising neutralizing antibodies may be beneficial to APECED disease. The presence of anti-
359 Type I IFNs could not be evidenced in mouse models of APECED disease (15, 30), in
360 contrast to the rat model with levels comparable to APECED, thus therapeutic strategies
361 targeting type I IFNs may be assessed in the rat model.

362 Most of the changes observed by flow cytometry on the dynamic of cell populations revealed
363 a different pattern of distributions of the cell subsets rather than a complete deficiency in one
364 cell type. Most of the effects were observed with NK and NKT cells that seemed to be
365 recruited to the liver, suggesting that they could play a role in hepatic injury. Although we
366 observed increased levels of IgM and IgA in the sera of *Aire*^{-/-} rats, only IgG isotypes auto-
367 antibodies were detected as targeting tissues structure (this paper and data not shown),
368 emphasizing the link between AIRE-deficiency and production of IgG-biased humoral
369 responses and the clinical symptoms of the disease (55). However, T cell help to B cell does
370 not seem to be altered by AIRE-deficiency as *Aire*^{-/-} rats were able to develop normal T and B
371 cells responses to exogenous antigens. In contrast, we observed a significant self-reactivity of
372 T cells demonstrating a polyclonal bias of the T cell repertoire to self, as shown in AIRE-

373 deficient mice (15). Our model also highlights the critical role of AIRE in the development of
374 the autoimmune lesions in the pancreas. Previous mice models have evidenced the presence
375 of autoantibodies to the pancreas in the sera but only Matsumoto's mice demonstrated
376 exocrine pancreas destruction in 81% of the mice, but preserved β -islets in the NOD
377 background, a background prone to diabetes (49). The Brown Norway background is not
378 prone to diabetes, but still we observed major pancreas destruction, while beta-cells are
379 preserved, emphasizing the results demonstrated by Matsumoto et al.
380 Finally, our observations highlight also the potential of the rat as an animal model for study
381 human diseases for either genes that are not present in mice or locus organization that are
382 closer in similarity in rat and human than in mice and human (56).
383 Altogether, these results showing spontaneous autoimmunity along with autoantibodies
384 responses demonstrate that central tolerance mechanisms are altered in *Aire*^{-/-} rats and that this
385 model will provide new insight into the role of AIRE in humans.
386

387 **MATERIALS AND METHODS**

388 **Rats**

389 *Aire* knockout rats (Brown Norway, inbred strain) were generated by a targeted disruption of
390 the *Aire* gene using ZFNs as previously described (57). Off target edits by the nucleases were
391 analyzed and were all contained within introns and intergenic non-coding regions (data not
392 shown). These rats were backcrossed in a Sprague Dawley (SPD, outbred strain) background
393 for 6 generations in order to obtain AIRE-deficient SPD rats. All animals were used at >6
394 months of age unless indicated otherwise. All studies were performed according to protocols
395 approved by the ethics committee of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
396 Recherche (Paris, France).

397

398 **Genotyping**

399 Ear biopsies from 8- to 10-day-old rats were digested in 300 µL of tissue digestion buffer
400 (Tris-HCl 0.1 mol/L pH 8.3, EDTA 5 mmol/L, SDS 0.2%, NaCl 0.2 mol/L, PK 100 µg/mL)
401 in a 1.5 mL tube at 56°C overnight.

402 PCR amplification was performed with 1:20 dilution of the lysis product and 25 µL PCR
403 reaction mix according to the manufacturer instruction (Herculase II fusion DNA polymerase,
404 Agilent Technologies) using the following PCR primers: forward 5'-
405 TCAAGAGTGCCCTGTTCTAG-3' and reverse 5'-CTGGGGTGGTGTCTAGTAAG-3'. The
406 following amplification program was used: one cycle at 95°C for 5 min, 35 cycles of 98°C for
407 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 30 s, followed by one cycle at 72°C for 4 min using a Veriti
408 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA).

409 The PCR products were analyzed by HMA-CE using a microchip capillary electrophoresis
410 system Caliper LabChip GX (PerkinElmer). The microfluidic 5K was loaded with gel and
411 marker in the specified containers according to the manufacturer's protocol. PCR tube strips

412 or plates were centrifuged (5 min, 2000 rpm) and placed without caps or adhesive film in the
413 electrophoresis system. Each sample was mixed automatically with an internal marker and run
414 through these microcapillaries according to their sizes and nucleotidic compositions. The
415 DNA fluorescence measurement was recorded as a function of time on an electrophoregram
416 and the DNA ladder defined the product sizes. The software then generated a projection of the
417 result as a migration gel.

418

419 **Antibodies and flow cytometry**

420 Cellular phenotype was analyzed using monoclonal antibodies from BD pharmigen: against
421 granulocytes (His48); CD44 (Ox49); TCR $\alpha\beta$ (R73); CD45R (His24); CD25 (Ox39); CD4
422 (Ox35); CD45 (Ox1); MHCII (Ox6). Abs against FoxP3 (FJK-16s; Ebioscience), EpCAM
423 (clone GZ.1, Abgent) and anti-AIRE A488 (5H12; Ebioscience) and antibodies against
424 CD11b/c (Ox42); CD161 (3.2.3); CD45RA (Ox33); TCR $\gamma\delta$ (V65); IgM; CD103 (Ox62);
425 CD45RC (Ox22); IgD; 85C7; CD8 (Ox8) produced in our lab were used. Antibodies were
426 used to stain cells and fluorescence was measured with a FACSCanto II flow cytometer (BD
427 Bioscience) and FlowJo software was used to analyze data. Cells were first gated on their
428 morphology and then dead cells were excluded by staining with fixable viability dye efluor
429 506 (Ebioscience).

430

431 **Cell isolation**

432 Spleen, liver, thymus and lymph nodes were digested by collagenase D for 30 minutes at
433 37°C, the reaction was stopped by adding 0.01mM EDTA. Cells from blood and bone marrow
434 were also isolated and red blood cells were lysed using a lysis solution (8,29g NH₄Cl, 1g
435 KHCO₃, 37,2mg EDTA qsp 1L deionised water pH 7,2-7,4).

436

437 **Cell sorting**

438 MLNs were shredded using 26G needles to extract cells, cells were sorted > 99% purity by
439 FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA) by gating on Dapi⁻TCR⁻CD103⁺CD4⁻
440 (cDC CD4⁻), CD4^{int} (cDC CD4^{int}) or CD4⁺ (cDC CD4⁺); Dapi⁻CD45RA⁺ (B cells); Dapi⁻
441 TCR⁺ (T cells); Dapi⁻TCR⁻ (non-T cells); Dapi⁻Epcam⁺Sirpα⁺CD103⁻.

442

443 **In vivo KLH immunization and in vitro secondary challenge**

444 *Aire*^{+/+} or *Aire*^{-/-} rats were immunized with keyhole limpet hemocyanin (KLH) protein
445 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (100 μg) emulsified (volume-to-volume) in 100 μL of
446 complete Freund adjuvant (CFA) (Difco, Lawrence, KS) at the base of the tail. 11 days after
447 immunization, iliac lymph nodes cells were extracted and sorted as describe above in T cells
448 and non-T cells.

449 T cells were CFSE-labeled (5nM) (Thermo Fisher, Waltham, MA) and 50000 cells were co-
450 cultured for 3 days in presence of equivalent number of non-T cells with or without KLH or
451 OVA (SIINFEKL) at 25mg/mL in 100μL of complete RPMI-1640 medium. After 3 days, T
452 cells were stained with anti-TCR antibody and CFSE dilution was analyzed on BD FACS
453 Canto.

454

455 **Western blot**

456 Eye, liver, skin, duodenum, salivary gland, ovary, ileum, spleen, kidney, stomach, colon,
457 pancreas, lung and thymus from *Rag*^{-/-} rat were homogenized in RIPA lysis buffer. 10μg of
458 protein were run for each organ on a 10% tris-SDS acrylamide gel and then transferred to a
459 Protran premium 0,45μm NC western membrane (Amersham). The membrane was blocked
460 for 2 hours in a Tris Buffer Saline-tween20 (TBST) solution with 5% milk. The membrane
461 was then incubated with sera from WT or *Aire*^{-/-} rat diluted 1/500 overnight at 4°C on constant

462 agitation. After washing the membrane three times in TBST, it was incubated with secondary
463 antibody HRP conjugated goat anti-rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) for 2 hours at
464 RT on constant agitation. SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo
465 Fisher scientific) was used as a substrate; pictures were taken by Fujifilm Las 4000 device.

466

467 **Transcriptional analysis**

468 mRNA extraction from tissues or cells was performed using RNeasy Mini kit (Qiagen)
469 according to the manufacturer's instruction. After quantification of mRNA, reverse
470 transcription was performed using the Omniscript RT kit (Qiagen).

471 *Aire* expression level was determined by relative quantitative RT-PCR using Taqman probes
472 for *Aire* (Thermo Fisher scientific Rn01428600) and reported to HPRT expression level
473 (Rn01527840) and Taqman universal Master Mix with AmpliTaq Gold (Applied
474 Biosystems). Reaction was performed in StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems.

475 Total RNAs were isolated from thymus using RNeasy-Mini Kit (Qiagen) and were then
476 processed for RNA sequencing. Protocol of 3'digital gene expression (3'DGE) RNA-
477 sequencing was performed as previously described (58). TSAs with altered expression in mice
478 models have been obtained from M. Giraud from RNAseq dataset analysis deposited in Gene
479 Expression Omnibus (GEO) under number GSE68190 and GSE87133 (26, 27).

480

481 **Immunofluorescence**

482 Frozen sections of several organs from WT or *Aire*^{-/-} rats were stained with anti-AIRE-A488
483 (clone 5H12, Ebioscience), anti-MHC-II-texas red (BioAtlantic) and anti-EpCAM-purified
484 (clone GZ.1, Abgen). Also, frozen sections of *IgM*^{-/-} rat were used for staining with sera from
485 *Aire*^{+/+} or *Aire*^{-/-} rats. Auto-antibodies were revealed using AF488 goat anti-rat IgG (H+L)
486 (Invitrogen). After staining, sections were mounted with Prolong Gold antifade reagent with

487 DAPI (Molecular Probes) before analysis with confocal microscopy or automated tissue slide
488 scanner (Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP) system).

489

490 **Pathology of autoimmune infiltrations**

491 Eye, liver, skin, duodenum, salivary gland, ovary, testis, ileum, kidney, stomach, colon,
492 pancreas, lung, adrenal gland, axillary lymph node and thyroids were fixed in 4%
493 formaldehyde before been embedded in paraffin. Hematoxylin eosin saffron (HES) staining
494 was performed on sections of each organ; the auto-immune score was determined by an
495 anatomopathologist in a blinded manner (A. Moreau).

496

497 **Detection of anti-cytokine and anti-ds DNA auto-antibodies**

498 Cytokines (IL-22, IL-17F or IFN- ω , R&D systems) or salmon sperm DNA (invitrogen) were
499 coated in a 96 wells flat bottom plate (Thermo Fisher) in a carbonate buffer overnight at 4°C.
500 After several wash steps, saturation with PBS tween 0,1% BSA 1% was performed for 2h at
501 37°C. Sera from WT or *Aire*^{-/-} rats were used as primary antibodies (2h, 37°C) and a HRP-
502 conjugated goat anti-rat IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch) was used as secondary
503 antibody (2h, 37°C).

504

505 **ELISA**

506 For immunoglobulins, plates were coated with isotype-specific mouse mAb anti-rat to IgM
507 (MARM-4), IgG (MARG), IgE (MARE) or IgA (MARA) (all from Abd Serotec, Jackson
508 ImmunoResearch, BD Biosciences) and goat anti-rat IgG1, IgG2a, IgG2b or IgG2c (Bethyl
509 laboratories) at 5 μ g/mL in PBS overnight at 4°C. After several wash steps, saturation with
510 PBS tween 0,1% BSA 1% was performed for 2h at 37°C. Both mouse anti-rat κ and anti- λ

511 chain-specific peroxidase-conjugated Abs (clone MARK-1/MARL-15, Abd Serotec) were
512 added to reveal the staining.

513 For anti-KLH antibodies, plates were coated with KLH at 10µg/mL in 50µL of PBS overnight
514 at 4°C. After several wash steps, saturation with PBS tween 0,1% BSA 1% was performed for
515 2h at 37°C. Sera from WT or *Aire*^{-/-} rats were then incubated 2h at 37°C, washed and a HRP
516 conjugated goat anti-rat IgG Ab (H+L) (Jackson ImmunoResearch) was used (2h, 37°C) to
517 detect anti-KLH antibodies.

518 Concentration of cytokines in the sera was assessed using a multiplex kit (MILLIPLEX MAP
519 Rat) as recommended by the manufacturer (Merck).

520

521 **Luciferase immunoprecipitation system (LIPS) assay**

522 LIPS assays were conducted in 96-well format plates as described earlier (30). The coding
523 sequences of mouse IFNα1, IFNα2, IFNα4, IFNα5, IFNα6, IFNα7, IFNα9, IFNα11, IFNα13,
524 IFNα14 and IFNα16 were cloned into modified pPK-CMV-F4 fusion vector (PromoCell
525 GmbH, Heidelberg; Germany) downstream of IL-2 signal peptide and NanoLuc gene from
526 pNL1.3CMV vector (Promega) that was cloned into the plasmid instead of Firefly luciferase.
527 HEK 293 cells were transfected with cloned constructs and secreted Nanoluc-antigen fusion
528 proteins were collected with the tissue culture supernatant 48h later. Rat serum dilutions (1:10
529 or 1:25) were incubated overnight at +4 C with supernatants containing Nanoluc-antigen
530 fusion protein, 10⁶ luminescence units (LU) per precipitation reaction, either in pools of
531 different IFNα subtypes or individually. LIPS assay was performed in 96-well MultiScreen
532 filter HTS plates (Millipore) at room temperature using buffer A (50 mM Tris, pH 7.5, 100
533 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) for all dilutions. Immune complexes from
534 overnight incubated samples were captured onto Protein G Agarose beads (25 µl of 4%
535 suspension, Exalpa Biologicals). After 1h the plate was washed, substrate (fumarazine,

536 Promega) was added, and luminescence intensity recorded during 5 sec. with Victor X5 plate
537 reader (PerkinElmer Life Sciences).

538

539 **Statistical analysis**

540 We used one or two tailed Mann Whitney test in qPCR, FACS, western blot, ELISA, LIPS,
541 luminex experiments.

542

543

544 **ACKNOWLEDGMENTS**

545 We thank Claire Usal, Emmanuel Merieau and Cécile Braudeau for technical assistance and
546 the MicroPICell platform, and also Maire Pihlap and Anu Remm technical help with LIPS
547 assays. We thank the Fondation Progreffe for financial support and Crédit Agricole for the
548 donation of the FACS Aria. We are most grateful to the Genomics and Bioinformatics Core
549 Facility of Nantes (GenoBiRD, Biogenouest) for its technical support. This work was realized
550 in the context of the LabEX IGO program supported by the National Research Agency via the
551 investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01 and under the auspices of the
552 IHU-Cesti project which received French Government financial support managed by the
553 National Research Agency via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The
554 IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region.
555 This work was also performed in the context of the “TEFOR” project funded by the
556 « Investissements d’Avenir » French Government program, managed by the French National
557 Research Agency (ANR) (ANR11-INSB-0014). The study was also supported by Estonian
558 Research Agency (IUT2-2). For this work JO was supported by the Fondation pour la
559 Recherche Médicale PLP20141031245 and F.-X. H. by a Marie Curie outgoing Fellowship
560 from the FP6 program.
561

562 REFERENCES

- 563 1. Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von
564 Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an
565 immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395-
566 1401.
- 567 2. Meredith, M., D. Zemmour, D. Mathis, and C. Benoist. 2015. Aire controls gene
568 expression in the thymic epithelium with ordered stochasticity. *Nature immunology*
569 16: 942-949.
- 570 3. Ahonen, P. 1985. Autoimmune polyendocrinopathy--candidosis--ectodermal
571 dystrophy (APECED): autosomal recessive inheritance. *Clin Genet* 27: 535-542.
- 572 4. Nagamine, K., P. Peterson, H. S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K. J.
573 Krohn, M. D. Laloti, P. E. Mullis, S. E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F.
574 Ito, and N. Shimizu. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nature genetics*
575 17: 393-398.
- 576 5. Aaltonen, J., N. Horelli-Kuitunen, J. B. Fan, P. Bjorses, J. Perheentupa, R. Myers, A.
577 Palotie, and L. Peltonen. 1997. High-resolution physical and transcriptional mapping
578 of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy locus on
579 chromosome 21q22.3 by FISH. *Genome Res* 7: 820-829.
- 580 6. Myhre, A. G., M. Halonen, P. Eskelin, O. Ekwall, H. Hedstrand, F. Rorsman, O.
581 Kampe, and E. S. Husebye. 2001. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS
582 I) in Norway. *Clinical endocrinology* 54: 211-217.
- 583 7. Ahonen, P., S. Myllarniemi, I. Sipila, and J. Perheentupa. 1990. Clinical variation of
584 autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a
585 series of 68 patients. *N Engl J Med* 322: 1829-1836.
- 586 8. Cunnusamy, K., E. J. Baughman, J. Franco, S. B. Ortega, S. Sinha, P. Chaudhary, B.
587 M. Greenberg, E. M. Frohman, and N. J. Karandikar. 2014. Disease exacerbation of
588 multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory
589 CD8+ T cells. *Clin Immunol* 152: 115-126.
- 590 9. Betterle, C., C. Dal Pra, F. Mantero, and R. Zanchetta. 2002. Autoimmune adrenal
591 insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies,
592 autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction. *Endocrine*
593 *reviews* 23: 327-364.
- 594 10. Husebye, E. S., J. Perheentupa, R. Rautemaa, and O. Kampe. 2009. Clinical
595 manifestations and management of patients with autoimmune polyendocrine syndrome
596 type I. *Journal of internal medicine* 265: 514-529.
- 597 11. Orlova, E. M., A. M. Bukina, E. S. Kuznetsova, M. A. Kareva, E. U. Zakharova, V. A.
598 Peterkova, and Dedov, II. 2010. Autoimmune polyglandular syndrome type 1 in
599 Russian patients: clinical variants and autoimmune regulator mutations. *Hormone*
600 *research in paediatrics* 73: 449-457.
- 601 12. Alimohammadi, M., P. Bjorklund, A. Hallgren, N. Pontynen, G. Szinnai, N. Shikama,
602 M. P. Keller, O. Ekwall, S. A. Kinkel, E. S. Husebye, J. Gustafsson, F. Rorsman, L.
603 Peltonen, C. Betterle, J. Perheentupa, G. Akerstrom, G. Westin, H. S. Scott, G. A.
604 Hollander, and O. Kampe. 2008. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 and
605 NALP5, a parathyroid autoantigen. *The New England journal of medicine* 358: 1018-
606 1028.
- 607 13. Shum, A. K., M. Alimohammadi, C. L. Tan, M. H. Cheng, T. C. Metzger, C. S. Law,
608 W. Lwin, J. Perheentupa, H. Bour-Jordan, J. C. Carel, E. S. Husebye, F. De Luca, C.
609 Janson, R. Sargur, N. Dubois, M. Kajosaari, P. J. Wolters, H. A. Chapman, O. Kampe,

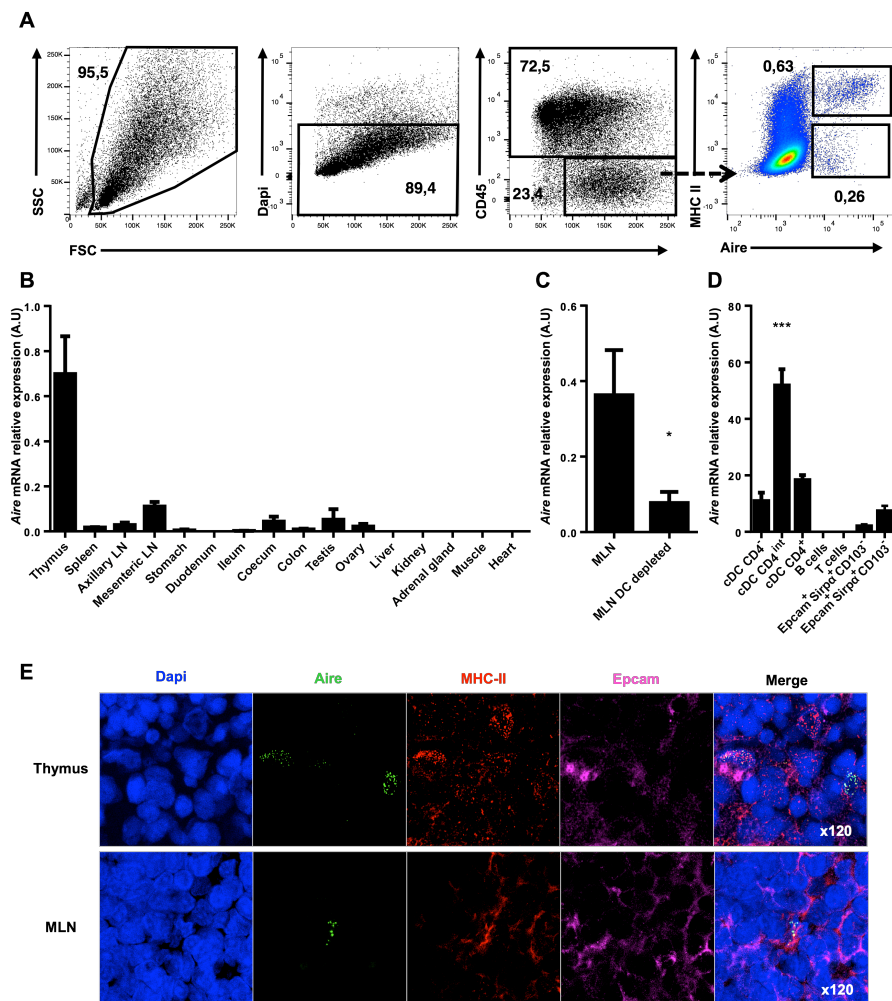
- 610 and M. S. Anderson. 2013. BPIFB1 is a lung-specific autoantigen associated with
611 interstitial lung disease. *Science translational medicine* 5: 206ra139.
- 612 14. Finnish-German, A. C. 1997. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations
613 in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nature genetics* 17: 399-
614 403.
- 615 15. Hubert, F. X., S. A. Kinkel, P. E. Crewther, P. Z. Cannon, K. E. Webster, M. Link, R.
616 Uibo, M. K. O'Bryan, A. Meager, S. P. Forehan, G. K. Smyth, L. Mittaz, S. E.
617 Antonarakis, P. Peterson, W. R. Heath, and H. S. Scott. 2009. Aire-deficient C57BL/6
618 mice mimicking the common human 13-base pair deletion mutation present with only
619 a mild autoimmune phenotype. *J Immunol* 182: 3902-3918.
- 620 16. Ramsey, C., O. Winqvist, L. Puhakka, M. Halonen, A. Moro, O. Kampe, P. Eskelin,
621 M. Peltto-Huikko, and L. Peltonen. 2002. Aire deficient mice develop multiple features
622 of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11: 397-
623 409.
- 624 17. Smith, T. R., and V. Kumar. 2008. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression.
625 *Trends Immunol* 29: 337-342.
- 626 18. Laan, M., and P. Peterson. 2013. The many faces of aire in central tolerance. *Front*
627 *Immunol* 4: 326.
- 628 19. Hubert, F. X., C. Voisine, C. Louvet, M. Heslan, and R. Josien. 2004. Rat
629 plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-
630 OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like
631 receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol* 172: 7485-7494.
- 632 20. Voisine, C., F. X. Hubert, B. Trinite, M. Heslan, and R. Josien. 2002. Two
633 phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different
634 cytokine production and T cell stimulatory activity. *J Immunol* 169: 2284-2291.
- 635 21. Geurts, A. M., G. J. Cost, Y. Freyvert, B. Zeitler, J. C. Miller, V. M. Choi, S. S.
636 Jenkins, A. Wood, X. Cui, X. Meng, A. Vincent, S. Lam, M. Michalkiewicz, R.
637 Schilling, J. Foeckler, S. Kalloway, H. Weiler, S. Menoret, I. Anegon, G. D. Davis, L.
638 Zhang, E. J. Rebar, P. D. Gregory, F. D. Urmov, H. J. Jacob, and R. Buelow. 2009.
639 Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 325: 433.
- 640 22. Martin, J. C., G. Beriou, M. Heslan, C. Bossard, A. Jarry, A. Abidi, P. Hulin, S.
641 Menoret, R. Thinard, I. Anegon, C. Jacqueline, B. Lardeux, F. Halary, J. C. Renaud,
642 A. Bourreille, and R. Josien. 2016. IL-22BP is produced by eosinophils in human gut
643 and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal Immunol* 9: 539-549.
- 644 23. Remy, S., L. Tesson, S. Menoret, C. Usal, A. M. Scharenberg, and I. Anegon. 2010.
645 Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic*
646 *Res* 19: 363-371.
- 647 24. Rosatelli, M. C., A. Meloni, A. Meloni, M. Devoto, A. Cao, H. S. Scott, P. Peterson,
648 M. Heino, K. J. Krohn, K. Nagamine, J. Kudoh, N. Shimizu, and S. E. Antonarakis.
649 1998. A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-
650 ectodermal dystrophy patients. *Hum Genet* 103: 428-434.
- 651 25. Chenouard, V., L. Brusselle, J. M. Heslan, S. Remy, S. Menoret, C. Usal, L. H.
652 Ouisse, N. G. TH, I. Anegon, and L. Tesson. 2016. A Rapid and Cost-Effective
653 Method for Genotyping Genome-Edited Animals: A Heteroduplex Mobility Assay
654 Using Microfluidic Capillary Electrophoresis. *J Genet Genomics* 43: 341-348.
- 655 26. Chuprin, A., A. Avin, Y. Goldfarb, Y. Herzig, B. Levi, A. Jacob, A. Sela, S. Katz, M.
656 Grossman, C. Guyon, M. Rathaus, H. Y. Cohen, I. Sagi, M. Giraud, M. W. McBurney,
657 E. S. Husebye, and J. Abramson. 2015. The deacetylase Sirt1 is an essential regulator
658 of Aire-mediated induction of central immunological tolerance. *Nat Immunol* 16: 737-
659 745.

- 660 27. Danan-Gotthold, M., C. Guyon, M. Giraud, E. Y. Levanon, and J. Abramson. 2016.
661 Extensive RNA editing and splicing increase immune self-representation diversity in
662 medullary thymic epithelial cells. *Genome biology* 17: 219.
- 663 28. Menoret, S., S. Fontaniere, D. Jantz, L. Tesson, R. Thinard, S. Remy, C. Usal, L. H.
664 Ouisse, A. Fraichard, and I. Anegon. 2013. Generation of Rag1-knockout
665 immunodeficient rats and mice using engineered meganucleases. *FASEB J* 27: 703-
666 711.
- 667 29. Burbelo, P. D., E. E. Lebovitz, and A. L. Notkins. 2015. Luciferase
668 immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious
669 diseases. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 165:
670 325-335.
- 671 30. Karner, J., A. Meager, M. Laan, J. Maslovskaja, M. Pihlap, A. Remm, E. Juronen, A.
672 S. Wolff, E. S. Husebye, K. T. Podkrajsek, N. Bratanic, T. Battelino, N. Willcox, P.
673 Peterson, and K. Kisand. 2013. Anti-cytokine autoantibodies suggest pathogenetic
674 links with autoimmune regulator deficiency in humans and mice. *Clin Exp Immunol*
675 171: 263-272.
- 676 31. Danzl, N. M., S. Jeong, Y. Choi, and K. Alexandropoulos. 2014. Identification of
677 novel thymic epithelial cell subsets whose differentiation is regulated by RANKL and
678 Traf6. *PLoS One* 9: e86129.
- 679 32. Sun, L., H. Li, H. Luo, and Y. Zhao. 2014. Thymic epithelial cell development and its
680 dysfunction in human diseases. *Biomed Res Int* 2014: 206929.
- 681 33. Fagerberg, L., B. M. Hallstrom, P. Oksvold, C. Kampf, D. Djureinovic, J. Odeberg,
682 M. Habuka, S. Tahmasebpour, A. Danielsson, K. Edlund, A. Asplund, E. Sjostedt, E.
683 Lundberg, C. A. Szgyarto, M. Skogs, J. O. Takanen, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder,
684 P. Nilsson, J. M. Schwenk, C. Lindskog, F. Danielsson, A. Mardinoglu, A. Sivertsson,
685 K. von Feilitzen, M. Forsberg, M. Zwahlen, I. Olsson, S. Navani, M. Huss, J. Nielsen,
686 F. Ponten, and M. Uhlen. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by
687 genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell*
688 *Proteomics* 13: 397-406.
- 689 34. Peterson, P., T. Org, and A. Rebane. 2008. Transcriptional regulation by AIRE:
690 molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 948-957.
- 691 35. Poliani, P. L., K. Kisand, V. Marrella, M. Ravanini, L. D. Notarangelo, A. Villa, P.
692 Peterson, and F. Facchetti. 2010. Human peripheral lymphoid tissues contain
693 autoimmune regulator-expressing dendritic cells. *Am J Pathol* 176: 1104-1112.
- 694 36. Adamson, K. A., S. H. Pearce, J. R. Lamb, J. R. Seckl, and S. E. Howie. 2004. A
695 comparative study of mRNA and protein expression of the autoimmune regulator gene
696 (Aire) in embryonic and adult murine tissues. *J Pathol* 202: 180-187.
- 697 37. Suzuki, E., Y. Kobayashi, O. Kawano, K. Endo, H. Haneda, H. Yukiue, H. Sasaki, M.
698 Yano, M. Maeda, and Y. Fujii. 2008. Expression of AIRE in thymocytes and
699 peripheral lymphocytes. *Autoimmunity* 41: 133-139.
- 700 38. Hubert, F. X., S. A. Kinkel, K. E. Webster, P. Cannon, P. E. Crewther, A. I. Proeitto,
701 L. Wu, W. R. Heath, and H. S. Scott. 2008. A specific anti-Aire antibody reveals aire
702 expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in
703 periphery. *J Immunol* 180: 3824-3832.
- 704 39. Lee, J. W., M. Epardaud, J. Sun, J. E. Becker, A. C. Cheng, A. R. Yonekura, J. K.
705 Heath, and S. J. Turley. 2007. Peripheral antigen display by lymph node stroma
706 promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 8: 181-190.
- 707 40. Gardner, J. M., J. J. Devoss, R. S. Friedman, D. J. Wong, Y. X. Tan, X. Zhou, K. P.
708 Johannes, M. A. Su, H. Y. Chang, M. F. Krummel, and M. S. Anderson. 2008.

- 709 Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321: 843-
710 847.
- 711 41. Halonen, M., M. Peltto-Huikko, P. Eskelin, L. Peltonen, I. Ulmanen, and M. Kolmer.
712 2001. Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the
713 mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy
714 candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *The journal of histochemistry and*
715 *cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 49: 197-208.
- 716 42. Kekalainen, E., A. Miettinen, and T. P. Arstila. 2007. Does the deficiency of Aire in
717 mice really resemble human APECED? *Nat Rev Immunol* 7: 1.
- 718 43. Kisand, K., P. Peterson, and M. Laan. 2014. Lymphopenia-induced proliferation in
719 aire-deficient mice helps to explain their autoimmunity and differences from human
720 patients. *Front Immunol* 5: 51.
- 721 44. Fishman, D., K. Kisand, C. Hertel, M. Rothe, A. Remm, M. Pihlap, P. Adler, J. Vilo,
722 A. Peet, A. Meloni, K. T. Podkrajsek, T. Battelino, O. Bruserud, A. S. B. Wolff, E. S.
723 Husebye, N. Kluger, K. Krohn, A. Ranki, H. Peterson, A. Hayday, and P. Peterson.
724 2017. Autoantibody Repertoire in APECED Patients Targets Two Distinct Subgroups
725 of Proteins. *Front Immunol* 8: 976.
- 726 45. Gibbs, R. A., G. M. Weinstock, M. L. Metzker, D. M. Muzny, E. J. Sodergren, S.
727 Scherer, G. Scott, D. Steffen, K. C. Worley, P. E. Burch, G. Okwuonu, S. Hines, L.
728 Lewis, C. DeRamo, O. Delgado, S. Dugan-Rocha, G. Miner, M. Morgan, A. Hawes,
729 R. Gill, Celera, R. A. Holt, M. D. Adams, P. G. Amanatides, H. Baden-Tillson, M.
730 Barnstead, S. Chin, C. A. Evans, S. Ferriera, C. Fosler, A. Glodek, Z. Gu, D. Jennings,
731 C. L. Kraft, T. Nguyen, C. M. Pfannkoch, C. Sitter, G. G. Sutton, J. C. Venter, T.
732 Woodage, D. Smith, H. M. Lee, E. Gustafson, P. Cahill, A. Kana, L. Doucette-Stamm,
733 K. Weinstock, K. Fechtel, R. B. Weiss, D. M. Dunn, E. D. Green, R. W. Blakesley, G.
734 G. Bouffard, P. J. De Jong, K. Osoegawa, B. Zhu, M. Marra, J. Schein, I. Bosdet, C.
735 Fjell, S. Jones, M. Krzywinski, C. Mathewson, A. Siddiqui, N. Wye, J. McPherson, S.
736 Zhao, C. M. Fraser, J. Shetty, S. Shatsman, K. Geer, Y. Chen, S. Abramzon, W. C.
737 Nierman, P. H. Havlak, R. Chen, K. J. Durbin, A. Egan, Y. Ren, X. Z. Song, B. Li, Y.
738 Liu, X. Qin, S. Cawley, K. C. Worley, A. J. Cooney, L. M. D'Souza, K. Martin, J. Q.
739 Wu, M. L. Gonzalez-Garay, A. R. Jackson, K. J. Kalafus, M. P. McLeod, A.
740 Milosavljevic, D. Virk, A. Volkov, D. A. Wheeler, Z. Zhang, J. A. Bailey, E. E.
741 Eichler, E. Tuzun, E. Birney, E. Mongin, A. Ureta-Vidal, C. Woodward, E. Zdobnov,
742 P. Bork, M. Suyama, D. Torrents, M. Alexandersson, B. J. Trask, J. M. Young, H.
743 Huang, H. Wang, H. Xing, S. Daniels, D. Gietzen, J. Schmidt, K. Stevens, U. Vitt, J.
744 Wingrove, F. Camara, M. Mar Alba, J. F. Abril, R. Guigo, A. Smit, I. Dubchak, E. M.
745 Rubin, O. Couronne, A. Poliakov, N. Hubner, D. Ganten, C. Goesele, O. Hummel, T.
746 Kreitler, Y. A. Lee, J. Monti, H. Schulz, H. Zimdahl, H. Himmelbauer, H. Lehrach, H.
747 J. Jacob, S. Bromberg, J. Gullings-Handley, M. I. Jensen-Seaman, A. E. Kwitek, J.
748 Lazar, D. Pasko, P. J. Tonellato, S. Twigger, C. P. Ponting, J. M. Duarte, S. Rice, L.
749 Goodstadt, S. A. Beatson, R. D. Emes, E. E. Winter, C. Webber, P. Brandt, G.
750 Nyakatura, M. Adetobi, F. Chiaromonte, L. Elnitski, P. Eswara, R. C. Hardison, M.
751 Hou, D. Kolbe, K. Makova, W. Miller, A. Nekrutenko, C. Riemer, S. Schwartz, J.
752 Taylor, S. Yang, Y. Zhang, K. Lindpaintner, T. D. Andrews, M. Caccamo, M. Clamp,
753 L. Clarke, V. Curwen, R. Durbin, E. Eyra, S. M. Searle, G. M. Cooper, S. Batzoglou,
754 M. Brudno, A. Sidow, E. A. Stone, J. C. Venter, B. A. Payseur, G. Bourque, C. Lopez-
755 Otin, X. S. Puente, K. Chakrabarti, S. Chatterji, C. Dewey, L. Pachter, N. Bray, V. B.
756 Yap, A. Caspi, G. Tesler, P. A. Pevzner, D. Haussler, K. M. Roskin, R. Baertsch, H.
757 Clawson, T. S. Furey, A. S. Hinrichs, D. Karolchik, W. J. Kent, K. R. Rosenbloom, H.
758 Trumbower, M. Weirauch, D. N. Cooper, P. D. Stenson, B. Ma, M. Brent, M.

- Arumugam, D. Shteynberg, R. R. Copley, M. S. Taylor, H. Riethman, U. Mudunuri, J. Peterson, M. Guyer, A. Felsenfeld, S. Old, S. Mockrin, and F. Collins. 2004. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428: 493-521.
46. Lindblad-Toh, K. 2004. Genome sequencing: three's company. *Nature* 428: 475-476.
47. Guryev, V., K. Saar, T. Adamovic, M. Verheul, S. A. van Heesch, S. Cook, M. Pravenec, T. Aitman, H. Jacob, J. D. Shull, N. Hubner, and E. Cuppen. 2008. Distribution and functional impact of DNA copy number variation in the rat. *Nat Genet* 40: 538-545.
48. Pontynen, N., A. Miettinen, T. P. Arstila, O. Kampe, M. Alimohammadi, O. Vaarala, L. Peltonen, and I. Ulmanen. 2006. Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients. *J Autoimmun* 27: 96-104.
49. Leavy, O. 2010. Regulatory T cells: CD8+ TReg cells join the fold. *Nat Rev Immunol* 10: 680.
50. Meager, A., K. Visvalingam, P. Peterson, K. Moll, A. Murumagi, K. Krohn, P. Eskelin, J. Perheentupa, E. Husebye, Y. Kadota, and N. Willcox. 2006. Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med* 3: e289.
51. Kisand, K., A. S. Boe Wolff, K. T. Podkrajsek, L. Tserel, M. Link, K. V. Kisand, E. Ersvaer, J. Perheentupa, M. M. Erichsen, N. Bratanic, A. Meloni, F. Cetani, R. Perniola, B. Ergun-Longmire, N. Maclaren, K. J. Krohn, M. Pura, B. Schalke, P. Strobel, M. I. Leite, T. Battelino, E. S. Husebye, P. Peterson, N. Willcox, and A. Meager. 2010. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *J Exp Med* 207: 299-308.
52. Ito, T., S. Hanabuchi, Y. H. Wang, W. R. Park, K. Arima, L. Bover, F. X. Qin, M. Gilliet, and Y. J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28: 870-880.
53. Meyer, S., M. Woodward, C. Hertel, P. Vlaicu, Y. Haque, J. Karner, A. Macagno, S. C. Onuoha, D. Fishman, H. Peterson, K. Metskula, R. Uiibo, K. Jantti, K. Hokynar, A. S. B. Wolff, A. p. collaborative, K. Krohn, A. Ranki, P. Peterson, K. Kisand, and A. Hayday. 2016. AIRE-Deficient Patients Harbor Unique High-Affinity Disease-Ameliorating Autoantibodies. *Cell* 166: 582-595.
54. Li, Q., B. Xu, S. A. Michie, K. H. Rubins, R. D. Schrier, and H. O. McDewitt. 2008. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12439-12444.
55. Okui, T., H. Ito, T. Honda, R. Amanuma, H. Yoshie, and K. Yamazaki. 2008. Characterization of CD4+ FOXP3+ T-cell clones established from chronic inflammatory lesions. *Oral microbiology and immunology* 23: 49-54.
56. Larcher, T., A. Lafoux, L. Tesson, S. Remy, V. Thepenier, V. Francois, C. Le Guiner, H. Goubin, M. Dutilleul, L. Guigand, G. Toumaniantz, A. De Cian, C. Boix, J. B. Renaud, Y. Cherel, C. Giovannangeli, J. P. Concordet, I. Anegon, and C. Huchet. 2014. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 9: e110371.
57. Geurts, A. M., G. J. Cost, S. Remy, X. Cui, L. Tesson, C. Usal, S. Menoret, H. J. Jacob, I. Anegon, and R. Buelow. 2010. Generation of gene-specific mutated rats using zinc-finger nucleases. *Methods Mol Biol* 597: 211-225.
58. Picarda, E., S. Bezie, L. Boucault, E. Autrusseau, S. Kilens, D. Meistermann, B. Martinet, V. Daguin, A. Donnart, E. Charpentier, L. David, I. Anegon, and C.

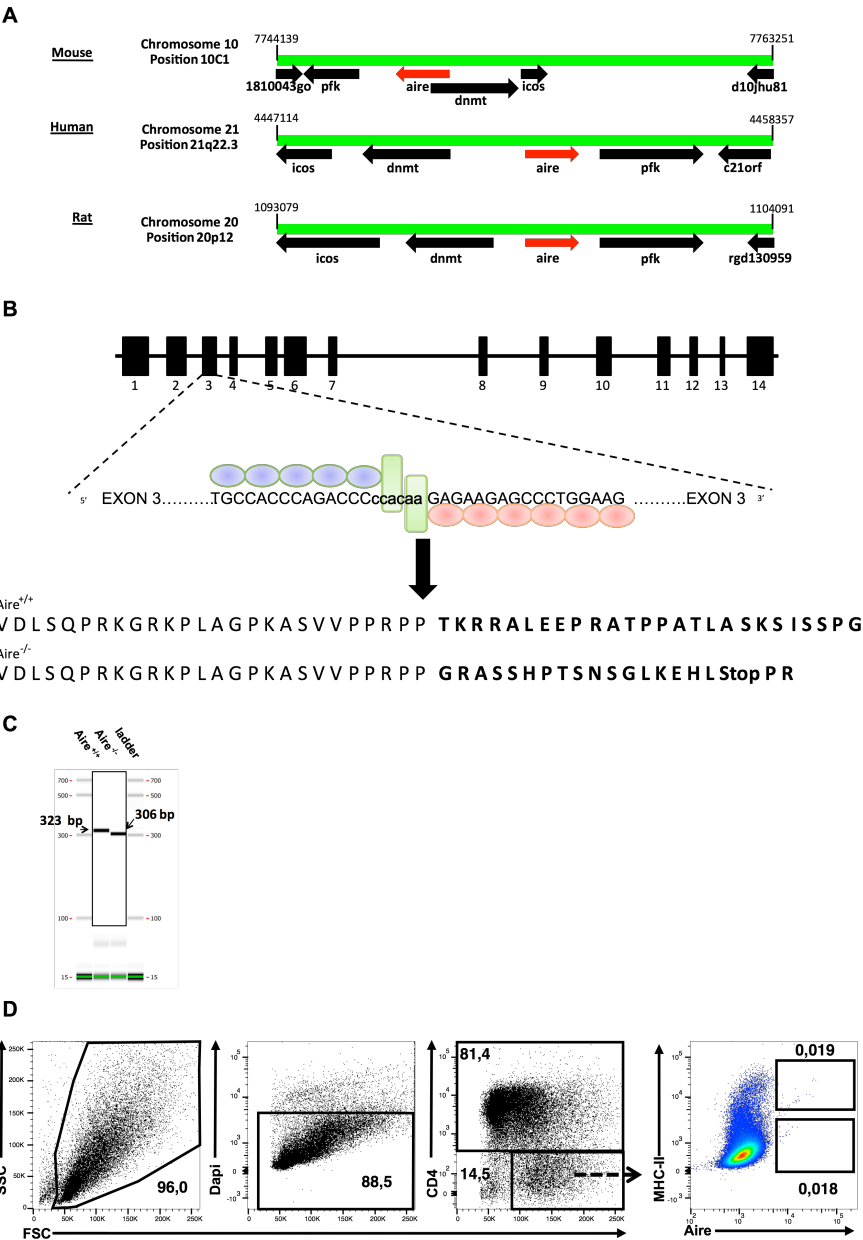
808 Guillonneau. 2017. Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant
809 tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight* 2: e90088.
810
811
812



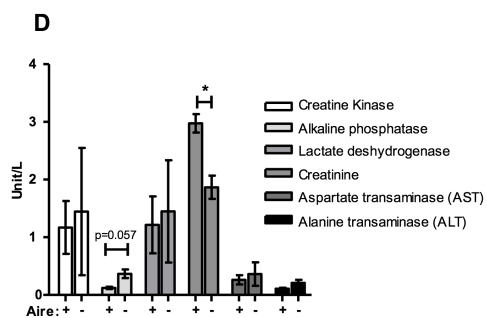
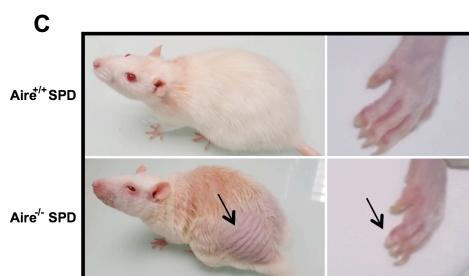
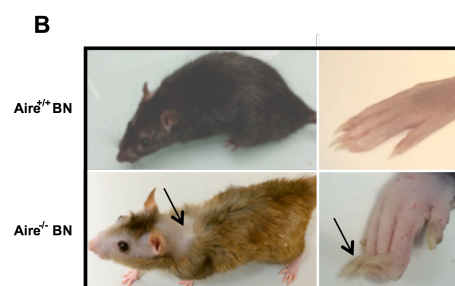
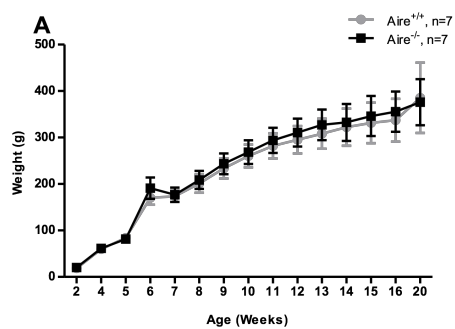
813

814 **Figure 1: Aire is expressed in the rat at both mRNA and protein level in the thymus and**
 815 **in the periphery. A.** mTEC were extracted from the thymus of < 3 month old male SPD rats
 816 and identified as Dapi⁺, CD45⁺ and MHC-II and AIRE expression was analyzed on
 817 permeabilized cells by flow cytometry. One representative experiment out of 3. **B.** *Aire* gene
 818 relative expression was analyzed by RT-qPCR on total tissues of < 6 month old male SPD
 819 rats. Results are expressed as arbitrary unit (A.U.) of the relative expression of *Aire* reported

820 to *Hprt* expression. (n=5-6). **p<0.01 for stomach and ileum versus thymus, ***p<0.001 for
821 duodenum liver, kidney, adrenal gland, muscle and heart versus thymus. **C.** *Aire* gene relative
822 expression was analyzed by RT-qPCR on total MLN or DC-depleted MLN by CD103⁻
823 negative cell sorting of < 6 month old male SPD rats (n=5). Results are expressed as arbitrary
824 unit (A.U.) of the relative expression of *Aire* reported to *Hprt* expression. *p<0.05. **D.** *Aire*
825 gene relative expression was analyzed by RT-qPCR in CD4⁻, CD4⁺ and CD4^{int} conventional
826 DCs, T cells, B cells and epithelial cells in MLN of < 6 month old male SPD rats (n=3-5).
827 Results are expressed as arbitrary unit (A.U.) of the relative expression of *Aire* reported to
828 *Hprt* expression. ***p<0.001. **E.** Thymus and MLN sections of < 6 month old male SPD rats
829 were stained for Dapi (blue), AIRE (green), MHC-II (red) and EpCAM (pink) by
830 immunofluorescence. Results show one representative experiment of 4. Merge indicate
831 overlapping Dapi, AIRE, MHCII and EpCam. Magnification x120.
832

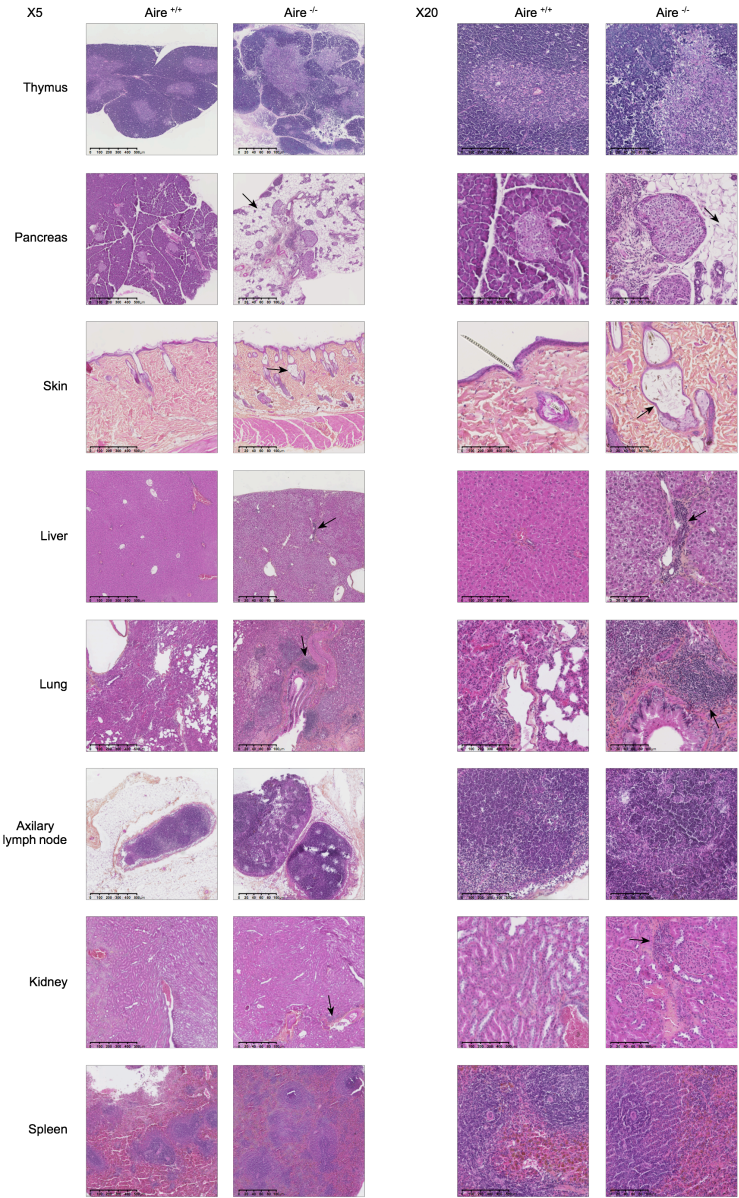


835 **Figure 2. Generation of AIRE-deficient rats using ZFNs.** A. Illustration of the *Aire*
836 chromosomal gene region (green) in mouse, human and rat. Black arrows indicate the position
837 and reading frame of genes. Red arrows indicate the position and reading frame of *Aire* locus.
838 **B.** Schematic showing that the *Aire* gene was disrupted in the NLS sequence present in exon
839 3. Black boxes and numbers indicate the different exons. Zinc finger binding motifs are in
840 blue and red. FokI nuclease is represented in green. **C.** Genotyping result from tail genomic
841 DNA following automated microfluidic chip capillary electrophoresis system. Scale in base
842 pair (bp). The two amplicons obtained with a PCR flanking the target sequence and the one
843 from the *Aire*^{-/-} animal shows a reduced size vs. the wild-type due to the deletion generated.
844 **D.** AIRE expression was analyzed in mTEC from thymus of *Aire*^{-/-} of < 3 month old male
845 SPD rats. mTEC were extracted from the thymus of *Aire*^{-/-} rats and stained for Dapi and
846 CD45. MHC-II and AIRE expression were analyzed on Dapi⁺CD45⁻ cells by flow cytometry
847 (representative of 4 different animals).
848



849

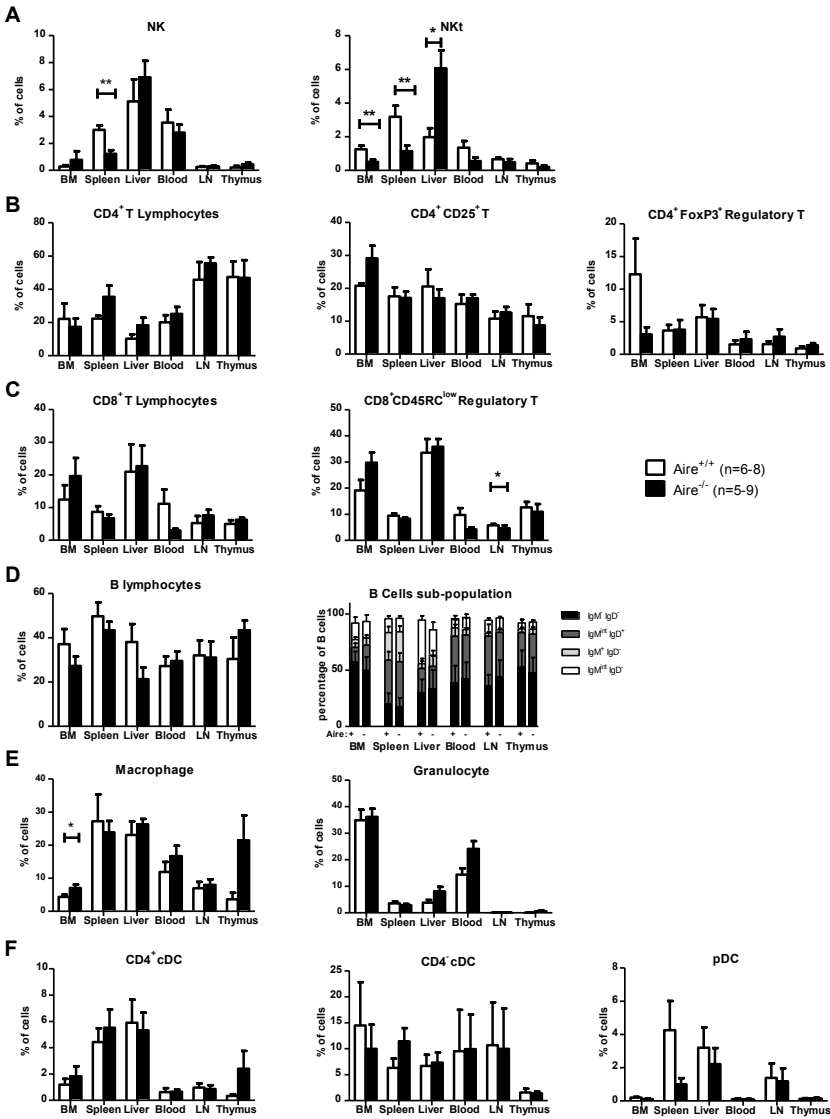
850 **Figure 3. *Aire*^{-/-} rats from Brown Norway and Sprague Dawley strains showed severe**
851 **autoimmune symptoms. A.** Weights of *Aire*^{-/-} and *Aire*^{+/+} littermate SPD male and female
852 rats were measured every month during 20 weeks following birth. Results are shown as the
853 mean weight $\pm$ SEM (n=7). **B-C.** Picture showing visual aspect of > 1 years old male Brown
854 Norway *Aire*^{-/-} (**B**, bottom row) and *Aire*^{+/+} (**B**, top row) littermate rats and male Sprague
855 Dawley *Aire*^{-/-} (**C**, bottom row) and *Aire*^{+/+} (**C**, top row) littermate rats. General aspect (left)
856 and enlargement on the paw (right). Arrows indicate alopecia, vitiligo and nail dystrophy. **D.**
857 Plasma enzymes were quantified in the sera of > 1 years old male and female BN rats. Results
858 are shown as unit/L for each enzyme (n=3-4; *p<0.05).
859



862 **Figure 4. *Aire*^{-/-} rats exhibit severe auto-immune lesions.** Thymus, pancreas, skin, liver,
863 lung, axillary lymph node, kidney and spleen sections of *Aire*^{+/+} and *Aire*^{-/-} >12 month old
864 male and female BN rats were stained with HES. We show here representative sections of the
865 histological lesions of *Aire*^{-/-} rats compare to their wt littermate counterparts. Left panel:
866 enlargement x5, left column: *Aire*^{+/+}, right column: *Aire*^{-/-}, right panel: enlargement x20, left
867 column: *Aire*^{+/+}, right column: *Aire*^{-/-} (n=10-12).

868

869



871

872 **Figure 5. Cell subsets distribution remained largely unaffected by AIRE-deficiency.**

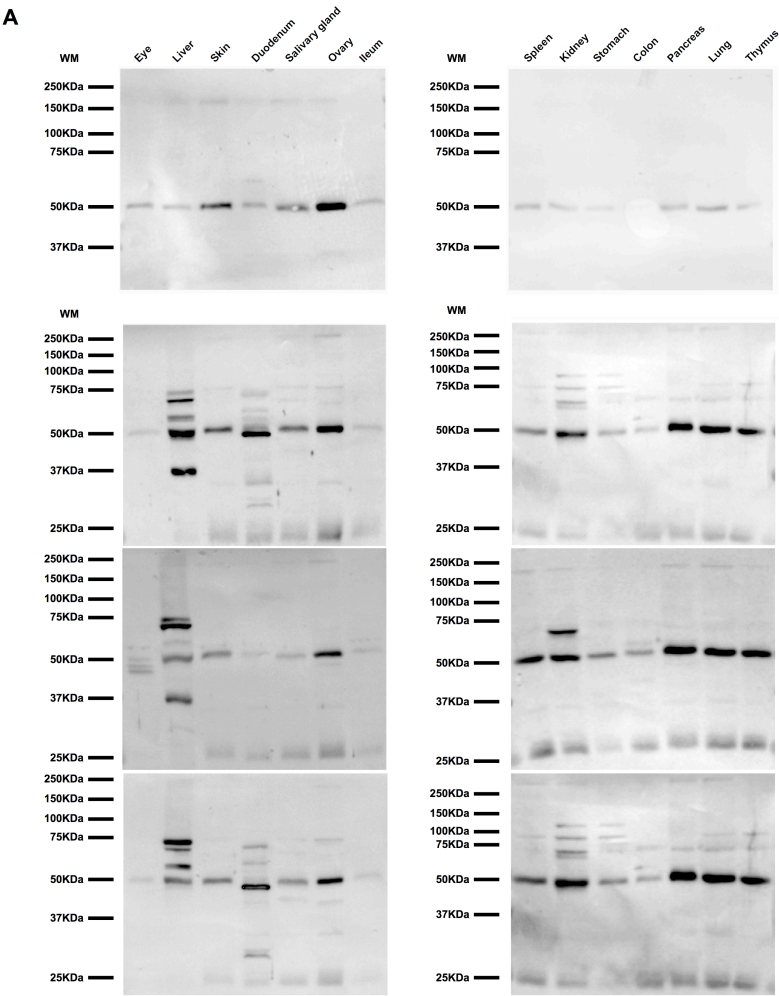
873 Percentage of cell subsets were analysed in bone marrow (BM), spleen, liver, blood, lymph

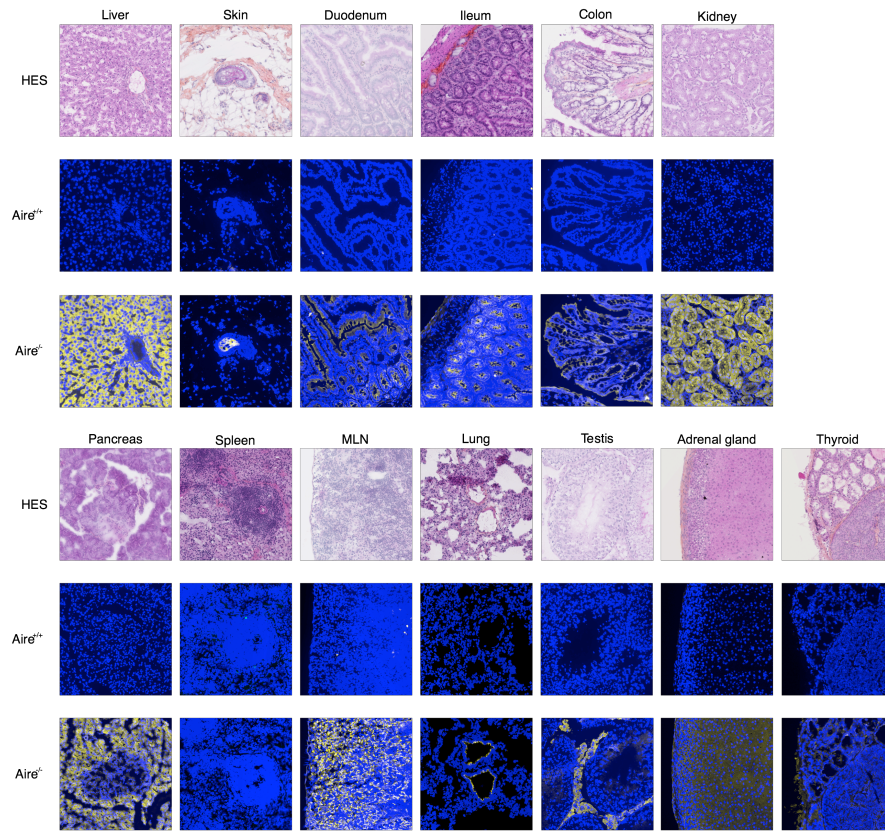
874 node (LN) and thymus of > 12 months old male and female BN rats using markers as

875 described in the material and methods section. **A.** NK and NKT cells were represented as
876 percentage of living cells for each organ. **B.** CD4⁺ T cells, CD4⁺CD25⁺ T cells and
877 CD4⁺Foxp3⁺ Tregs were represented as percentage of living TCR⁺ cells. **C.** CD8⁺ T cells and
878 CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were represented as percentage of living TCR⁺ cells. **D.** B cells and B
879 cells subpopulations according to IgM and IgD markers were represented as a percentage of
880 living cells for each organ. **E.** Macrophages and granulocytes were represented as a
881 percentage of living cells for each organ. **F.** CD4⁺ cDCs, CD4⁻ cDCs and pDCs were gated on
882 living TCR⁻ cells. **A-F.** *Aire*^{+/+} (open bars, n=6-8) and *Aire*^{-/-} (filled bars, n=5-9) percentages
883 are shown as bar graphs representing mean ± SEM; *p<0.05, **p<0.01; Mann-Whitney test.

884

885





888

889 **Figure 6. *Aire*^{-/-} rats displayed numerous circulating organ-specific auto-antibodies. A.**

890 Sera from >12 months old *Aire*^{+/+} or *Aire*^{-/-} littermate male and female BN rats were incubated

891 on western blot membranes following migration of individual organs (eye, liver, skin,

892 duodenum, salivary gland, ovary, ileum, spleen, kidney, stomach, colon, pancreas, lung and

893 thymus) from Rag^{-/-} rat. Results are expressed as histogram of the mean ± SEM number of

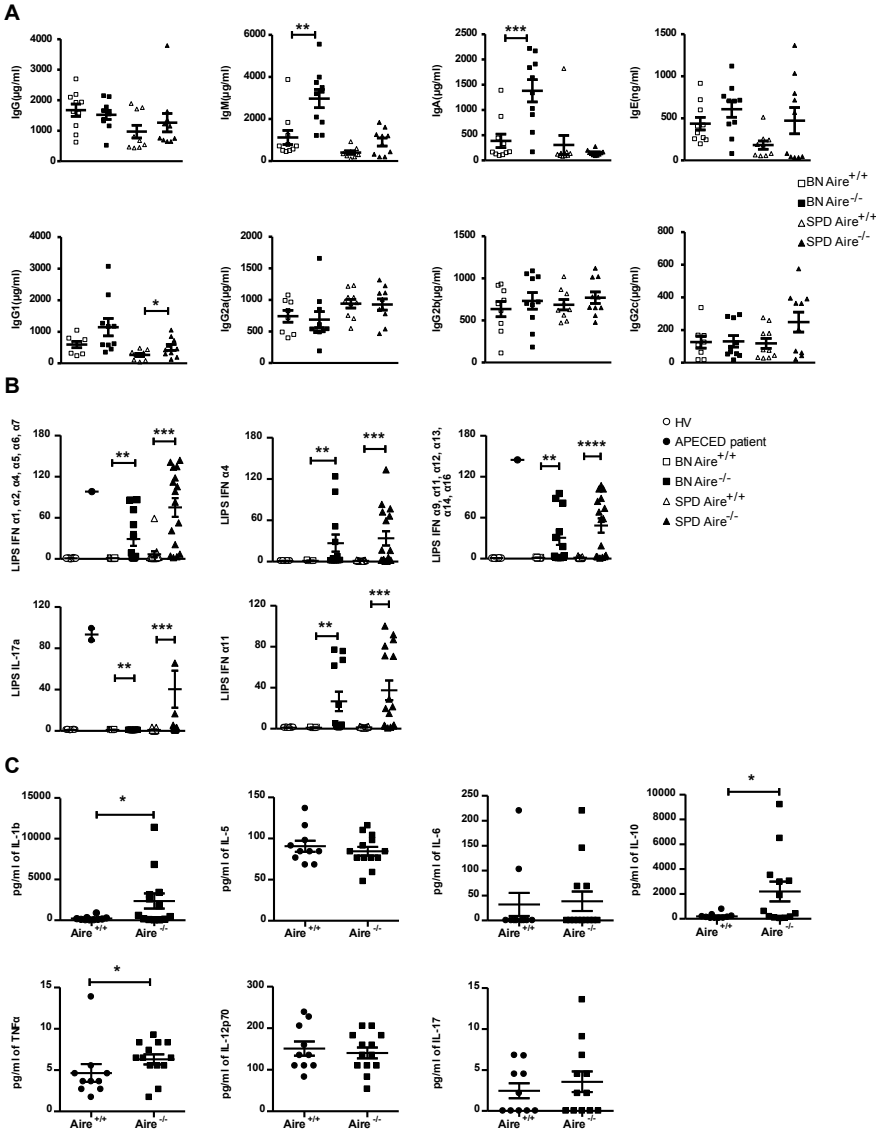
894 proteins targeted by auto-antibodies with *Aire*^{+/+} (open bars; n=3) or *Aire*^{-/-} (filled bars; n=9)

895 sera; *p<0.05; one tailed Mann-Whitney test. B. Liver, skin, duodenum, ileum, colon, kidney,

896 pancreas, spleen, MLN, lung and testis sections of an *IgM*^{-/-} >6 months old male rat were

897 stained with HES (top row), Dapi (blue) and *Aire*^{+/+} sera (yellow) (middle row) or Dapi (blue)

898 and *Aire*^{-/-} sera (yellow) (bottom row) >6 months old male and female BN rats (x20). Data are
899 representative of 4 different experiments.
900



902

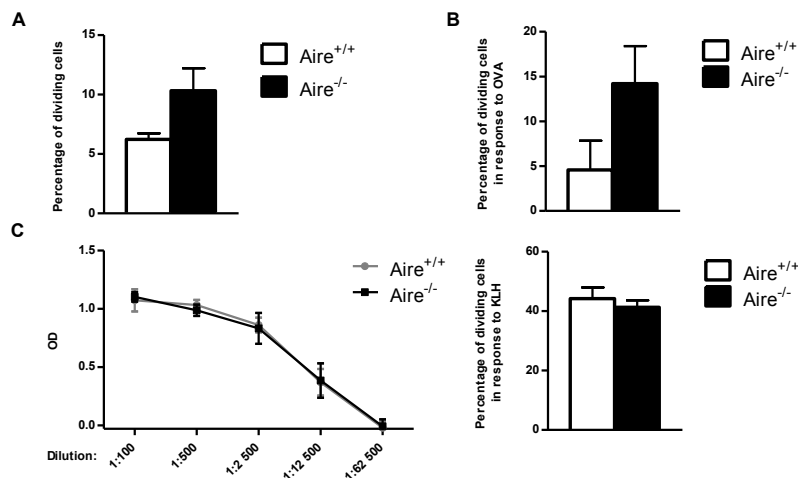
903 **Figure 7. Autoimmune symptoms correlate with significant auto-antibodies production**

904 **in *Aire*^{-/-} rats. A.** IgG, IgM, IgA, IgE and IgG subtypes 1, 2a, 2b and 2c concentration were

905 assessed by ELISA in BN and SPD *Aire*^{-/-} and *Aire*^{+/+} sera. Each dot represent the

906 concentration ($\mu\text{g/L}$) for one animal, errors bars indicate SEM values ($n=9-10$) $**p<0.01$,
 907 $***p<0.001$ One tailed Mann Whitney test. **B.** Antibodies to IFN α 1, α 2, α 4, α 5, α 6, α 7, α 9,
 908 α 11, α 12, α 13, α 14, α 16 and IL-17a were tested using LIPS analysis in *Aire*^{+/+} or *Aire*^{-/-} sera
 909 from BN or SPD rats compare to healthy volunteers (HV) or APECED. Each dot represent a
 910 luminescence value (LU) for one individual, errors bars indicate SEM values ($n=7-16$)
 911 $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ One tailed Mann Whitney test. **C.** Multi-analyte
 912 profiling was used to detect cytokines concentration in *Aire*^{+/+} or *Aire*^{-/-} rat sera. Levels of IL-
 913 1 β , IL-5, IL-6, IL-17, IL-10, TNF- α , IL-12p70, IL-4 and IFN- γ were assessed in the sera of
 914 BN rat strain. Level of IL-4 and IFN- γ were not detectable. Results are shown as dot plot
 915 graphs representing concentration (pg/mL) $\pm$ SEM $*p<0.05$; one tailed Mann-Whitney test.
 916

Figure 8. Ossart et al.



917

918 **Figure 8. A biased primary T cell response to self and non-self, but not secondary**
 919 **response was observed in AIRE-deficient rats.** T cells from the draining lymph nodes were
 920 collected 11 days after KLH immunization in the footpad. **A.** CFSE-labeled T cells from *Aire*^{-/-}
 921 ^{-/-} or *Aire*^{+/+} of < 6 months old male SPD rats were incubated for 4 days in presence of non-T
 922 cells from *Aire*^{+/+} of < 6 months old male SPD rats and analyzed for their proliferation. Bar
 923 graphs show the mean ± SEM percentage of dividing cells (n=3-4). **B.** CFSE-labeled T cells
 924 from *Aire*^{-/-} or *Aire*^{+/+} of < 6 months old male SPD rats were incubated for 4 days in presence
 925 of non-T cells from *Aire*^{+/+} rats and OVA and analyzed for their proliferation. Background T
 926 cells proliferation in absence of OVA was subtracted and results are expressed as mean
 927 percentage of dividing cells in response to OVA ± SEM (n=4-6). **C.** Left, Presence of anti-
 928 KLH-specific antibodies was assessed by ELISA. Optical density was measured for different
 929 sera dilution (x axis) (n=3) in *Aire*^{-/-} or *Aire*^{+/+} of < 6 months old male SPD rats 11 days after
 930 immunization. Right, CFSE-labeled T cells from *Aire*^{-/-} or *Aire*^{+/+} of < 6 months old male
 931 SPD rats were incubated for 4 days in presence of non-T cells from *Aire*^{+/+} of < 6 months old
 932 male SPD rats and KLH and analyzed for their proliferation. Background T cells proliferation

933 in absence of KLH was subtracted and results are expressed as mean percentage of dividing
934 cells in response to KLH $\pm$ SEM (n=4-6).
935

936 **Table 1. Gender and litter are not affected by AIRE-deficiency in contrast to organs**
937 **displaying autoimmune lesions. A.** Percentage of gender and percentage of litter with
938 *Aire*^{+/+}, *Aire*^{+/-} and *Aire*^{-/-} genotype was analyzed. **B.** Percentage and severity mean was
939 assessed in organs from 34 females and 35 males. Severity mean was evaluated on a scale of
940 0 to 5: 0: no lesions; 1: moderate lesions on less than 10% of surface area; 2: moderate lesions
941 on 10-50% of surface area; 3: large lesions on greater than 50% area; 4: severe lesions on
942 greater than 80% surface area and 5: total organ destruction or severe lesions on total surface
943 area.

A

Gender	Genotype	Percentage
Female (49.3%)	<i>Aire</i> ^{+/+}	20.6
	<i>Aire</i> ^{+/-}	52.9
	<i>Aire</i> ^{-/-}	26.5
Male (50.7%)	<i>Aire</i> ^{+/+}	34.3
	<i>Aire</i> ^{+/-}	45.7
	<i>Aire</i> ^{-/-}	20

B

	Percentage of organs with auto-immune lesions (%)	Severity mean
Pancreas	79	4/5
Skin	85	3/5
Liver	92	2/5
Lung	82	2/5
Salivary gland	0	0/5
Testis	0	0/5
Ovary	29	1/5
Lymph node	64	1/5
Stomach	25	1/5
Duodenum	0	0/5
Ileum	0	0/5
Colon	0	0/5
Kidney	50	1/5
Eye	0	0/5
Adrenal gland	0	0/5
Peyer patches	60	1/5
Spleen	37.5	1/5
Thyroid	0	0/5

944

945

946 **Table 2. Expression of APECED autoantigens in AIRE-deficient thymus.** *Aire*^{+/+} and
 947 *Aire*^{-/-} thymus were analyzed by DGE-RNAseq for expression of genes. Results are presented
 948 as Log2Fold Change and p value. *, p<0.05.

Symbol	Name	Organ target	Log2 Fold change	P value
Ins2	Insulin 2	Pancreas	-2.65	0.0595
Cst8	Cystatin-8	Testis	-1.51	
Reg3b	Regenerating Islet-derived 3 beta	Heart	-8.21	*
Pyy	Peptide tyrosine tyrosine	Intestin	-5.18	*
Nts	Neurotensin	Intestin	-3.36	*
Tac3	Tachykinin 3	Placenta	-5.05	*
Mt4	Metallothionein 4	Lung	-5.03	*
Tff1	Trefoil factor 1	Stomach	-1.11	
Pgc	Progastricsin	Stomach	-0.62	
Crabp1	Cellular retinoic acid binding protein 1	Uterus / Testis	-2.23	*
Gal	Galanin and GMAP prepropeptide	Brain	-5.23	*
Sst	Somatostatin	Brain	-4.11	*
Camp	Cathelicidin antimicrobial peptide	Spleen	-0.42	
Ppy	Pancreatic polypeptide	Pancreas	-0.34	
Ltf	Lactotransferrin	Bone marrow	-6.16	*
Mt3	Metallothionein 3	Brain	-1.98	0.0571
Gip	Gastric inhibitory polypeptide	Duodenum	-4.64	*
Upk3a	Uroplakin 3A	Kidney	-3.33	
Calb2	Calbindin 2	Brain	-1.05	
Cryaa	Crystallin alpha A	Spleen	-2.64	0.0593
Cym	Chymosin	Spleen	-1.28	
Mcpt2	Mast cell protease 2	Lung	-1.26	
Tg	Thyroglobulin	Thyroid	-2.74	
Tph1	Tryptophan Hydroxylase 1	Brain	-0.51	

949

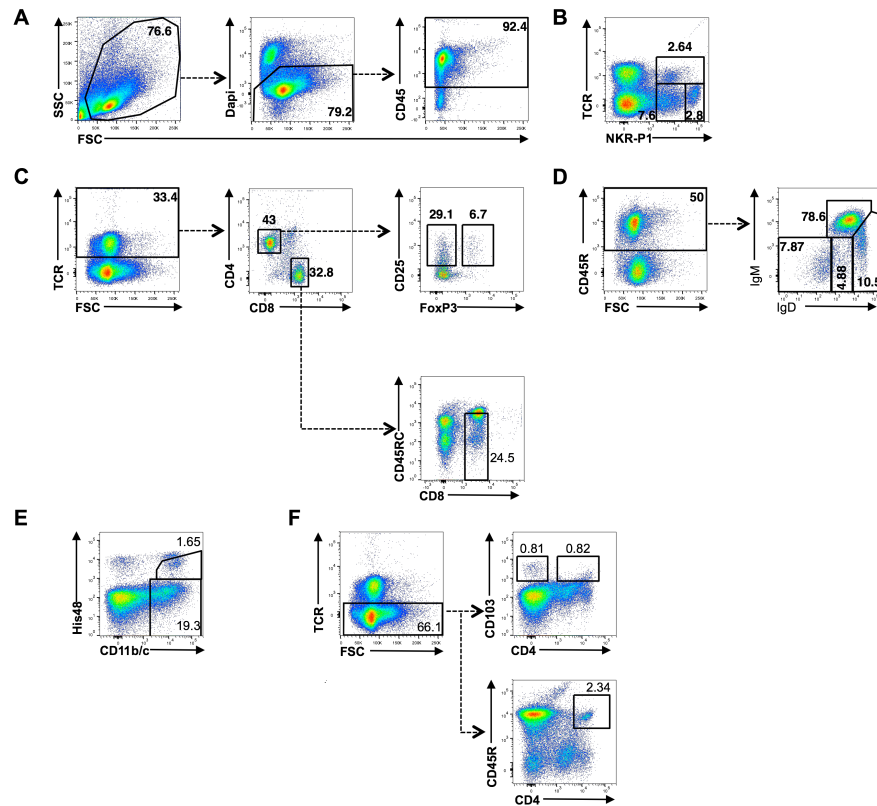
950

951 **Table 3. Summary of the similarities and differences between AIRE-deficient human,**
952 **mouse and rat.**

	Human	Mouse		Rat
		NOD	Others	BN and SPD
Locus similarity		80% to human	80% to human	90% to human
Clinical symptoms	++++	++++	++	+++ with alopecia, viligo and nail dystrophy
Triad: hypoparathyroidism, adrenal failure, and candidiasis susceptibility	Yes	No	No	Autoantibodies to thyroid and adrenal gland. Candidiasis could not be assessed
Infertility	Women	Fertile crossed with WT mice, homozygous crossing produced offspring only occasionally		Fertile crossed with WT rats, homozygous crossing rarely produced offspring
Organs affected				Thymus and pancreas
Auto-reactive T cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Auto-antibodies (% of affected)	Yes	Liver (100%) Pancreas (100%) Kidney (100%) Stomach (100%)	Background and individual dependant	Liver (100%); Pancreas (33.33%); Kidney (88.89%); Stomach (11.11%); Eye (11.11%); Skin (66.67%); Duodenum (88.89%); Salivary gland (44.44%); Ovary (66.67%); Ileum (11.11%); Spleen (22.22%); Colon (11.11%); Lung (55.56%); Thymus (33.33%)
Specific auto-antibodies	Positive against type-II IFNs, Th17 cytokines, GAD1, GAD2, DDC, TGM4, GIF, HSD3B2, BPIFB1, TSGA10, CYP1A, KCNRG, AQP2, IFN ω , IFN α , IL-22, IL17F, IL17A, IFN β , IFN γ	Positive against mucin 6 and afodrin	Negative against: Gad65, Cyp1a, insuline, Atp4a, enolase I, II, III, Hsp90, 21-OH, 17-OH, TPH, p450ssc, AADC, IA2, ANA	Negative against Magea4, Magea10, Magea2 and Pdilt. Positive against Tgm4, IL-6, IFN α 4, IFN α 11 and IL-17a
Expression of Aire in peropheral DCs	Yes	Controversial		Yes

953

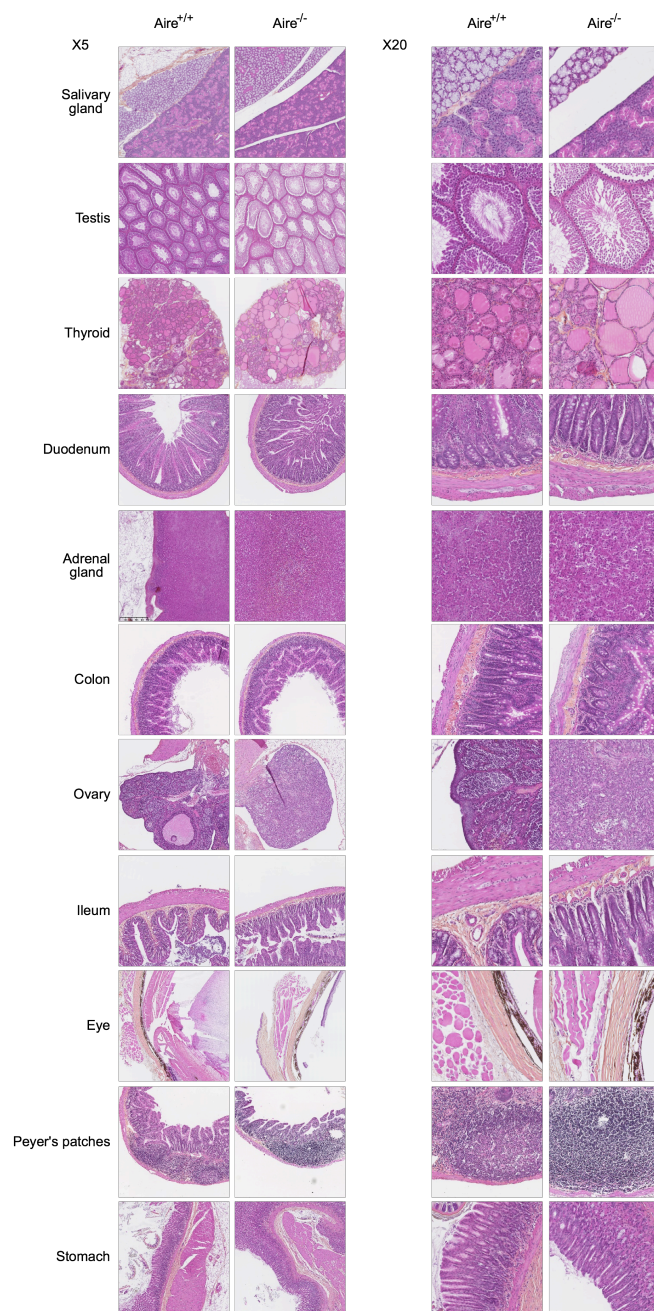
954



955

956 **Fig. suppl 1.** Gating strategy used for FACS analysis showed in figure 5. **A.** General strategy
 957 used for the analysis of all subsets gated among living cells CD45⁺. Gating strategy for **B.** NK
 958 cells (TCR⁻NKR-P1^{hi}) and NKT cells (TCR⁺NKR-P1⁺); **C.** CD4⁺ T lymphocytes
 959 (TCR⁺CD4⁺), CD4⁺CD25⁺ T (TCR⁺CD4⁺CD25⁺), CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T
 960 (TCR⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), CD8⁺ lymphocytes (TCR⁺CD8⁺) and CD8⁺CD45RC^{low}
 961 regulatory T (TCR⁺CD8⁺CD45RC^{low}); **D.** B lymphocytes (CD45RA⁺) and B cells sub-
 962 population (based on IgM and IgD expression); **E.** macrophages (CD11b/c⁺) and granulocytes
 963 (CD11b/c⁺His48^{int}); **F.** CD4⁺ cDC (TCR⁻CD103⁺CD4⁺), CD4⁺ cDC (TCR⁻CD103⁺CD4⁺) and
 964 pDC (TCR⁻CD45R⁺CD4⁺).

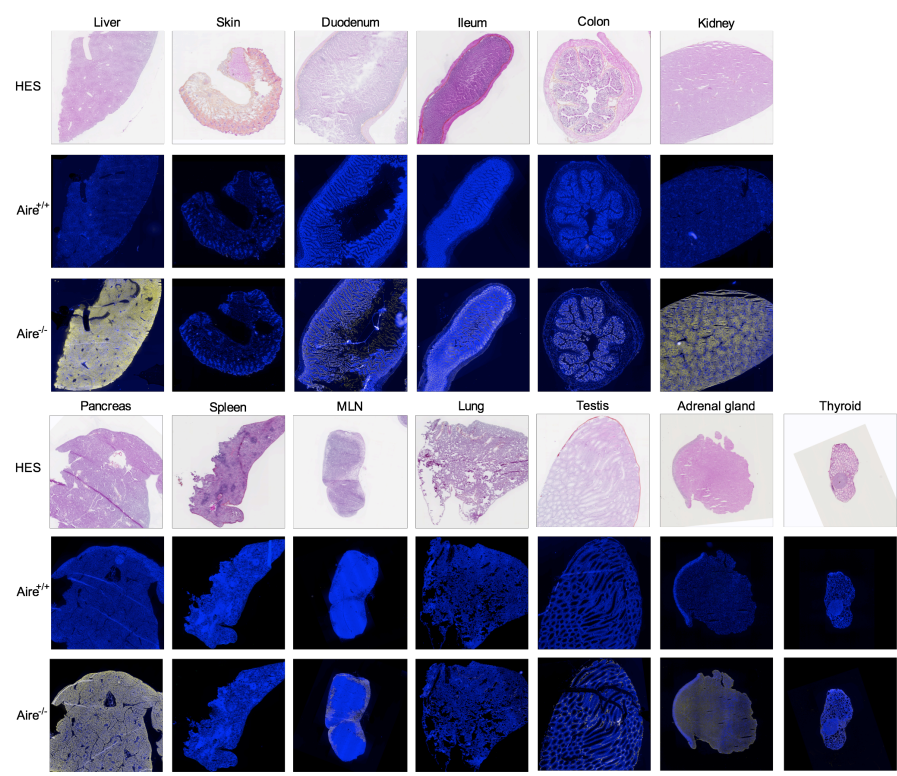
965



966

54

967 **Fig. suppl. 2. Histological analysis of organs without auto-immune lesions.** Salivary gland,
 968 testis, thyroid, duodenum, stomach, ovary, ileum, ovary, ileum, eye, adrenal gland and colon
 969 sections of Aire^{+/+} and Aire^{-/-} rats were stained with HES. Here is shown representative
 970 sections showing the histology of Aire^{-/-} rats compare to their littermate counterpart. Left
 971 panel: enlargement x5, left column: Aire^{+/+}, right column: Aire^{-/-}, right panel: enlargement
 972 x20, left column: Aire^{+/+}, right column: Aire^{-/-} (n=10-12).



973
 974 **Fig. suppl. 3. Aire^{-/-} rats displayed numerous circulating organ-specific auto-antibodies.**
 975 Liver, skin, duodenum, ileum, colon, kidney, pancreas, spleen, MLN, lung and testis sections
 976 of IgM^{-/-} rats were stained with HES (top row), Dapi (blue) and Aire^{+/+} sera (yellow) (middle
 977 row) or Dapi (blue) and Aire^{-/-} sera (yellow) (bottom row) (x2.5). Data are representative of 4
 978 different experiments.

Résumé de l'article 1

La déficience pour Aire chez l'Homme conduit au développement d'une maladie auto-immune généralisée sévère nommée APECED. A l'heure actuelle, aucun traitement étiologique n'est disponible pour soigner cette maladie. Plusieurs modèles de déficience pour Aire ont été générés chez la souris mais bien qu'ils aient permis de comprendre le rôle de Aire dans la tolérance centrale, ils ne reproduisent pas efficacement le syndrome APECED. C'est pourquoi il y a un besoin de développer un modèle animal développant une maladie plus semblable à l'APECED. Dans cet article, nous avons étudié le potentiel du rat pour être ce modèle. Nous avons démontré que chez le rat, Aire est exprimé dans le thymus par les cellules mTECs CMH II⁺ et CMH II⁻ mais également en périphérie par les cellules dendritiques conventionnelles CD4^{int}. Nous avons généré le premier modèle de rat déficient pour Aire en utilisant la technologie des nucléases à doigt de zinc et avons démontré que les animaux Aire^{-/-} présentent plusieurs des symptômes clés de l'APECED, indépendamment du fond génétique, comme l'alopecie, la dépigmentation de la peau ainsi que l'ongulo-dystrophie. Nous avons observé de nombreuses lésions auto-immunes dans un large panel d'organes, en particulier dans le pancréas et identifié de nombreux auto-anticorps contre les organes ou contre des cytokines à des niveaux équivalents à ceux retrouvés chez les patients APECED. Finalement, nous avons démontré un biais dans la réponse anticorps vers les isotypes IgM et IgA ainsi que de la réponse primaire T contre le soi et le non-soi. En conclusion, nous avons démontré que le rat déficient pour Aire est le premier modèle animal d'APECED ouvrant de nouvelles opportunités pour tester des traitements pour cette maladie.

B. Article Aire et Tregs rat / humain

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de Aire sur les Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et CD8⁺CD45RC^{low}. Aux vues des observations faites chez les patients et des fonctions connues de Aire, notre hypothèse était que Aire joue un rôle important sur la fonction des Tregs. Nous avons donc effectué des expériences de suppression *in vitro* et *in vivo* dans différents contextes d'allo- ou d'auto-réactivité afin de tester cette hypothèse. Une autre partie de ce travail consiste à étudier le répertoire TCR des Tregs, en effet, les analyses de répertoire chez les animaux déficients pour Aire ont été réalisées sur l'ensemble du compartiment T ou sur des répertoires restreints avec une chaîne TCR bêta fixe. Le répertoire TCR des Tregs n'avait donc jamais été étudié jusqu'à présent. Pour cela, nous

avons réalisé des expériences d'immunoscope permettant d'analyser de manière qualitative la distribution du répertoire et également des expériences de séquençage du TCR qui permet une analyse quantitative du répertoire. Enfin, le dernier objectif de ce travail est d'étudier la cinétique du rejet de greffe chez des animaux présentant un biais du répertoire Tconv vers l'auto-immunité. L'ensemble de ces objectifs ainsi que les stratégies expérimentales pour les résoudre sont décrits en détails en B.

I-Les Tregs issus d'animaux Aire^{-/-} présentent une altération de leurs fonctions suppressives.

Dans l'article 1, nous avons étudié la répartition en fréquence ainsi qu'en nombre absolu des populations de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ et CD8⁺CD45RC^{low} dans la moelle osseuse, la rate, le foie, le sang, les ganglions et le thymus. Nous n'avons pas observé d'anomalie au niveau de leur distribution. Dans cette étude, nous proposons d'étudier la fonction suppressive de ces deux populations de nTregs. Dans un premier temps, nous avons analysé la fonction suppressive *in vitro* dans un contexte allogénique. Pour cela, nous avons trié des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ (Teff) à partir des splénocytes extraits de la rate d'animaux Aire^{+/+} littermate SPD (âgés de plus de 6 mois). Les cellules utilisées pour la stimulation allogénique sont des pDCs triées au FACS ARIA à partir de splénocytes déplétés en lymphocytes T et B. Nous utilisons des pDCs malgré leur faible capacité de CPA car nous avons montré que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} ont une interaction préférentielle avec les pDCs et qu'elles jouent un rôle important dans leurs mécanismes de suppression (Li et al., 2010). Les Teffs sont marqués au CFSE ce qui nous permet d'analyser la dilution de ce marqueur après 6 jours de culture. A chaque division cellulaire, l'intensité de fluorescence du CFSE est divisée entre les cellules filles, cette intensité nous permet alors d'identifier les cellules ayant proliférées pendant la culture. Nous utilisons un ratio de 1 pDC pour 2 Teffs ce qui induit une prolifération à J 6 de 50 à 70% des cellules (résultats non montrés). Afin de tester la capacité suppressive des Tregs, nous utilisons des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} ou des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} triés également à partir des splénocytes d'animaux Aire^{-/-} ou Aire^{+/+} littermate syngéniques vis-à-vis des Teffs. Avant culture, les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} sont marquées au CPD-405 (Cell Proliferation Dye), un marqueur de prolifération qui émet une fluorescence à la même longueur d'onde que le DAPI. Ce marquage permet dans notre stratégie d'analyse d'exclure les Tregs CD4.

Nous avons testé plusieurs ratios Teffs / Tregs afin de déterminer si la suppression est dose-dépendante. Après 6 jours de culture, les cellules sont marquées avec des anticorps anti-TCR et anti-CD4 puis analysées par cytométrie en flux.

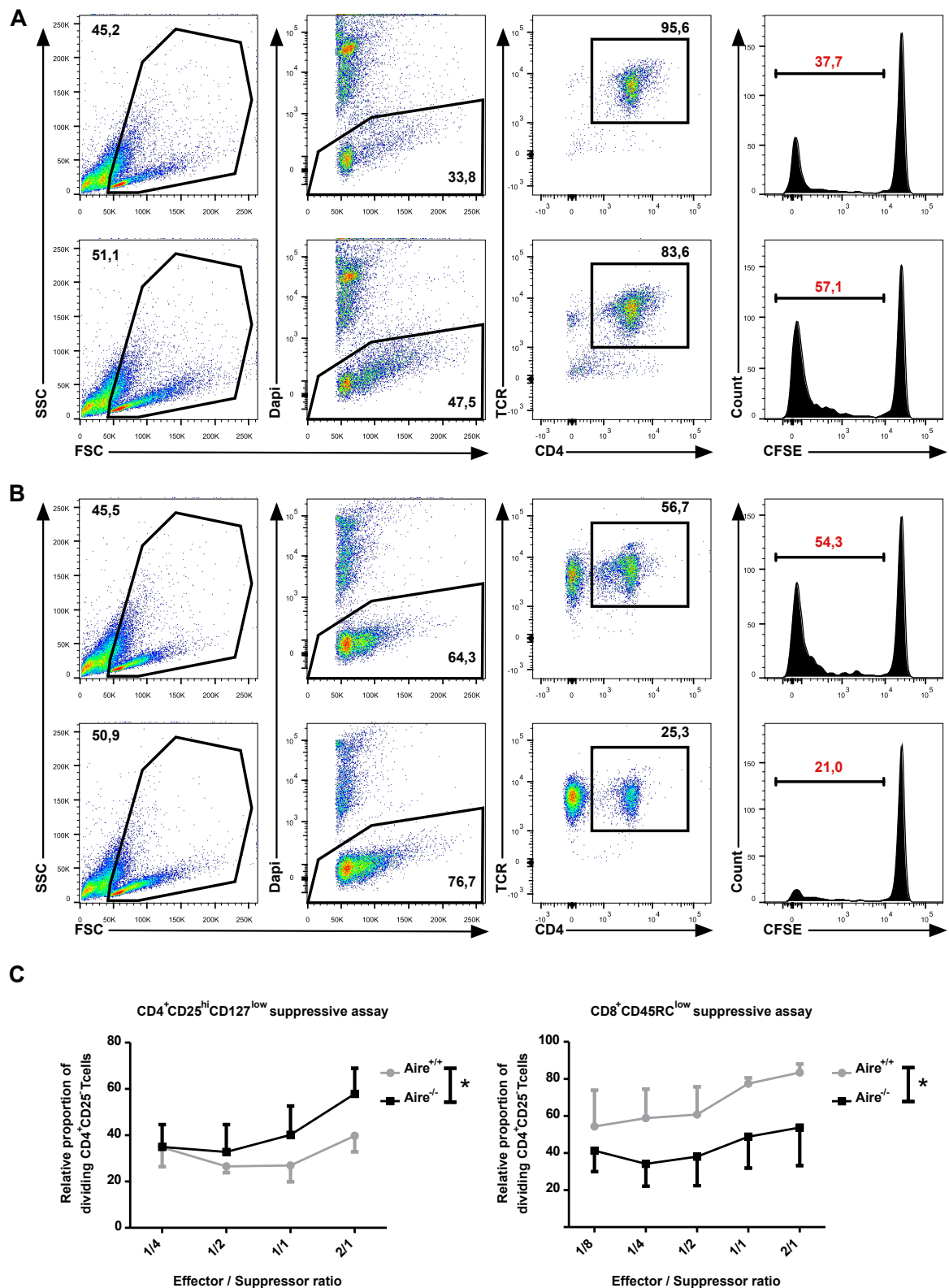


Figure 16 Les Tregs d'animaux Aire^{-/-} SPD âgés de plus de 6 mois issus de la rate ont une capacité suppressive altérée *in-vitro*. Après 6 jours de co-culture *in vitro*, les cellules sont analysées par cytométrie de flux, chaque condition est réalisée en triplicat A. Stratégie d'analyse représentative d'un ratio pour une co-culture avec des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} issus d'un animal Aire^{+/+} (ligne supérieure), ou d'un animal Aire^{-/-}

(ligne inférieure). B. Stratégie d'analyse représentative d'un ratio pour une co-culture avec des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus d'un animal Aire^{+/+} (ligne supérieure), ou d'un animal Aire^{-/-} (ligne inférieure). C. Graphique résumant les résultats de 4 expériences indépendantes. Les résultats sont donnés pour plusieurs ratios et représentés en proportion relative de lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ ayant subi une ou plusieurs divisions durant la culture (n=4), * p<0.05.

Nous avons pu observer dans ce modèle de suppression, pour 4 animaux Aire^{-/-} en comparaison de 4 animaux Aire^{+/+} littermate, que les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} issus d'animaux Aire^{-/-} ont une capacité suppressive inférieure à celle issus d'animaux Aire^{+/+}. Dans l'expérience représentative pour un ratio montré en Figure 16 A, seul 37,7% des Teffs ont proliférés lorsqu'ils sont cultivés avec les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} d'un animal Aire^{+/+} alors que 57,1% ont proliférés pour le même ratio avec les Tregs d'un animal Aire^{-/-}. Le bilan pour 4 expériences indépendantes montre que cette diminution de fonction est statistiquement significative p<0,05 (Figure 16 C, Gauche). Pour les expériences de suppression par les Tregs CD8⁺CD45RC^{low}, nous observons le résultat inverse, c'est-à-dire que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus d'animaux Aire^{-/-} sont capables d'inhiber plus fortement la prolifération des Teffs comparé aux Aire^{-/-}. Dans l'expérience représentative en figure 16 B, 54,3% de prolifération avec les Tregs du Aire^{+/+} contre 21% pour les cellules du Aire^{-/-}. L'analyse statistique pour l'ensemble de ces 4 expériences indépendante confirme une augmentation statistiquement significative de la capacité suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus d'animaux Aire^{-/-} comparé au Aire^{+/+} p<0.05 (Figure 16 C, droite).

En conclusion, cette expérience nous a permis de montrer que les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} issues de rat Aire^{-/-} ont une capacité suppressive *in vitro* amoindrie comparé aux rats WT littermates. De manière opposée, les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus d'animaux Aire^{-/-} démontrent une capacité suppressive supérieure à celle des rats WT littermates (Figure 16). Ces résultats sont les premiers montrant une altération de la capacité suppressive des Tregs *in vitro* dans un modèle animal de déficience pour Aire.

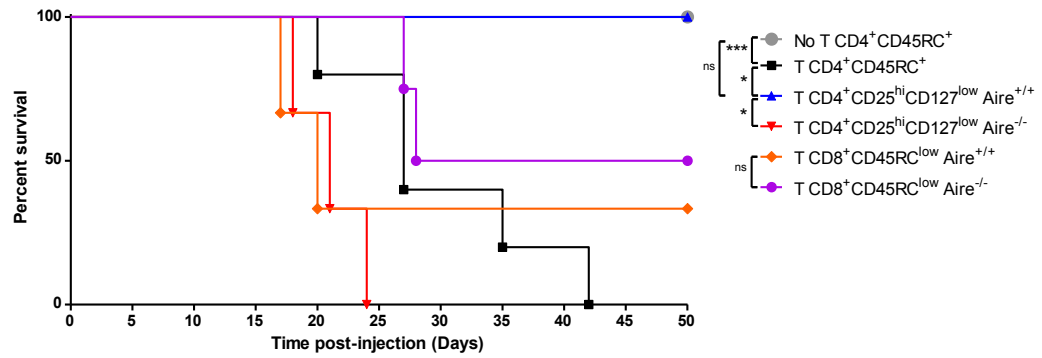
Ceci suggère premièrement que Aire joue un rôle dans l'établissement de la fonction des Tregs chez le rat. A ce stade d'analyse, il nous est impossible de savoir à quoi est dû ce défaut de fonction. De plus, le fait que les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} soient moins suppressifs alors que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} sont plus suppressifs suggère que le rôle de Aire sur ces Tregs est totalement différent. Cette expérience *in-vitro* ne permet de tester

qu'un seul aspect de la fonction des Tregs. En effet, la capacité de migration par exemple n'est pas étudiée dans cette expérience. De plus nous analysons la capacité des Tregs à supprimer une réaction dans un contexte allogénique.

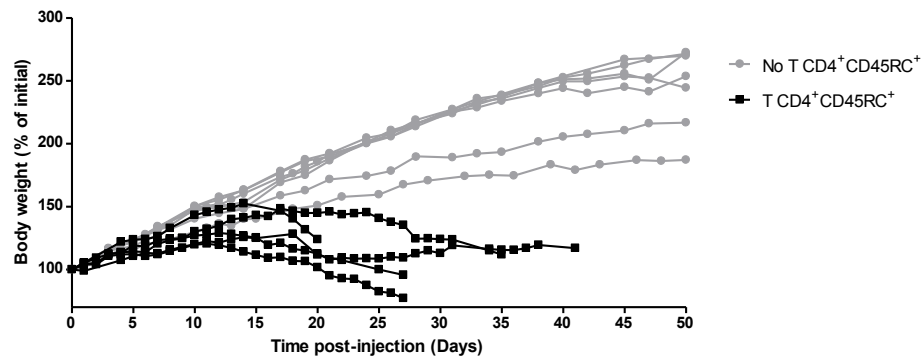
Dans le but d'étudier la fonction des Tregs dans un contexte d'auto-réactivité, ainsi que la capacité des Tregs à être recrutés sur les sites inflammatoires, nous avons développé un modèle dit de « Wasting disease » décrit initialement en 1990 par l'équipe de Don Mason (Powrie and Mason, 1990). Le modèle originel consiste à injecter des cellules $CD4^+CD45RC^{hi}$ syngéniques dans des rats nus afin d'induire une maladie auto-immune multi-organe. Afin de mettre en place ce modèle dans notre laboratoire, nous avons injecté des rats $RAG1^{-/-}$ à l'âge de 6 semaines avec 2,5 millions de $T CD4^+CD45RC^+$ syngéniques. Bien que le système immunitaire des rats $RAG1^{-/-}$ soit très altéré, nous n'avons pas été en mesure d'induire le développement de la maladie chez ces rats (résultats non montrés).

La plateforme TRIP du Dr. Ignacio Anegón a développé, il y a 3 ans, un modèle de rat déficient pour l' $IL2R\gamma$ dans le fond génétique SPD. Ces animaux ne développent aucun lymphocyte T ni B (article en préparation). Nous avons donc décidé d'utiliser ce modèle pour le développement de la « Wasting disease ». Nous avons injecté 2,5 millions de $T CD4^+CD45RC^+$ triés à partir de splénocytes d'animaux SPD WT en intra-veineuse dans la veine caudale d'animaux âgés de 6 semaines. L'interprétation des résultats pour ce modèle se fait par l'intermédiaire du suivi de la survie et du poids des animaux.

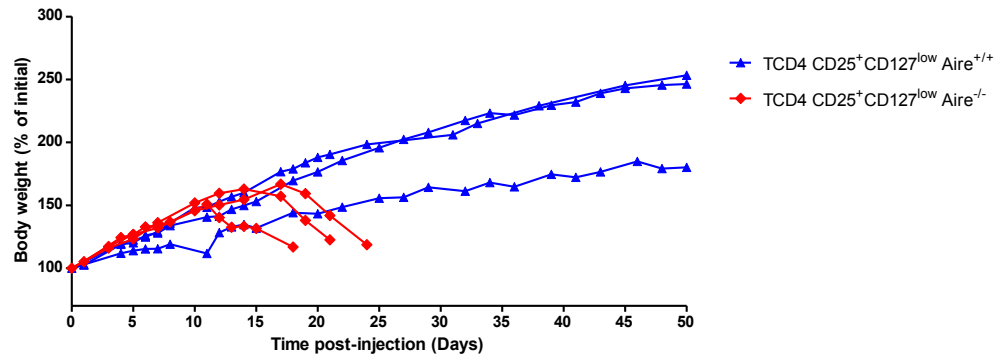
A



B



C



D

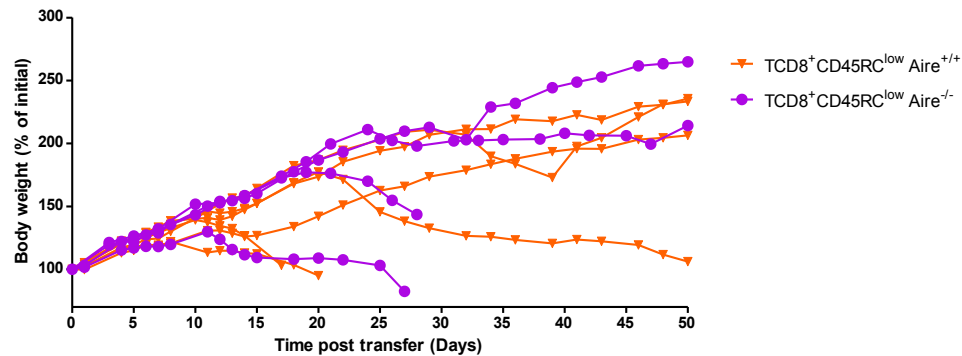


Figure 17. Les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} d'animaux Aire^{-/-} SPD âgés de plus de 6 mois triés à partir la rate ont une fonction suppressive altérée in-vivo dans un modèle de « Wasting disease », dans un contexte auto-réactif. Suivi sur 50 jours des animaux Il2Rγ^{-/-} dans le modèle de « Wasting disease » induit par l'injection de T CD4⁺CD45RC⁺. A. Courbe de survie des différents groupes (n=3-6) *p<0.05, ***p<0.001. B. Suivi de poids

des animaux injectés avec du PBS (gris) ou avec 2,5 millions de T CD4⁺CD45RC⁺ (noir). C. Suivi de poids des animaux co-injectés T CD4⁺CD45RC⁺ avec Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} issus de rats Aire^{+/+} (bleu) ou Aire^{-/-} (rouge). D Suivi de poids des animaux co-injectés T CD4⁺CD45RC⁺ avec Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus de rats Aire^{+/+} (orange) ou Aire^{-/-} (violet), chaque courbe représente un animal.

Dans ce modèle, nous avons deux groupes de contrôle : un contrôle négatif ne développant pas la maladie (groupe PBS, courbes grises) et un groupe de contrôle positif développant la maladie (Groupe T CD4⁺CD45RC⁺, courbes noires). Les animaux du groupe T CD4⁺CD45RC⁺ présentent rapidement un retard de prise de poids en comparaison avec les animaux littermate contrôles injectés avec du PBS (Figure 17 B). De plus, 100% des animaux du groupe T CD4⁺CD45RC⁺ ont été sacrifiés entre J 20 et J 42 en accord avec les points limites définis par la saisine éthique relatifs à la structure du bien être animal (SBEA), alors qu'aucun animal du groupe PBS n'a atteint le point limite dans les 50 jours du suivi (Figure 17 A).

Afin de tester la fonction des lymphocytes T régulateurs des animaux Aire^{-/-}, nous avons co-injecté les animaux IL2r γ ^{-/-} à 6 semaines avec des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} d'animaux Aire^{+/+} (courbes bleus), ou avec des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} d'animaux Aire^{-/-} (courbes rouges). Nous avons ainsi pu montrer que, comme dans les expériences de suppressions *in-vitro*, les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} issus d'animaux Aire^{-/-} ont un défaut de fonction suppressive. En effet, les animaux injectés avec les Tregs CD4⁺ de rats Aire WT perdent du poids et développent des symptômes (saignement au niveau du contour des yeux, perte de poils, croûtes au niveau de la peau) jusqu'à atteindre les points limites alors que les animaux co-injectés avec les Tregs CD4 de rats Aire^{+/+} ne développent pas la maladie, prennent du poids de manière semblable aux animaux du groupe PBS et survivent pendant les 50 jours du suivi Figure 17 A et C).

Nous avons également étudié la fonction des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} dans ce modèle, pour les Tregs issus d'animaux Aire^{+/+} (courbes oranges) et Aire^{-/-} (courbes violettes). Nous n'avons pas observé de différence dans la fonction suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} dans ce modèle (Figure 17 A et D), ce qui confirme que la fonction suppressive des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} n'est pas altérée.

En conclusion, la fonction des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} est altérée à la fois dans un modèle *in-vitro* de suppression dans un contexte d'alloréactivité mais également dans un

modèle *in vivo* de suppression dans un contexte d'auto-réactivité. Ce résultat suggère un rôle très important de Aire dans la fonction de ces Tregs FoxP3⁺. Au contraire, la fonction des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} est augmentée dans le modèle *in-vitro* en contexte alloréactif et pas altérée dans un contexte de contrôle d'une réponse auto-immune. Ces résultats suggèrent donc que l'impact de Aire sur les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} ne passe pas par une modulation de leur fonction mais peut être par un élargissement de leur répertoire, leur conférant une meilleure capacité à reconnaître des antigènes du non-soi.

Afin d'étudier cette possibilité et de manière plus large pour étudier l'impact de l'absence de Aire sur le répertoire des Tregs, nous avons étudié le répertoire TCR des Tregs des animaux Aire^{+/+} et Aire^{-/-}. Pour cela, nous avons trié ces 2 populations de Tregs au FACS ARIA après extraction des cellules de la rate. Nous avons ensuite extrait les ARNs puis effectué une rétro-transcription afin d'obtenir les ADN complémentaires. L'analyse du répertoire TCR a été réalisée par immunoscope. Cette analyse détermine la longueur de la région hypervariable CDR3 pour chaque chaîne Vbeta. Les résultats sont exprimés en pourcentage de séquence en fonction de la longueur du segment d'ADNc amplifié. Les amorces étant fixes, la variation de longueur du produit d'amplification dépend de la longueur du CDR3. Chez les animaux WT, la répartition en fonction de la longueur du CDR3 suit une loi normale. Le répertoire est alors qualifié de gaussien. Pour l'analyse de cette distribution, nous définissons quatre « statuts » en fonction du niveau d'altération du répertoire classé ici de la repartition normale à la plus altérée : gaussien (G) (Figure 18 rVb02), polyclonal avec pic majeur (PAPM) (Figure 18 rVb06), oligoclonal (Figure 18 rVb18) et monoclonal (Figure 18 rVb07) (Memon et al., 2012; Miqueu et al., 2007).

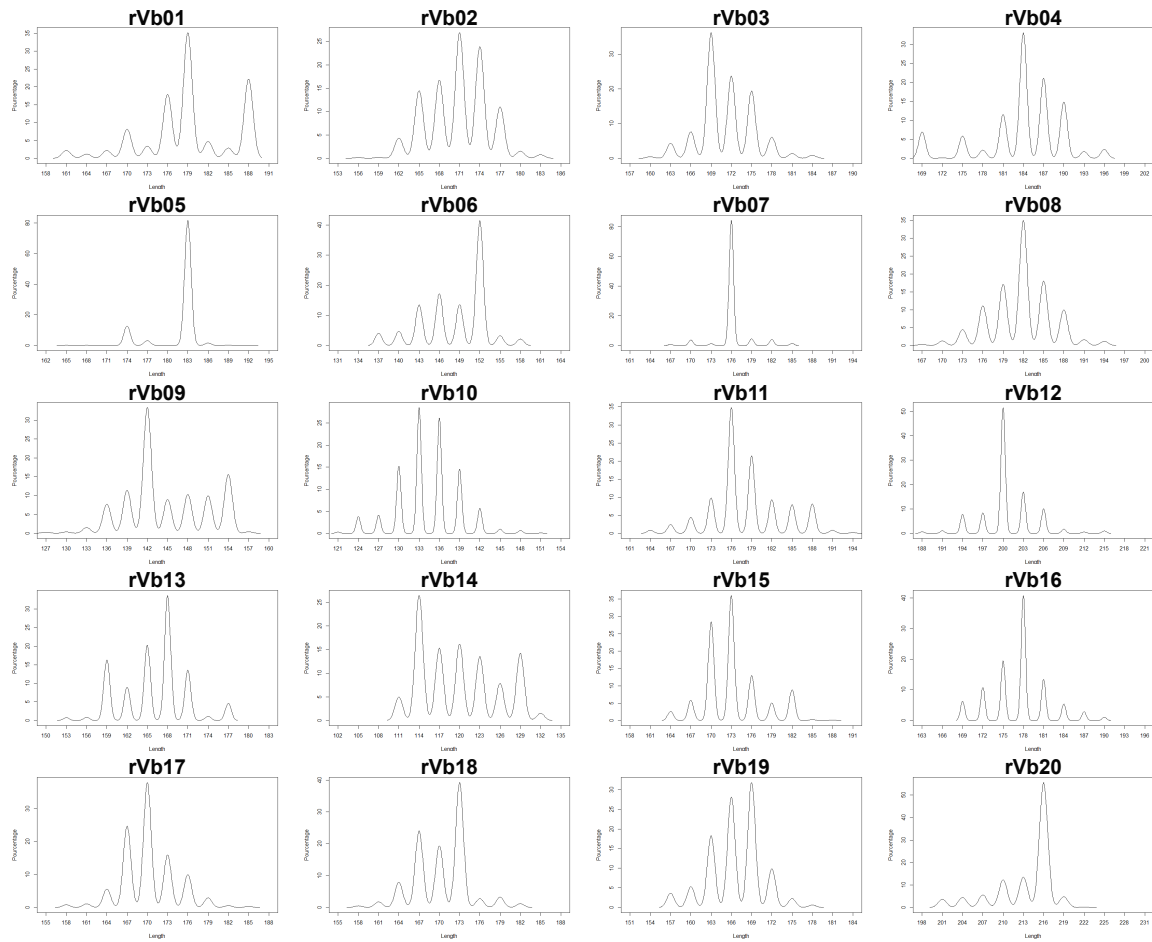


Figure 18 Profil immunoscope de la région CDR3 pour l'ensemble des Vbeta d'un animal Aire^{-/-}. A partir d'un échantillon de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} trié au FACS ARIA à partir de la rate, une PCR est réalisée sur la région CDR3. Le pourcentage de séquences amplifiées est représenté en fonction de la taille en nucléotides.

	Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low} Aire ^{+/+}					Tregs CD8 ⁺ CD45RC ^{low} Aire ^{-/-}					Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Aire ^{+/+}					Tregs CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Aire ^{-/-}				
rVb1	G	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G
rVb2	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	oligoclonal	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rVb3	G	PAPM	G	G	G	G	G	monoclonal	G	monoclonal	G	G	oligoclonal	G	oligoclonal	G	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	G
rVb4	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	oligoclonal	G	PAPM	monoclonal	G	G	oligoclonal	G	G
rVb5	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal	G	G	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal
rVb6	PAPM	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	oligoclonal	G	G	G
rVb7	G	monoclonal	G	G	G	monoclonal	G	monoclonal	G	PAPM	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	G	G
rVb8	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G
rVb9	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rVb10	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G
rVb11	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G
rVb12	oligoclonal	G	G	G	G	PAPM	PAPM	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	G	oligoclonal	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal
rVb13	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	oligoclonal
rVb14	G	oligoclonal	-	G	G	G	PAPM	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rVb15	PAPM	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
rVb16	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	PAPM	PAPM	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G
rVb17	G	oligoclonal	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G
rVb18	PAPM	PAPM	G	G	G	oligoclonal	PAPM	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	oligoclonal	oligoclonal	G	G	G	G
rVb19	G	G	G	G	G	G	G	PAPM	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G	G	G
rVb20	G	G	G	G	G	oligoclonal	PAPM	oligoclonal	PAPM	oligoclonal	G	G	G	G	G	G	oligoclonal	G	G	G
Altération globale du repertoire: Aire ^{+/+} 25% Aire ^{-/-} 36%											Altération globale du repertoire: Aire ^{+/+} 16% Aire ^{-/-} 20%									

Figure 19. Analyse du repertoire TCR Vbeta des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} et CD4⁺CD25^{hi} par immunoscope. La distribution du repertoire pour chaque Vbeta dans chaque échantillon est indiquée dans ce tableau. L'altération globale est définie par le pourcentage de Vbeta qui ne présente pas une distribution gaussienne dans un groupe.

Nous pouvons observer dans ces résultats que le répertoire des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} présente une distribution plus altérée de manière générale sur l'ensemble des Vbeta. En effet, chez les animaux Aire^{+/+}, 25% des Vbeta ont une altération de distribution (non gaussienne) alors que l'altération globale du répertoire des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} des rats Aire^{-/-} est de 36% (Figure 19, gauche). Si on s'intéresse maintenant à chaque Vbeta un par un, on peut remarquer qu'il y a deux Vbeta en particulier qui présente une altération dans l'ensemble des animaux Aire^{-/-} étudiés : le Vbeta12 et Vbeta20. Le pourcentage d'altération pour le Vbeta12 est de 25% chez les WT et 100% chez les KO. Pour le Vbeta 20 il est de 0% chez les WT et 100% chez les KO. Nous avons pratiqué la même analyse sur les Tregs CD4⁺CD25^{hi} triés en parallèle des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} à partir des mêmes animaux. Nous avons observé que l'altération globale du répertoire est de 16% chez les animaux WT et de 20% chez les animaux KO. De plus, il n'y a aucun Vbeta pour lequel nous pouvons observer une altération chez l'ensemble des animaux Aire^{-/-} étudié (Figure 19, droite).

En conclusion, nous pouvons dire que la déficience pour Aire induit un biais dans le répertoire des Tregs CD8⁺CD45RC^{low}. Ce qui renforce l'hypothèse que nous avons

formulé vis-à-vis des résultats obtenus sur la fonction des Tregs. L'impact de la déficience pour Aire joue un rôle sur le répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} mais pas sur celui des Tregs CD4⁺CD25^{hi}.

L'analyse du répertoire TCR par immunoscope permet une analyse qualitative. L'analyse statistique sur les 4 animaux Aire^{+/+} et 5 Aire^{-/-} montre qu'il y a significativement plus de séquences amplifiées contenant le CDR3 de 207, 213 et 216 nucléotides pour le Vbeta20 (Figure 20 A). Il y a donc un biais du répertoire TCR des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} dans le Vbeta 20. Afin de déterminer la nature de ce biais nous avons séquencé la région CDR3 en cellule unique. Pour cela, nous avons transformé des bactéries compétentes avec l'ADNc issus des Tregs après avoir réalisé une PCR sur le Vbeta20 pour chaque animal. Nous avons étalé sur boîte de pétri ces bactéries. Cette technique de sous-clonage permet d'isoler des colonies portant une seule séquence de Vbeta. Nous avons fait séquencer le plasmide porté par 50 colonies pour chaque produit de PCR et analysé la séquence en AA traduite *in-silico*.

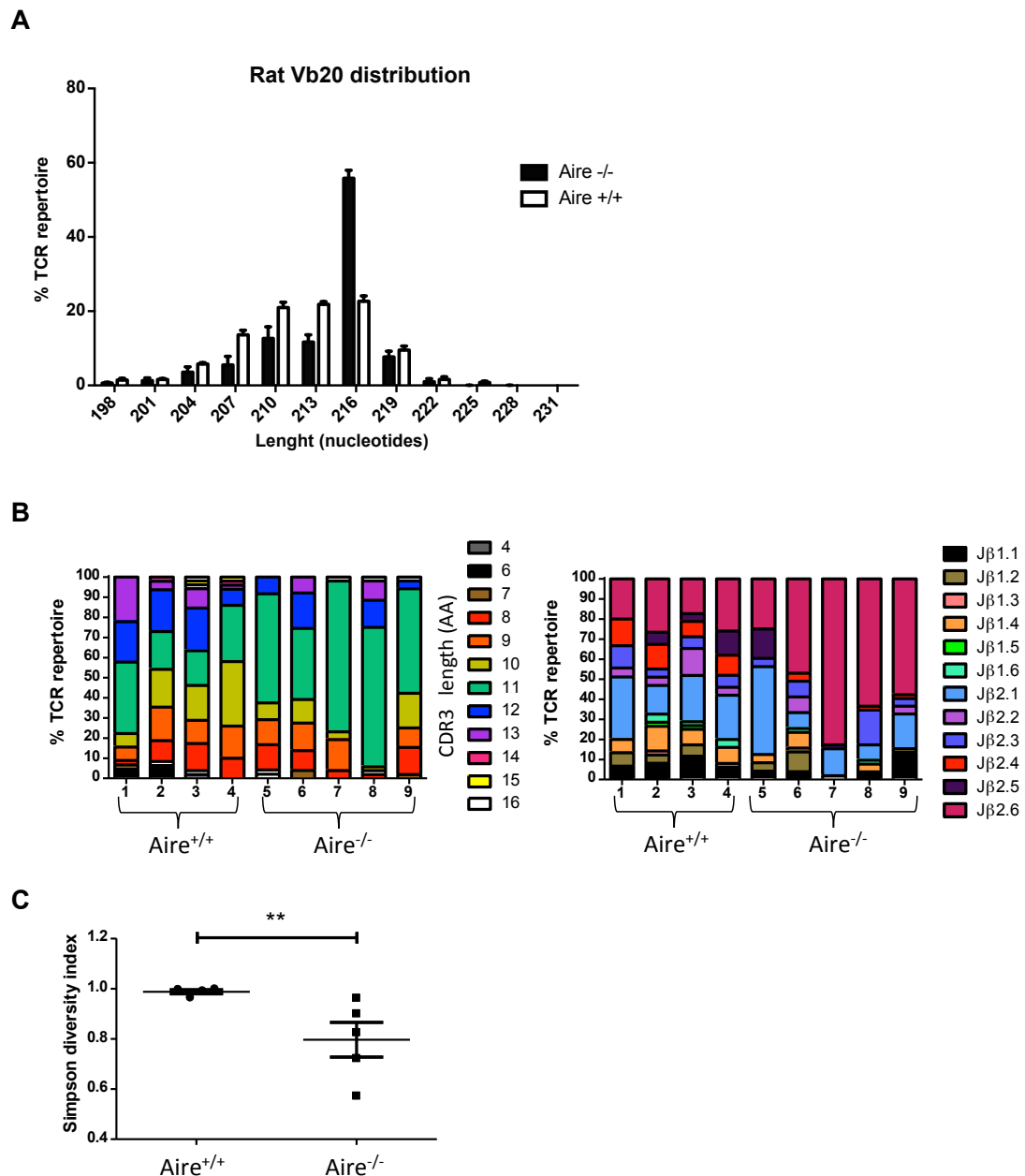


Figure 20. Les rats *Aire*^{-/-} ont un repertoire TCR Vbeta 11 restreint avec un biais privé.
A. Bilan de l'analyse immunoscope pour la répartition des longueurs de CDR3 du Vbeta20, les résultats sont montrés en pourcentage du repertoire en fonction de la longueur en nucléotides du CDR3 (n=4-5), *p<0.05. B. Représentation de la diversité du repertoire, chaque barre représente un animal, les couleurs représentent une longueur de CDR3 (AA) (gauche), ou un Jβ (droite). C. Analyse statistique de la diversité du repertoire par l'index de diversité de simpson, **p<0.01.

Cette analyse a permis de mettre en évidence un biais du CDR3 vers une longueur de 11 AA (Figure 20 B, gauche) avec une séquence fortement représentée dans l'ensemble des animaux *Aire*^{-/-} analysés (S S P G L G S S Y E Q) ainsi qu'un biais vers le Jβ2.6 (Figure

20 B, droite). Sur les 50 séquences obtenues par le séquençage, nous avons pratiqué une analyse statistique permettant de calculer l'indice de diversité de Simpson. Cet indice est généralement utilisé en écologie, il permet de calculer la richesse spécifique d'une communauté. Cet indice varie entre 0 et 1, plus il tend vers 1 et plus la probabilité d'obtenir des individus différents lors d'un choix aléatoire est élevée, plus il tend vers 0 et plus cette même probabilité est faible. Cette analyse a permis de montrer que la diversité des séquences de CDR3 chez les animaux Aire^{-/-} était inférieure à celle des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} issus de rats Aire^{+/+}. En conclusion, ces résultats montrent que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} des rats Aire^{-/-} ont un répertoire restreint avec biais privé.

Dans le but d'étudier plus spécifiquement les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques d'antigènes dans un contexte d'alloréactivité *in vivo*, nous avons généré des rats déficients pour Aire dans le fond génétique Lewis 1A. En effet, notre équipe a décrit dans un modèle de greffe cardiaque hétérotopique Lewis 1W sur Lewis 1A (deux souches de rats incompatible pour le CMH), l'émergence d'une population de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} capable de reconnaître des peptides dérivés du CMH-II du donneur (Lewis 1W) présentés sur le CMH-I du receveur (Lewis.1A) (Picarda et al., 2014). Ces Tregs sont induits par un traitement avec un adénovirus CD40Ig injecté au niveau de l'apex du greffon le jour de la greffe. Nous avons particulièrement décrit un peptide (peptide Du51) capable d'induire une tolérance du greffon lorsque celui-ci est placé dans une minipompe osmotique 14 jours avant la greffe et jusqu'à 7 jours après la greffe. Afin d'étudier ces Tregs spécifiques du peptide Du51, nous avons généré des tétramères nous permettant de marquer ces Tregs et d'analyser leur fréquence par cytométrie en flux (Picarda et al., 2014). Pour cela, nous analysons les cellules sur la morphologie, sélectionnons les cellules vivantes (DAPI⁻) puis dans les cellules CD8⁺CD45RC^{low} (Figure 21 A), nous analysons le marquage tétramère avec un mélange équimolaire de tétramères couplés avec 2 fluorochromes différents. Cette technique de marquage est particulière, en effet une cellule capable de se lier au tétramère va porter à sa surface autant de tétramères couplés à un fluorochrome que de tétramères couplés avec l'autre fluorochrome. Ce marquage donne donc un aspect de trainée qui peut faire penser à de l'auto-fluorescence alors qu'il s'agit d'un marquage extrêmement spécifique. De plus, nous ajoutons un tétramère contrôle avec le peptide MTF-E (ILFPSSERLISNR) couplé au BV421. Les cellules marquées de manière non-spécifique par les tétramères sont alors exclues en même temps que les cellules DAPI⁺. Ces Tregs sont restreints au CMH du rat Lewis 1A, c'est pourquoi nous avons généré les rats Lewis

1A $Aire^{-/-}$. Nous savons que ces Tregs sont présents de manière naturelle chez des rats Lewis 1A naïf (non-gréffés). Dans le but d'étudier l'impact de Aire sur la génération de ces Tregs, nous avons donc réalisé des marquages chez des animaux naïfs. Nous avons réalisé des marquages dans la rate, le sang et le thymus d'animaux $Aire^{+/+}$ et $Aire^{-/-}$.

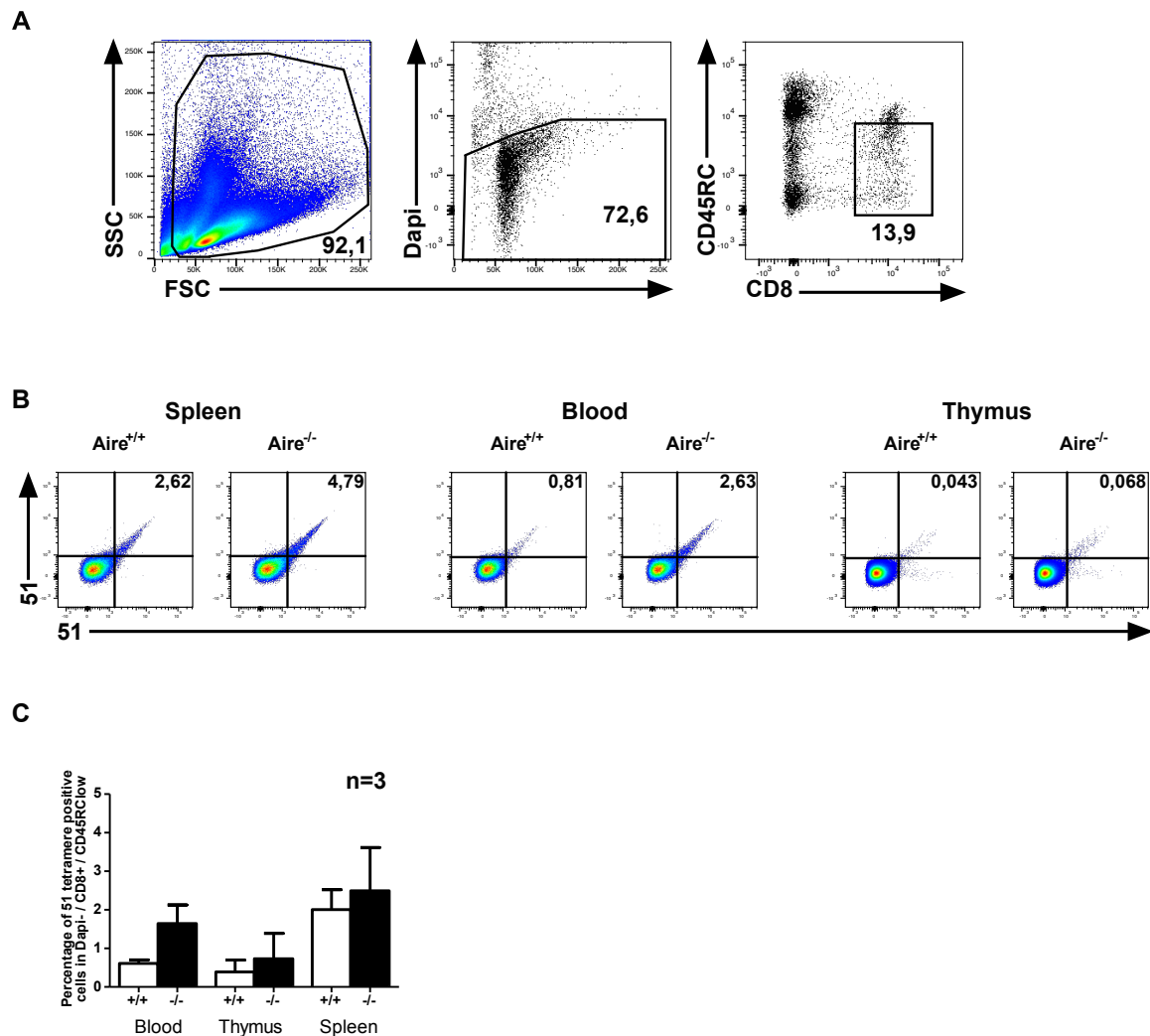


Figure 21. Les rats $Aire^{-/-}$ semblent présenter un défaut de sélection des Tregs $CD8^{+}CD45RC^{low}$ spécifiques du peptide 51. A. Stratégie d'analyse des Tregs spécifiques du peptide Du51. B. Exemple représentatif de marquage tetramère Du51 dans la rate, le sang et le thymus d'un animal $Aire^{-/-}$ et $Aire^{+/+}$ littermate. C. graphique représentant les moyennes des pourcentages de cellules tetramère positive dans les 3 organes analysés (n=3).

Cette analyse montre que dans les 3 organes étudiés chez les 3 animaux, ces animaux possèdent des Tregs capables de reconnaître le peptide Du51 et qu'il semble y avoir une

fréquence plus importante de ces Tregs chez les animaux Aire^{-/-} en particulier dans le sang (Figure 21 B et C).

En conclusion, il semble que dans le cas d'une délétion de Aire, certains Tregs qui ne seraient pas capables de sortir du thymus chez un animal Aire^{+/+} sont générés chez les animaux Aire^{-/-}. Cette expérience suggère une fois encore que Aire joue un rôle dans la sélection des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} et notamment des Tregs ayant une affinité pour le non-soi.

Comme décrit précédemment, les Tregs spécifiques pour le peptide Du51 sont capables d'induire une tolérance à long terme de l'allogreffe de cœur Lewis 1W chez le rat Lewis 1A. Ces Tregs semblent être plus abondants chez les rats Aire^{-/-}. Notre hypothèse était donc que des animaux greffés pourraient spontanément présenter un délai de rejet du greffon voir une tolérance de celui-ci.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des greffes de cœur Lewis 1W chez les animaux Lewis 1A (Figure 24).

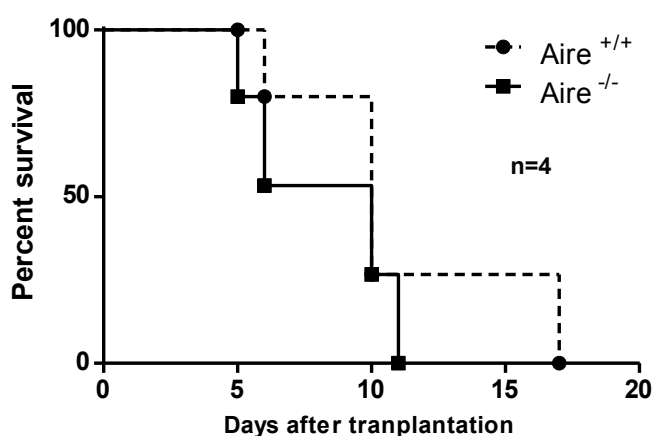


Figure 22. Courbe de survie du greffon chez des animaux Lewis 1A greffés avec un cœur Lewis 1W.

Chez les 4 animaux greffés, 3 animaux de chaque groupe avaient rejeté le greffon à J 10 et un animal Aire^{-/-} a rejeté le greffon à J 17. En conclusion, il ne semble pas y avoir d'effet significatif sur le rejet de la greffe.

Néanmoins, ces résultats sont préliminaires, les animaux utilisés pour ces greffes étaient des animaux Lewis 1A issus de la deuxième génération de croisements entre des rats SPD

Aire^{-/-} et des Lewis 1A. Ce fond génétique n'est donc pas pur et la possibilité d'un rôle des antigènes mineurs n'est pas écartée.

En conclusion, ces résultats ont montré que la fonction des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} ainsi que CD8⁺CD45RC^{low} est altérée dans un contexte d'alloréactivité. Seule la fonction des TregsCD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} est altérée également dans le contexte d'auto-réactivité. Nous avons démontré que Aire est impliqué dans la sélection des Tregs CD8⁺CD45RC^{low} et joue un rôle dans l'établissement du répertoire TCR de ceux-ci en introduisant un biais vers un répertoire dirigé contre le non-soi. Nous n'avons pas mis en évidence la ou les raisons pour lesquelles les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} ont une capacité suppressive diminuée. Néanmoins ces résultats tout comme les résultats de caractérisation du modèle soulignent le potentiel du rat Aire^{-/-} pour la compréhension des mécanismes d'action de Aire dans la tolérance. Certaines hypothèses et démarches expérimentales envisagées afin d'approfondir ce projet seront développées dans la partie discussion / perspectives de cette thèse.

Discussion / perspectives

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre au point un nouveau modèle d'étude de la maladie APECED et du rôle de AIRE dans la tolérance. En effet, le modèle de rat *Aire*^{-/-} est le premier modèle animal reproduisant certaines caractéristiques de la maladie humaine. De plus, les symptômes observés sont indépendants du fond génétique à la différence des modèles souris. Nous avons pu observer que l'expression de *Aire* chez le rat est très semblable à l'expression chez l'Homme. Chez le rat, *Aire* est exprimé dans les cellules épithéliales thymiques de phénotype CD45⁻CMH II⁺ mais également CD45⁻CMH II⁻ suggérant que les mTECs expriment *Aire* à différents stade de maturation et notamment au stade terminal de leur différenciation caractérisé par la perte d'expression du CMH II. L'expression de la protéine a également été montrée dans les cellules CD45⁺, bien que nous n'ayons pas encore analysé avec précision le phénotype de ces cellules, il est fort probable que ces cellules soient des lymphocytes B ou des DCs. En effet, dans une publication récente, Yamano et al. ont décrit une population de lymphocytes B thymiques exprimant *Aire* et capable de présenter des TSAs (Yamano et al., 2015b). Pour la révision de l'Article 1, il nous a été demandé de montrer que *Aire* contrôle l'expression de TRAs chez le rat. Etant donné que nous avions à disposition des échantillons d'ARNs de thymus de rat *Aire*^{+/+} et *Aire*^{-/-}, nous avons émis l'hypothèse que nous pourrions observer l'expression différentielle de certains TRAs dans ces échantillons. Nous avons donc réalisé une analyse de DGEseq sur ces échantillons d'ARNs et nous avons, en effet, été capables d'identifier une expression différentielle de certains TSA (ceux étant les plus exprimés en présence de *Aire*). Néanmoins, cette analyse est limitée du fait d'avoir pris un échantillon de thymus total. Les cellules exprimant *Aire* ne représentant qu'un très faible pourcentage du thymus. L'une des perspectives de ce travail consistera donc à trier plusieurs sous types cellulaires du thymus pour des animaux *Aire*^{+/+} et *Aire*^{-/-}. Nous allons donc trier les mTECs, les LB ainsi que les cellules dendritiques. Le but de cette étude sera de comparer les transcriptomes de ces cellules entre la souris, le rat et l'Homme. Durant la dernière année de cette thèse, nous avons développé des collaborations nous permettant d'obtenir à la fois les données d'analyse de souris *Aire*^{-/-} mais également, nous avons accès de manière régulière à des thymus humains. Certes, l'analyse chez l'Homme ne pourra pas être aussi précise que l'analyse chez la souris et le rat étant donné qu'il est peu probable que nous puissions obtenir, un jour, des thymus de patients APECED. Le but de ce projet sera de comparer les gènes sous le contrôle de *Aire* dans ces 3 espèces. De plus, le Dr. M. Giraud a

récemment rejoint l'unité. Ce projet se fera en collaboration avec lui afin de pratiquer également une analyse épigénétique sur l'ensemble de ces échantillons.

Nous avons pu démontrer de manière concrète l'expression de Aire en périphérie chez le rat par qPCR ainsi que par immunohistochimie dans plusieurs organes notamment les ganglions mésentériques. Nos résultats démontrent qu'une population de cellules dendritiques conventionnelles exprimant un niveau intermédiaire de CD4 exprime Aire. Ce modèle présente donc un fort potentiel pour l'étude du rôle de Aire dans la périphérie. En effet, des études chez l'Homme montrent une expression transcriptionnelle et protéique de TSA en périphérie capable de sélection négative et jouant un rôle complémentaire à celui du thymus (Peterson et al., 2008; Poliani et al., 2010). L'expression de la protéine Aire en périphérie chez la souris a été avancée par certains auteurs. Néanmoins cette expression chez la souris reste controversée étant donné que ces études utilisaient des anticorps polyclonaux ou des systèmes rapporteurs (Adamson et al., 2004; Anderson, 2002; Gardner et al., 2008; Halonen et al., 2001; Hubert et al., 2008). Pour cette thèse, nous avons utilisé un anticorps monoclonal (clone 5H12), hautement spécifique (Hubert et al., 2008). C'est pourquoi nous pouvons affirmer avec certitude l'expression de Aire en périphérie chez le rat. Cette expression ouvre d'importantes perspectives d'étude chez le rat Aire^{-/-}. En effet, cette expression semblable à l'expression humaine pourrait être un élément expliquant la similitude plus proches des symptômes du rat comparé au phénotype léger développé par les souris. Ceci reste une hypothèse demandant des études approfondies pour être éclaircie. Nous avons néanmoins observé que le nombre de cellules exprimant Aire dans ces OLS est très faible. De plus, le nombre de « points » caractéristiques du marquage de Aire dans ces cellules semble être nettement moins important que le nombre observé dans les mTECs (Figure 1 E Article 1). Nous pouvons donc nous demander si cette population a un réel intérêt physiologique. Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager 2 stratégies :

- produire des animaux présentant une déficience pour AIRE uniquement dans le thymus, génération d'un KO conditionnel.

- réaliser une thymectomie chez des nouveaux nés pour supprimer la fonction de sélection du thymus.

Ces deux stratégies présentent chacune des avantages et des inconvénients. Le fait de réaliser une thymectomie est un acte chirurgical simple et rapide à mettre en place. Les

principaux inconvénients sont que la thymectomie va supprimer non-seulement la sélection négative mais aussi la sélection positive. De plus, Yang et al. ont montré chez la souris qu'une population de Tregs périnatal est générée sous le contrôle de Aire et que ce pool de Tregs est suffisant pour empêcher le développement de l'auto-immunité (Yang et al., 2015). Il serait donc nécessaire de confirmer ce phénomène chez le rat avant de pouvoir envisager de réaliser cette expérience.

Pour la génération d'animaux KO conditionnel, il nous faudrait générer des animaux Aire^{lox/lox}, c'est-à-dire des animaux dont le gène Aire serait entouré par des séquences LoxP et également des rats exprimant la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur spécifique de DC par exemple CD103. Le croisement de ces rats permettrait de générer des animaux Aire^{cre/lox}, la Cre recombinase n'étant exprimée que dans les cellules dendritiques, l'expression de Aire serait maintenue dans le thymus et nous pourrions répondre à la question de l'importance du rôle de Aire en périphérie. Il est probable que les mécanismes d'action de Aire en périphérie ne soient pas cruciaux lorsque Aire est exprimé dans le thymus et que l'expression de Aire en périphérie soit une sorte de « sécurité » du système immunitaire permettant de supprimer les T ayant échappés à la sélection négative dans le thymus. Néanmoins, il est également possible que l'expression de Aire en périphérie soit nécessaire pour la fonction des Tregs CD4⁺FoxP3⁺ dans ce modèle. Il serait possible de trier ces cellules CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} et de tester leur fonction suppressive comme décrit dans la partie B des résultats de ce manuscrit. Un autre moyen pour étudier le rôle de Aire en périphérie serait d'inverser cette stratégie de KO conditionnel. C'est-à-dire de croiser les rats Aire^{lox/lox} avec des animaux exprimant la Cre recombinase sous le promoteur d'un marqueur exprimé par les mTECs comme par exemple Epcam ou plus spécifiquement Cdl3,4 (Hamazaki et al., 2007). Les animaux Aire^{cre/lox} aurait alors un déficit de sélection thymique et nous pourrions analyser le développement des symptômes d'auto-immunité chez ces animaux (décrit dans l'article 1). Nous pourrions alors potentiellement déterminer si le rôle des cellules exprimant Aire en périphérie est le même que celui des mTECs et si malgré leur faible nombre et leur niveau d'expression de Aire ces cellules seraient capables d'inhiber le développement de l'auto-immunité.

Nous avons pu constater que l'organisation du locus de Aire est extrêmement similaire entre le rat et l'Homme mais assez différente de celui de la souris. En utilisant la technologie des nucléases à doigts de zinc, nous avons pu générer des rats présentant une mutation semblable à la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients

APECED sarde, R139X (Rosatelli et al., 1998) Cette mutation de Aire est particulière car elle est uniquement retrouvée en Sardaigne. Dans cet article, Rosatelli et al. suggèrent que tous les porteurs de cette mutation dérivent d'un même ancêtre commun et que l'origine de cette mutation remonterait à 1400. Nous avons rapidement pu constater que les rats Aire^{-/-} développent de multiples symptômes associés à l'APECED, de nombreuses lésions histologiques, infiltrats lymphoïdes ainsi que des manifestations visuelles comme l'alopécie, le vitiligo ou l'ongulo-dystrophie. Ces manifestations sont visibles dans les 3 fonds génétiques étudiés (Brown Norway et Sprague Dawley décrits dans l'article 1 et Lewis 1A non-montré). Dans la lignée Lewis 1A qui a été générée plus récemment, nous observons que certains animaux hétérozygote développent une alopécie. Nous n'avons pas encore analysé le phénotype de ces animaux pour voir si l'alopécie est le seul symptôme retrouvé chez ces animaux Aire^{+/-}. Il a été démontré que certaines mutations de Aire sont dominantes, notamment des mutations permettant la synthèse de protéines tronquées qui déstabilisent la multimérisation de Aire et empêchent ainsi son fonctionnement (Ofstedal et al., 2015). Il est peu probable que ce phénomène ait lieu dans notre modèle. En effet, aucun animal Aire hétérozygote de la lignée SPD n'a développé d'alopécie. Néanmoins, il est possible que chez le rat le niveau d'expression de Aire soit plus faible chez les Aire^{+/-} que chez les Aire^{+/+}. Nous pouvons vérifier cette hypothèse en réalisant un marquage Aire par western blot sur des lysats de thymus de rat et en quantifiant cette expression vis-à-vis d'une protéine de ménage. Il est également possible que cette observation soit due à la souche Lewis 1A. Ces rats sont définis pour être susceptible au développement de maladie auto-immune, ils ont également un important taux de stérilité. Cette stérilité pourrait être due à des désordre hormonaux chez ces rats, or il a été montré que notamment les oestrogènes peuvent induire une diminution d'expression de Aire (Bakhru and Su, 2016). Une caractérisation complète de ces animaux pourrait être envisagée avec une attention particulière pour une éventuelle corrélation entre le sexe et le développement / gravité des symptômes.

Ces symptômes sont également associés à des dommages au niveau des organes. En particulier, une involution thymique accélérée (absence de structure thymique à 8 mois) et également une involution adipeuse du pancréas exocrine. L'analyse histologique de thymus d'animaux jeunes (<2 mois) montre une architecture parfaitement normale du thymus. Cette observation peut s'expliquer par le fait que le développement structural du thymus dépend du dialogue entre les thymocytes et les cellules épithéliales (Holländer et

al., 1995; Palmer et al., 1993). A l'heure actuelle, il est difficile d'expliquer l'involution précoce du thymus. Néanmoins, il est envisageable que les mTECs Aire⁺ ou les mTECs à leur stade de différenciation finale (post-Aire) jouent un rôle dans le maintien de cette structure. Il a été démontré que les mTECs post-Aire expriment un haut niveau d'involucrine et de différentes kératines, des molécules plutôt définies comme jouant un rôle dans la mise en place du derme et dont la fonction n'a pas encore été étudiée dans le thymus (Abramson and Anderson, 2017).

Dans ce modèle de rat, nous avons observé plusieurs symptômes reproductibles et proches de ceux de la maladie humaine. Certains n'ont pas été décrits dans les fonds génétiques de souris étudiés excepté pour certains dans le fond génétique NOD. Néanmoins, le fond génétique NOD représente, selon l'auteur de cette thèse, un modèle biaisé pour analyser la fonction de Aire. En effet, il a été démontré que les souris NOD possèdent des auto-anticorps dirigés contre des cibles pouvant être associées à une déficience pour Aire comme GAD (Anderson and Bluestone, 2005). Il est donc, selon l'auteur de cette thèse, difficile d'attribuer le phénotype des souris NOD Aire^{-/-} à l'unique déficience pour Aire. C'est pourquoi nous pensons que le modèle de rat est bien plus convainquant au vu des symptômes observés à la fois dans des souches congéniques mais également dans une souche non congénique. Il est néanmoins important de noter que ce modèle de rat Aire^{-/-} ne miment que certains points de la maladie humaine. Notamment, des auto-anticorps très communément retrouvés chez l'homme ne le sont pas chez le rat comme ceux dirigés contre Magea2, Magea4, Magea10 ou Pdilt. Les taux de glucose sanguin et urinaire sont identiques entre les animaux Aire^{+/+} et Aire^{-/-} suggérant qu'il n'y a pas de développement de diabète. De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'hypocalcémie, que nous avons étudié par dosage dans le sérum des animaux, et qui aurait pu traduire l'un des 3 symptômes majeurs de l'APECED (l'hypoparathyroïdisme). Néanmoins, nous avons réalisé des marquages auto-anticorps sur coupe de thyroïde montrant que cet organe est ciblé par des auto-anticorps (résultats non-montrés). Nous n'avons pas pu mettre en évidence le développement de candidose spontanée, alors que l'alopecie retrouvée chez les patients APECED est associée à la présence de Candida. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires afin d'écarter l'hypothèse d'une raison infectieuse à cette alopecie. En effet, nous avons pu mettre en évidence la présence d'auto-anticorps contre des cytokines associées aux Th17 notamment contre l'IL17-A à un niveau comparable à celui des patients APECED. Les Th17 étant impliqués dans l'immunité anti-

fongique, l'hypothèse la plus probable est que la candidose des patients APECED est due aux auto-anticorps dirigés contre les cytokines associées aux Th17. Notre infrastructure au laboratoire ne nous permet pas de tester la susceptibilité à candida en pratiquant des gavages avec candida. Cette alopecie pourrait également ne pas être d'origine infectieuse mais pourrait être due aux auto-anticorps car l'analyse par western blot ainsi que par immunohistochimie des auto-anticorps présents dans le sérum a révélé un marquage des cellules à la base des follicules pileux. Enfin, pour le troisième symptôme majeur de la triade de l'APECED, la maladie d'Addison : nous avons réalisé des marquages sur coupe de glande surrénale et avons démontré la présence d'auto-anticorps dirigés contre cet organe (résultats non-montrés).

L'analyse des auto-anticorps anti-cytokine a été réalisée en collaboration avec le Pr. P. Peterson, son équipe a développé une technique de quantification des auto-anticorps en utilisant des protéines couplées à la luciférase (LIPS). *Le principe de cette technique est développé dans la partie matériels et méthodes de l'article 1.* Par cette technique, nous avons également mis en évidence des auto-anticorps contre les cytokines appartenant à la famille des IFN de type 1, ce qui est particulièrement intéressant car les souris Aire^{-/-} ne produisent pas ces auto-anticorps alors qu'ils sont un facteur de diagnostic important de l'APECED.

Plusieurs organes sont également ciblés par les auto-anticorps, par exemple, les entérocytes présentent un marquage important dans l'ensemble du tube digestif. L'analyse des marquages en collaboration avec une anatomopathologiste suggère que le glycocalyx situé au pôle apical des cellules serait la cible de ces auto-anticorps. Une autre preuve en faveur de cette hypothèse est que les bronchioles sont également marquées et qu'elles possèdent également un glycocalix au niveau du pôle apical des cellules épithéliales broncho-alvéolaires. Dans le testis, les cellules de Leydig, responsable de la production de testostérone sont également marquées, ceci pourrait expliquer les problèmes d'infertilité observés chez nos rats. De manière intéressante, bien que nous ayons observé un niveau plus élevé d'IgM et IgA dans le sérum, les auto-anticorps appartiennent au sous-type IgG ce qui corrèle avec la littérature.

	Human	Mouse		Rat
		NOD	Others	BN and SPD
Locus similarity		80% to human	80% to human	90% to human
Clinical symptoms	++++	++++	++	+++ with alopecia, vitiligo and nail dystrophy
Triad: hypoparathyroidism, adrenal failure, and candidiasis susceptibility	Yes	No	No	Autoantibodies to thyroid and adrenal gland Candidiasis could not be assessed
Infertility	Women	Fertile crossed with WT mice, homozygous crossing produced offspring only occasionally		Fertile crossed with WT rats, homozygous crossing rarely produced offspring
Organs affected				Thymus and pancreas
Auto-reactive T cells	Yes	Yes	Yes	Yes
Auto-antibodies (% of affected)	Yes	Liver (100%); Pancreas (100%); Kidney (100%); stomach (100%)	Background and individual dependant	Liver (100%); Pancreas (33,33%); Kidney (88,89%); stomach (11,11%); eye (11,11%); skin (66,67%); duodenum (88,89%); salivary gland (44,44%); ovary (66,67%); Ileum (11,11%); spleen (22,22%); stomach (11,11%); colon (11,11%); lung (55,56%); thymus (33,33%)
Specific auto-antibodies	Positive against type II IFNs , Th17 cytokines, GAD1, GAD2, DDC, TGM4, GIF, HSD3B2, BPIFB1, TSGA10, CYP1A2, KCNRG, AQP2, FN ω , IFN α , IL-22, IL17F, IL17A, IFN β , IFN γ	Positive against mucin 6 and afodrin	Negative against: Gad65, Cyp1a, insuline, Atp4a, enolase I, II, III, Hsp90, 21-OH, 17-OH, TPH, P450scc, AADC, IA2, ANA	Negative against Magea4, Magea10, Magea2 and Pdilt, Positive against Tgm4 and IL-6, IFN α 4, IFN α 11 and IL-17A
Expression of Aire in peripheral DCs	Yes	Controversial		Yes

Tableau 2 : Tableau comparatif repertoriant certaines observation entre l'Homme, la souris et le rat.

Nous pensons que les résultats obtenus dans la caractérisation du modèle vont permettre à terme de mieux comprendre les mécanismes d'action de Aire (Tableau 2).

En effet, notre analyse des Tregs issus de rat Aire^{-/-} démontre clairement l'impact de la déficience pour Aire sur ces cellules. Nous avons observé que les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} ainsi que les Tregs CD8⁺CD45RC^{low} ont une fonction suppressive altérée dans un modèle de suppression *in vitro* dans un contexte alloréactif. Les Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} ont également une capacité suppressive plus faible dans un modèle de suppression *in vivo* dans un contexte autoréactif. Ce défaut de contrôle de la maladie pourrait être du à plusieurs facteurs. Il est possible que ce soit les capacités suppressives des Tregs qui soient altérées. En effet, il a été montré que bien que les patients APECED

ont un pourcentage normal de Tregs $CD4^{+}FoxP3^{+}$, le niveau d'expression de FoxP3 est diminué dans ces Tregs (Laakso et al., 2010). Néanmoins, nous ne pouvons pour l'instant pas écarter le fait que ces Tregs aient un défaut de capacité migratoire ou de capacité à reconnaître les antigènes. Nos résultats indiquent que le répertoire des Tregs $CD4^{+}CD25^{hi}$ ne présente pas de biais mais nous n'avons pas utilisé le marqueur CD127 pour trier cette population. Pour répondre à la question de la capacité de migration des Tregs, nous avons trié des Tregs afin d'étudier leur transcriptome via la technique du DGEseq. Cette technique nous permettra également d'identifier un éventuel mécanisme de compensation dans le transcriptome des Tregs $CD8^{+}CD45RC^{low}$ expliquant leur capacité suppressive plus importante *in vitro*. Nous avons trié en parallèle les $TCD4^{+}CD25^{-}$, les $TCD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$, les $TCD8^{+}CD45RC^{low}$ et les $TCD8^{+}CD45RC^{+}$. Nous allons effectuer l'analyse du transcriptome pour chacun de ces sous types ainsi que l'analyse du répertoire TCR. Il est particulièrement important de réaliser l'analyse parallèle des $TCD8^{+}CD45RC^{+}$ car le phénotype $TCD8^{+}CD45RC^{low}$ ne nous permet pas d'obtenir une fraction pure de Tregs. Nous ne pouvons donc pas écarter l'hypothèse que le biais observé dans les cellules $CD8^{+}CD45RC^{low}$ soit dû à la fraction de cellules mémoire contenu dans cette population. De plus, nous avons mis en place une collaboration avec plusieurs équipes afin d'obtenir des PBMCs de patients APECED. Nous utiliserons les cellules de ces patients dans des tests de suppression *in vitro* similaires à ceux effectués chez le rat ainsi qu'une analyse du répertoire TCR et du transcriptome des mêmes types cellulaires que ceux du rat. Les résultats obtenus vis-à-vis de la capacité suppressive des Tregs sont particulièrement intéressants car ils n'ont jamais été mis en évidence chez la souris pour les Tregs $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{low}$ ni pour les Tregs $CD8^{+}CD45RC^{low}$. En effet, jusqu'à présent une seule équipe a pu mettre en évidence un défaut de fonction des Tregs chez la souris *Aire*^{-/-} (Pomie et al., 2011). Pourtant, plusieurs études soulignent l'importance des Tregs dans ce modèle et notamment des Tregs générés dans les premières semaines de la vie (Yang et al., 2015).

Il serait intéressant d'utiliser le modèle de « Wasting disease » en injectant des cellules T $CD4^{+}CD45RC^{+}$ issus d'animaux *Aire*^{-/-} afin de voir si les Tregs $CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{low}$ d'un animal WT sont capables de contrôler cette auto-immunité avec le répertoire auto-immun résultant de la déficience pour Aire. En effet, nous avons pu observer que des lymphocytes T d'animaux *Aire*^{-/-}, cultivés *ex-vivo* en présence de cellules dendritiques syngéniques, prolifèrent suggérant un biais du répertoire TCR vers l'auto-immunité. Cette

expérience pourrait permettre d'identifier la cause de l'auto-immunité chez les rats Aire^{-/-}. Si elle est uniquement due à un répertoire Tconventionnel auto-immun ou si le défaut de fonction des Tregs CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} est crucial pour le développement de la maladie. En effet, un élément de réponse réside dans le fait que les animaux doubles déficients pour Aire et Foxp3 développent une maladie plus importante (Chen et al., 2005), alors que chez les patients est observée une diminution de la capacité des Treg CD4⁺FoxP3⁺ pas une totale incapacité à fonctionner.

Nous pouvons également étudier la capacité suppressive des Tregs via l'induction de tolérance dans le modèle de greffe de cœur Lewis 1W sur Lewis 1A. En effet, les travaux de notre équipe depuis plusieurs années ont permis d'identifier le rôle des Tregs dans l'établissement de la tolérance induite par différents traitements : CD40Ig, IL-34, CD45RC, peptides (Bézie et al., 2015b; Guillonnet et al., 2007b; Picarda et al., 2014, 2017). Bien que l'augmentation de la fréquence de Tregs CD8⁺CD45RC^{low} spécifique du peptide Du51 chez les rats Aire^{-/-} ne permet pas de contrôler le rejet de greffe, il s'agit ici de Tregs naturels et non de Tregs induits par la greffe. Le rôle de Aire dans la génération de Tregs induits n'a encore jamais été exploré et par l'intermédiaire des tétramères de peptide Du51, nous disposons d'un outil unique afin d'y parvenir.

Nous avons également la possibilité d'étudier avec précision le TCR des cellules reconnaissant le peptide Du51. En effet, un projet annexe à ce travail de thèse a consisté à identifier une séquence TCR alpha/beta issue d'un clone trié en cellule unique par les tétramères Du51. Pour cela, nous avons dû mettre au point une technique de PCR sur cellule unique. La cellule a été triée directement dans des barrettes de PCR contenant un tampon de lyse. Après le tri, nous faisons directement la rétrotranscription en utilisant des nanobilles capables de se lier à la queue poly A des ARNs messagers. Une fois l'ADN complémentaire obtenu, nous avons dû mettre au point un protocole de PCR emboîtée. Les séquences des TCRs de rat étant très peu décrites, il a été difficile de créer des amorces à plusieurs niveaux de la séquence. Nous avons alors décidé de designer les amorces dans les chaînes constantes. Durant la première PCR, il a fallu trouver un ratio pour lequel les deux couples d'amorces pouvaient se fixer et amplifier la séquence. Après cette première étape de PCR, il est impossible de détecter le produit d'amplification malgré la sensibilité de l'électrophorèse capillaire que nous utilisons au laboratoire. C'est pourquoi nous avons pratiqué la PCR emboîtée. Nous utilisons pour cette PCR la même amorce pour la région variable mais une amorce en amont de la première pour la région constante. Pour certaines

cellules, il est alors possible de détecter le produit d'amplification. Pour les autres cellules, nous réalisons une 3^{ème} PCR emboîtée afin de pouvoir détecter le produit d'amplification. Nous avons ainsi pu obtenir la séquence alpha et beta pour plusieurs cellules. Nous avons choisi une séquence afin de générer des rats transgéniques pour ce TCR. En collaboration avec la plateforme TRIP, nous avons produit un plasmide afin de réaliser des micro-injections chez des rats Lewis 1A étant donné que ce TCR est issu de rat Lewis 1A. Les micro-injections pour la génération de ces rats sont en cours. La possibilité d'étudier la génération de ce clone de TCR unique ainsi que de croiser ces animaux avec des animaux Aire KO nous donnerait une opportunité unique de comprendre le rôle de Aire dans la génération des Tregs.

De part ces similitudes avec le syndrome APECED, le rat Aire^{-/-} est un modèle prometteur pour l'identification de stratégies thérapeutiques. Nous avons notamment des résultats préliminaires montrant que le traitement de rat Aire^{-/-} avec un anticorps anti-CD45RC permet d'empêcher le développement des symptômes. Chez le rat, l'expression de l'isoforme CD45RC a été décrite comme définissant une fonction Th1 des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. En transplantation, il a été montré que les cellules T CD45RC⁺ induisent le rejet de greffe. A l'opposé, les cellules exprimant un niveau intermédiaire ou n'exprimant pas le CD45RC ont un phénotype régulateur type Th2 (Guillonnet et al., 2007a; Rogers et al., 1992; Xystrakis et al., 2004c). Notre équipe a par ailleurs montré dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat que le traitement avec un anticorps anti-CD45RC sur une courte période permet de dépléter les cellules effectrices tout en induisant des cellules régulatrices ce qui entraîne une tolérance à long terme du greffon (Picarda et al., 2017). Nous savons ainsi que l'injection de cet anticorps, deux fois par semaine en IV à 1,5 mg/kg, permet une déplétion des cellules effectrices tout en conservant les populations de Tregs. C'est pourquoi notre hypothèse était qu'un traitement avec anti-CD45RC à la même dose avec la même cinétique permettrait d'empêcher le développement de l'auto-immunité. Nous avons donc traité un groupe de 6 animaux Aire^{-/-} à partir de l'âge de 2 semaines : 3 animaux traités avec anti-CD45RC et 3 animaux avec un contrôle isotype 3G8 (anti-CD16 humain). Pour cette première expérience préliminaire, nous avons traité les animaux sur une période de 120 jours. Nous avons suivi le poids des animaux et avons réalisé des prélèvements de sang tous les 30 jours. Nous avons pu observer que les rats injectés avec l'anticorps 3G8 ont rapidement atteint un poids plateau et ont commencé à perdre du poids pour 2 d'entre eux à partir de J 60. Ces rats ont également développé une

alopécie entre J 50 et J 70. Les rats traités avec l'anti-CD45RC se sont développés de manière normale, sans perte de poids ni de poils. A J 120, nous avons sacrifié les animaux afin de faire une analyse histologique des organes. *L'analyse des organes est actuellement en cours*. Ces premiers résultats sont préliminaires mais encourageants, ils apportent une preuve de concept montrant qu'il semble possible d'empêcher le développement des lésions induites par la déficience pour Aire chez le rat. De nos jours, les patients APECED reçoivent des traitements permettant de limiter les symptômes résultants de l'auto-immunité. Il n'y a pas de traitement étiologique de cette maladie. Pour la suite de ce projet, il serait intéressant de tester l'impact d'un traitement transitoire des rats. Nous pourrions également étudier la capacité de ce traitement à restaurer un phénotype normal chez des animaux plus âgés ayant déjà développé certains symptômes. L'étude des Tregs dans ce modèle sera également très importante. Dans le rejet de greffe, nous avons montré que le traitement transitoire avec anti-CD45RC permet la mise en place d'une population de Treg suffisante pour contrôler le rejet même après arrêt du traitement (Picarda et al., 2017). Néanmoins, chez les animaux greffés, la fonction des Tregs n'est pas altérée comme dans le modèle de rat Aire^{-/-}. Il est possible que dans ce modèle la capacité suppressive des Tregs ne soit pas suffisante pour contrôler la réponse auto-immune après l'arrêt du traitement.

En conclusion, cette thèse démontre que le rat déficient pour Aire est un modèle unique, présentant un phénotype plus proche de la maladie APECED. Ce modèle a le potentiel de devenir le modèle permettant de comprendre l'ensemble des mécanismes impliquant Aire dans la sélection et la fonction des T régulateurs. Ce modèle de rat pourrait également être utilisé afin de comprendre le rôle de Aire dans la périphérie. Enfin, ce modèle est, à l'heure actuelle, le seul permettant de tester des thérapies innovantes et immunomodulatrices du syndrome APECED chez l'Homme.

Bibliographie :

- Abramson, J., and Anderson, G. (2017). Thymic Epithelial Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 85–118.
- Adamson, K.A., Pearce, S.H.S., Lamb, J.R., Seckl, J.R., and Howie, S.E.M. (2004). A comparative study of mRNA and protein expression of the autoimmune regulator gene (Aire) in embryonic and adult murine tissues. *J. Pathol.* 202, 180–187.
- Akimova, T., Beier, U.H., Wang, L., Levine, M.H., and Hancock, W.W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 6.
- Akiyama, T., Shimo, Y., Yanai, H., Qin, J., Ohshima, D., Maruyama, Y., Asaumi, Y., Kitazawa, J., Takayanagi, H., Penninger, J.M., et al. (2008). The Tumor Necrosis Factor Family Receptors RANK and CD40 Cooperatively Establish the Thymic Medullary Microenvironment and Self-Tolerance. *Immunity* 29, 423–437.
- Akiyama, T., Shinzawa, M., and Akiyama, N. (2012). TNF receptor family signaling in the development and functions of medullary thymic epithelial cells. *Front. Immunol.* 3.
- Alves, N.L., Richard-Le Goff, O., Huntington, N.D., Sousa, A.P., Ribeiro, V.S.G., Bordack, A., Vives, F.L., Peduto, L., Chidgey, A., Cumano, A., et al. (2009). Characterization of the thymic IL-7 niche in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1512–1517.
- Alves, N.L., Takahama, Y., Ohigashi, I., Ribeiro, A.R., Baik, S., Anderson, G., and Jenkinson, W.E. (2014). Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments. *Eur. J. Immunol.* 44, 16–22.
- Anderson, M.S. (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* (80-.). 298, 1395–1401.
- Anderson, G., and Takahama, Y. (2012). Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol.* 33, 256–263.
- Anderson, M.S., and Bluestone, J.A. (2005). The NOD Mouse: A Model of Immune Dysregulation.
- Anderson, G., Partington, K.M., Eric, J., and Jenkinson, E.J. (1998). Differential Effects of Peptide Diversity and Stromal Cell Type in Positive and Negative Selection in the Thymus. *J. Immunol.* 161, 6599–6603.
- Anderson, M., Anderson, S.K., and Farr, a G. (2000). Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int Immunol* 12, 1105–1110.
- Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Chen, Z., Berzins, S.P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23, 227–239.
- Andersson, J., Tran, D.Q., Pesu, M., Davidson, T.S., Ramsey, H., O’Shea, J.J., and Shevach, E.M. (2008). CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF- β -dependent manner. *J. Exp. Med.* 205, 1975–1981.
- Apostolou, I., and von Boehmer, H. (2004). In Vivo Instruction of Suppressor Commitment in Naive T Cells. *J. Exp. Med.* 199, 1401–1408.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and Von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol.* 3, 756–763.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C.-L., and Shortman, K. (1993). Thymic dendritic cells and T cells

develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362, 761–763.

Aricha, R., Feferman, T., Scott, H.S., Souroujon, M.C., Berrih-Aknin, S., and Fuchs, S. (2011). The susceptibility of Aire^{-/-} mice to experimental myasthenia gravis involves alterations in regulatory T cells. *J. Autoimmun.* 36, 16–24.

Arora, K., Program, B., and Arbor, A. (2015). Late stages of T cell maturation in the thymus involve NF-kappaB and tonic type I interferon signaling. *17*, 165–187.

Arstila Talvensaari, P., Perheentupa, J., Miettinen, A., Gylling, T., Franssila, R., Pöntynen, N., Eliisa Kekäläinen, K., Tuovinen, H., Joensuu, J., Kekäläinen, E., et al. (2007). A Defect of Regulatory T Cells in Patients with Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy. *J Immunol Ref. J. Immunol. Univ. Fachbib. Medizin Ess.* 178, 1208–1215.

Aschenbrenner, K., D’Cruz, L.M., Vollmann, E.H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L.K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* 8, 351–358.

Azzam, H.S., DeJarnette, J.B., Huang, K., Emmons, R., Park, C.-S., Sommers, C.L., El-Khoury, D., Shores, E.W., and Love, P.E. (2001). Fine Tuning of TCR Signaling by CD5. *J. Immunol.* 166, 5464–5472.

Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S.E., Perroni, L., Dagnabricarelli, F., Sartirana, C., Matthes-martin, S., Lawitschka, A., et al. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *116*, 1713–1722.

Bacchetta, R., Lucarelli, B., Sartirana, C., Gregori, S., Lupo Stanghellini, M.T., Miqueu, P., Tomiuk, S., Hernandez-Fuentes, M., Gianolini, M.E., Greco, R., et al. (2014). Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T Cells. *Front. Immunol.* 5.

Baik, S., Jenkinson, E.J., Lane, P.J.L., Anderson, G., and Jenkinson, W.E. (2013). Generation of both cortical and Aire⁺ medullary thymic epithelial compartments from CD205⁺ progenitors. *Eur. J. Immunol.* 43, 589–594.

Bakhru, P., and Su, M.A. (2016). Estrogen turns down “the AIRE.” *J. Clin. Invest.* 126, 1239–1241.

Baldwin, K., Trenchak, B., Altman, J., and Davis, M. (1999). Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J. Immunol. (Baltimore, Md 1950)* 163, 689–698.

Bendriss-Vermare, N., Barthélémy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., and Brière, F. (2001). Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 107, 835–844.

Bensinger, S.J., Bandeira, a, Jordan, M.S., Caton, a J., and Laufer, T.M. (2001). Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* 194, 427–438.

Bevan, M.J. (1977). In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature* 269, 417–418.

Bezie, S., Picarda, E., Tesson, L., Renaudin, K., Durand, J., M??noret, S., M??rieau, E.,

- Chiffolleau, E., Guillonnet, C., Caron, L., et al. (2015). Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS One* *10*, 1–14.
- Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonnet, C. (2015a). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* *125*, 3952–3964.
- Bézie, S., Picarda, E., Ossart, J., Tesson, L., Usal, C., Renaudin, K., Anegon, I., and Guillonnet, C. (2015b). IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* *125*, 3952–3964.
- Bhandoola, A., Cibotti, R., Punt, J.A., Granger, L., Adams, A.J., Sharrow, S.O., and Singer, A. (1999). Positive selection as a developmental progression initiated by alpha beta TCR signals that fix TCR specificity prior to lineage commitment. *Immunity* *10*, 301–311.
- Birkeland, M.L., Johnson, P., Trowbridge, I.S., and Puré, E. (1989). Changes in CD45 isoform expression accompany antigen induced murine T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6734–6738.
- Björnses, P., Aaltonen, J., Vikman, A., Perheentupa, J., Ben-Zion, G., Chiumello, G., Dahl, N., Heideman, P., Hoorweg-Nijman, J.J., Mathivon, L., et al. (1996). Genetic homogeneity of autoimmune polyglandular disease type I. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 879–886.
- Björnses, P., Pelto-Huikko, M., Kaukonen, J., Aaltonen, J., Peltonen, L., and Ulmanen, I. (1999). Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 259–266.
- Blanco, T., and Saban, D.R. (2015). TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in CD8⁺ T cells. *15*, 1453–1454.
- Bleul, C.C., and Boehm, T. (2000). Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3371–3379.
- Boehm, T., and Swann, J.B. (2014). Origin and Evolution of Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* *2*, 259–283.
- Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K., and Bleul, C.C. (2003). Thymic Medullary Epithelial Cell Differentiation, Thymocyte Emigration, and the Control of Autoimmunity Require Lympho–Epithelial Cross Talk via LTβR. *J. Exp. Med.* *198*, 757–769.
- von Boehmer, H., Aifantis, I., Gounari, F., Azogui, O., Haughn, L., Apostolou, I., Jaekel, E., Grassi, F., and Klein, L. (2003). Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol. Rev.* *191*, 62–78.
- Von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor αα-chain: Not just a surrogate. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 571–577.
- Le Borgne, M., Ladi, E., Dzhagalov, I., Herzmark, P., Liao, Y.F., Chakraborty, A.K., and Robey, E.A. (2009). The impact of negative selection on thymocyte migration in the medulla. *Nat. Immunol.* *10*, 823–830.
- Bowlus, C.L., Ahn, J., Chu, T., and Gruen, J.R. (1999). Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus. *Cell. Immunol.* *196*, 80–86.
- Brennecke, P., Reyes, A., Pinto, S., Rattay, K., Nguyen, M., Küchler, R., Huber, W., Kyewski, B., and Steinmetz, L.M. (2015). Single-cell transcriptome analysis reveals

coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* *16*, 933–941.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guintier, T.I., Yamashita, Y., Sharrow, S.O., and Singer, A. (2000). Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* *13*, 59–71.

Brun, V., Bastian, H., Neveu, V., and Foussat, A. (2009). Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol.* *9*, 609–613.

Burchill, M.A., Yang, J., Vang, K.B., and Farrar, M.A. (2007). Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol. Lett.* *114*, 1–8.

Cabaniols, J.-P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P., and Kanellopoulos, J.M. (2001). Most α/β T Cell Receptor Diversity Is Due to Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *J. Exp. Med.* *194*, 1385–1390.

Candéias, S., Muegge, K., and Durum, S.K. (1996). Junctional diversity in signal joints from T cell receptor beta and delta loci via terminal deoxynucleotidyl transferase and exonucleolytic activity. *J. Exp. Med.* *184*, 1919–1926.

Carrier, A., Nguyen, C., Victorero, G., Granjeaud, S., Rocha, D., Bernard, K., Miazek, A., Ferrier, P., Malissen, M., Naquet, P., et al. (1999). Differential gene expression in CD3 ϵ - and RAG1-deficient thymuses: definition of a set of genes potentially involved in thymocyte maturation. *Immunogenetics* *50*, 255–270.

Carroll, D. (2008). Progress and prospects: Zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther.* *15*, 1463–1468.

Carter, J.D., Calabrese, G.M., Naganuma, M., and Lorenz, U. (2005). Deficiency of the Src Homology Region 2 Domain-Containing Phosphatase 1 (SHP-1) Causes Enrichment of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* *174*, 6627–6638.

Carvalho-Gaspar, M., Jones, N.D., Luo, S., Martin, L., Brook, M.O., and Wood, K.J. (2008). Location and Time-Dependent Control of Rejection by Regulatory T Cells Culminates in a Failure to Generate Memory T Cells. *J. Immunol.* *180*, 6640–6648.

Cetani, F., Barbesino, G., Borsari, S., Pardi, E., Cianferotti, L., Pinchera, A., and Marcocci, C. (2001). A novel mutation of the autoimmune regulator gene in an Italian kindred with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, acting in a dominant fashion and strongly cosegregating with hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 4747–4752.

Chakravarty, S., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2009). Structure and Site-Specific Recognition of Histone H3 by the PHD Finger of Human Autoimmune Regulator. *Structure* *17*, 670–679.

Chan, A.Y., and Anderson, M.S. (2015). Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1356*, 80–89.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of Peripheral CD4⁺ CD25⁻ Naïve T Cells to CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor *Foxp3*. *J. Exp. Med.* *198*, 1875–1886.

Chen, Z., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). How defects in central tolerance impinge on

- a deficiency in regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 14735–14740.
- Cheng, L., Guo, J., Sun, L., Fu, J., Barnes, P.F., Metzger, D., Chambon, P., Oshima, R.G., Amagai, T., and Su, D.M. (2010). Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic atrophy. *J. Biol. Chem.* *285*, 5836–5847.
- Chien, Y.H., Gascoigne, N.R., Kavalier, J., Lee, N.E., and Davis, M.M. (1984). Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature* *309*, 322–326.
- Chin, R.K., Lo, J.C., Kim, O., Blink, S.E., Christiansen, P.A., Peterson, P., Wang, Y., Ware, C., and Fu, Y.-X. (2003). Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression. *Nat. Immunol.* *4*, 1121–1127.
- Ciubotariu, R., Colovai, A.I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells. *J. Immunol.* *161*, 5193–5202.
- Clatworthy, A.E., Valencia-Burton, M.A., Haber, J.E., and Oettinger, M.A. (2005). The MRE11-RAD50-XRS2 complex, in addition to other non-homologous end-joining factors, is required for V(D)J joining in yeast. *J. Biol. Chem.* *280*, 20247–20252.
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., and Vignali, D.A.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566–569.
- Collison, L.W., Chaturvedi, V., Henderson, A.L., Giacomini, P.R., Guy, C., Bankoti, J., Finkelstein, D., Forbes, K., Workman, C.J., Brown, A., et al. (2010). Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* *11*, 1093–1101.
- Coquet, J.M., Ribot, J.C., Bąbała, N., Middendorp, S., van der Horst, G., Xiao, Y., Neves, J.F., Fonseca-Pereira, D., Jacobs, H., Pennington, D.J., et al. (2013). Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J. Exp. Med.* *210*, 715–728.
- Cordier, A.C., and Haumont, S.M. (1980). Development of thymus, parathyroids, and ultimobranchial bodies in NMRI and nude mice. *Am. J. Anat.* *157*, 227–263.
- Cowan, J.E., McCarthy, N.I., and Anderson, G. (2016). CCR7 Controls Thymus Recirculation, but Not Production and Emigration, of Foxp3⁺ T Cells. *Cell Rep.* *14*, 1041–1048.
- Danan-Gotthold, M., Guyon, C., Giraud, M., Levanon, E.Y., Abramson, J., Klein, L., Kyewski, B., Allen, P., Hogquist, K., Derbinski, J., et al. (2016). Extensive RNA editing and splicing increase immune self-representation diversity in medullary thymic epithelial cells. *Genome Biol.* *17*, 219.
- Daniely, D., Kern, J., and Cebula, A. (2010). Diversity of TCRs on Natural Foxp3⁺ T Cells in Mice Lacking Aire Expression. *J. Immunol.* *184*, 6865–6873.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. (2007). Cutting Edge: IL-2 Is Essential for TGF- β -Mediated Induction of Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* *178*, 4022–4026.
- Davis, M.M. (2015). Not-So-Negative Selection. *Immunity* *43*, 833–835.
- Davis, M.A., Bynum, J.P.W., Sirovich, B.E., Practice, C., Science, E., Medical, A., and Junction, W.R. (2015). Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Immunity* *43*, 777–783.

- Derbinski, J., Schulte, a, Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Derbinski, J., Gäbler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhausen, M., Peltonen, L., Walter, J., and Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202, 33–45.
- Desanti, G.E., Cowan, J.E., Baik, S., Parnell, S.M., White, A.J., Penninger, J.M., Lane, P.J.L., Jenkinson, E.J., Jenkinson, W.E., and Anderson, G. (2012). Developmentally Regulated Availability of RANKL and CD40 Ligand Reveals Distinct Mechanisms of Fetal and Adult Cross-Talk in the Thymus Medulla. *J. Immunol.* 189, 5519–5526.
- van Ewijk, W., Shores, E.W., and Singer, A. (1994). Crosstalk in the mouse thymus. *Trends Immunol.* 15, 214–217.
- Fehling, H., Krotkova, A., Saint-Ruf, C., and von Boehmer, H. (1995). Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375, 795–798.
- Ferguson, B.J., Alexander, C., Rossi, S.W., Liiv, I., Rebane, A., Worth, C.L., Wong, J., Laan, M., Peterson, P., Jenkinson, E.J., et al. (2008). AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem.* 283, 1723–1731.
- Ferrero, I., Koch, U., Claudinot, S., Favre, S., Radtke, F., Luther, S.A., and MacDonald, H.R. (2013). DL4-mediated Notch signaling is required for the development of fetal alphabeta and gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 43, 2845–2853.
- Finnish-German APECED Consortium (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* 17, 399–403.
- Fisson, S., Darrasse-Jèze, G., Litvinova, E., Septier, F., Klatzmann, D., Liblau, R., and Salomon, B.L. (2003). Continuous Activation of Autoreactive CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells in the Steady State. *J. Exp. Med.* 198, 737–746.
- Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H.D., Bopp, T., Schmitt, E., et al. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 5, 0169–0178.
- Florea, B.I., Verdoes, M., Li, N., Van Der Linden, W.A., Geurink, P.P., Van Den Elst, H., Hofmann, T., De Ru, A., Van Veelen, P.A., Tanaka, K., et al. (2010). Activity-based profiling reveals reactivity of the murine thymoproteasome-specific subunit $\beta 5t$. *Chem. Biol.* 17, 795–801.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. 4.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6, 1142–1151.
- Fournié, G.J., Cautain, B., Xystrakis, E., Damoiseaux, J., Mas, M., Lagrange, D., Bernard, I., Subra, J.F., Pelletier, L., Druet, P., 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. *Immunol. Rev.* 184, 145–160.
- Fukui, Y., Ishimoto, T., Utsuyama, M., Gytoku, T., Koga, T., Nakao, K., Hirokawa, K.,

- Katsuki, M., and Sasazuki, T. (1997). Positive and negative CD4⁺ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus. *Immunity* 6, 401–410.
- Gäbler, J., Arnold, J., and Kyewski, B. (2007). Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3363–3372.
- Gagliani, N., Magnani, C.F., Huber, S., Gianolini, M.E., Pala, M., Licona-Limon, P., Guo, B., Herbert, D.R., Bulfone, A., Trentini, F., et al. (2013). Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat. Med.* 19, 739–746.
- Gallegos, A.M., and Bevan, M.J. (2004). Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* 200, 1039–1049.
- Gardner, J.M., DeVoss, J.J., Friedman, R.S., Wong, D.J., Tan, Y.X., Zhou, X., Johannes, K.P., Su, M.A., Chang, H.Y., Krummel, M.F., et al. (2008). Deletional Tolerance Mediated by Extrathymic Aire-Expressing Cells. *Science* (80-.). 321, 843–847.
- Garg, G., Nikolouli, E., Hardtke-Wolenski, M., Toker, A., Ohkura, N., Beckstette, M., Miyao, T., Geffers, R., Floess, S., Gerdes, N., et al. (2017). Unique properties of thymic antigen-presenting cells promote epigenetic imprinting of alloantigen-specific regulatory T cells. *Oncotarget* 8, 35542–35557.
- Gascoigne, N.R., Chien, Y., Becker, D.M., Kavaler, J., and Davis, M.M. (1984). Genomic organization and sequence of T-cell receptor beta-chain constant- and joining-region genes. *Nature* 310, 387–391.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18, 723–737.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21, 903–914.
- Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., and Stephen, A. (1972). Suppressor T Cells. 586–590.
- Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., et al. (2009). Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* (80-.). 325, 433.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175–1178.
- Giraud, M., Yoshida, H., Abramson, J., Rahl, P.B., Young, R.A., Mathis, D., and Benoist, C. (2012). Aire unleashes stalled RNA polymerase to induce ectopic gene expression in thymic epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 535–540.
- Glisic, S., Ehlenbach, S., Jailwala, P., Waukau, J., Jana, S., and Ghosh, S. (2010). Inducible regulatory T cells (iTregs) from recent-onset type 1 diabetes subjects show increased in vitro suppression and higher ITCH levels compared with controls. *Cell Tissue Res.* 339, 585–595.
- Goldfarb, Y., Kadouri, N., Levi, B., Sela, A., Herzig, Y., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N., and Abramson, J. (2016). HDAC3 Is a Master Regulator of mTEC Development. *Cell Rep.* 15, 651–665.
- Gommeaux, J., Grégoire, C., Nguessan, P., Richelme, M., Malissen, M., Guerder, S., Malissen, B., and Carrier, A. (2009). Thymus-specific serine protease regulates positive

selection of a subset of CD4⁺ thymocytes. *Eur. J. Immunol.* 39, 956–964.

Gondek, D.C., Lu, L.-F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S., and Noelle, R.J. (2005). Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism. *J. Immunol.* 174, 1783–1786.

Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 435, 590–597.

Gordon, J., Wilson, V.A., Blair, N.F., Sheridan, J., Farley, A., Wilson, L., Manley, N.R., and Blackburn, C.C. (2004). Functional evidence for a single endodermal origin for the thymic epithelium. *Nat. Immunol.* 5, 546–553.

Gossens, K., Naus, S., Corbel, S.Y., Lin, S., Rossi, F.M.V., Kast, J., and Ziltener, H.J. (2009). Thymic progenitor homing and lymphocyte homeostasis are linked via S1P-controlled expression of thymic P-selectin/CCL25. *J. Exp. Med.* 206, 761–778.

Gotot, J., Gottschalk, C., Leopold, S., Knolle, P.A., Yagita, H., Kurts, C., and Ludwig-Portugall, I. (2012). Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10468–10473.

Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2007a). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing Aire. *J. Exp. Med.* 204, 2521–2528.

Gray, D.H.D., Seach, N., Ueno, T., Milton, M.K., Liston, A., Lew, A.M., Goodnow, C.C., and Boyd, R.L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* 108, 3777–3785.

Gray, D.H.D., Tull, D., Ueno, T., Seach, N., Classon, B.J., Chidgey, A., McConville, M.J., and Boyd, R.L. (2007b). A unique thymic fibroblast population revealed by the monoclonal antibody MTS-15. *J. Immunol.* 178, 4956–4965.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., Ley, T.J., and Ctls, C.T. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Analysis* 104, 2840–2848.

Groux, H., O’Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., De Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737–742.

Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.-X., Chiffolleau, E., Hervé, C., Li, X.-L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Ménoret, S., et al. (2007a). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117, 1096–1106.

Guillonnet, C., Hill, M., Chiffolleau, E., Li, X., Usal, C., Tesson, L., Saoudi, A., Mauff, B. Le, Cuturi, M.C., and Anegon, I. (2007b). CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Group* 117.

Hale, J.S., and Fink, P.J. (2009). Back to the Thymus: Peripheral T Cells Come Home. *Immunol Cell Biol* 87, 58–64.

Halonen, M., Pelto-Huikko, M., Eskelin, P., Peltonen, L., Ulmanen, I., and Kolmer, M. (2001). Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *J. Histochem. Cytochem.* 49, 197–208.

Hamazaki, Y., Fujita, H., Kobayashi, T., Choi, Y., Scott, H.S., Matsumoto, M., and

- Minato, N. (2007). Medullary thymic epithelial cells expressing Aire represent a unique lineage derived from cells expressing claudin. *Nat. Immunol.* 8, 304–311.
- Hamrouni, A., Aublin, A., Guillaume, P., and Maryanski, J.L. (2003). T cell receptor gene rearrangement lineage analysis reveals clues for the origin of highly restricted antigen-specific repertoires. *J. Exp. Med.* 197, 601–614.
- Han, G., Shao, H., Peng, Y., Zhang, P., Ke, Y., Kaplan, H.J., and Sun, D. (2007). Suppressor role of rat CD8⁺CD45^{RC}low T cells in experimental autoimmune uveitis (EAU). *J. Neuroimmunol.* 183, 81–88.
- Haribhai, D., Lin, W., Edwards, B., Ziegelbauer, J., Salzman, N.H., Carlson, M.R., Li, S.-H., Simpson, P.M., Chatila, T.A., and Williams, C.B. (2009). A central role for induced regulatory T cells in tolerance induction in experimental colitis. *J. Immunol.* 182, 3461–3468.
- Havran, W.L., and Allison, J.P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature* 335, 443–445.
- Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. (2003). CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 107–137.
- Hikosaka, Y., Nitta, T., Ohigashi, I., Yano, K., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Matsuo, K., Penninger, J.M., Takayanagi, H., et al. (2008). The Cytokine RANKL Produced by Positively Selected Thymocytes Fosters Medullary Thymic Epithelial Cells that Express Autoimmune Regulator. *Immunity* 29, 438–450.
- Holländer, G.A., Wang, B., Nichogiannopoulou, A., Platenburg, P.P., Van Ewijk, W., Burakoff, S.J., Gutierrez-Ramos, J.C., and Terhorst, C. (1995). Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* 373, 350–353.
- Honey, K., Nakagawa, T., Peters, C., and Rudensky, A. (2002). Cathepsin L regulates CD4⁺ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J. Exp. Med.* 195, 1349–1358.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Immunity* 19, 1057–1062.
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Holländer, G.A., Shima, D.T., and Habu, S. (2008). Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* 205, 2507–2513.
- Hsieh, C.S., Liang, Y., Tynzik, A.J., Self, S.G., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2004). Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21, 267–277.
- Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 7, 401–410.
- Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., et al. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21, 503–513.
- Hubert, F.-X., Kinkel, S. a, Webster, K.E., Cannon, P., Crewther, P.E., Proeitto, A.I., Wu, L., Heath, W.R., and Scott, H.S. (2008). A specific anti-Aire antibody reveals aire expression is restricted to medullary thymic epithelial cells and not expressed in periphery.

J. Immunol. 180, 3824–3832.

Hubert, F.-X., Kinkel, S.A., Crewther, P.E., Cannon, P.Z.F., Webster, K.E., Link, M., Uibo, R., O'Bryan, M.K., Meager, A., Forehan, S.P., et al. (2009). Aire-Deficient C57BL/6 Mice Mimicking the Common Human 13-Base Pair Deletion Mutation Present with Only a Mild Autoimmune Phenotype. J. Immunol. 182, 3902–3918.

Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., and von Boehmer, H. (1991). Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. Cell 66, 533–540.

Irla, M., Hugues, S., Gill, J., Nitta, T., Hikosaka, Y., Williams, I.R., Hubert, F.X., Scott, H.S., Takahama, Y., Holländer, G.A., et al. (2008). Autoantigen-Specific Interactions with CD4⁺ Thymocytes Control Mature Medullary Thymic Epithelial Cell Cellularity. Immunity 29, 451–463.

Irla, M., Hollander, G., and Reith, W. (2010). Control of central self-tolerance induction by autoreactive CD4⁺ thymocytes. Trends Immunol. 31, 71–79.

Irla, M., Guerri, L., Guenot, J., Sergé, A., Lantz, O., Liston, A., Imhof, B.A., Palmer, E., and Reith, W. (2012). Antigen Recognition By Autoreactive Cd4⁺ Thymocytes Drives Homeostasis Of The Thymic Medulla. PLoS One 7, 1–12.

Irving, B.A., Alt, F.W., and Killeen, N. (1998). Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. Science (80-.). 280, 905–908.

Jiang, S., Tugulea, S., Pennesi, G., Liu, Z., Mulder, A., Lederman, S., Harris, P., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (1998). Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. Hum. Immunol. 59, 690–699.

Jiang, W., Anderson, M.S., Bronson, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. J. Exp. Med. 202, 805–815.

Jolicoeur, C., Hanahan, D., and Smith, K.M. (1994). T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 6707–6711.

Kallenbach, S., Doyen, N., Fanton d'Andon, M., and Rougeon, F. (1992). Three lymphoid-specific factors account for all junctional diversity characteristic of somatic assembly of T-cell receptor and immunoglobulin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 2799–2803.

Kappler, J.W., Roehm, N., and Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell 49, 273–280.

Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa, S., Setoguchi, K., Miyazaki, J. -i., and Yamamoto, K. (2002). Generation of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells from Autoreactive T Cells Simultaneously with Their Negative Selection in the Thymus and from Nonautoreactive T Cells by Endogenous TCR Expression. J. Immunol. 168, 4399–4405.

Kennedy, N.J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R.C. (1999). Caspase activation is required for T cell proliferation. J. Exp. Med. 190, 1891–1896.

Kirchner, T., Tzartos, S., Hoppe, F., Schalke, B., Wekerle, H., and Müller-Hermelink, H.K. (1988). Pathogenesis of myasthenia gravis. Acetylcholine receptor-related antigenic determinants in tumor-free thymuses and thymic epithelial tumors. Am. J. Pathol. 130, 268–280.

Kisielow, P., Teh, H.S., Blüthmann, H., and von Boehmer, H. (1988a). Positive selection

- of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730–733.
- Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., and von Boehmer, H. (1988b). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742–746.
- Klein, L., Klein, T., Rütger, U., and Kyewski, B. (1998). CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J. Exp. Med.* 188, 5–16.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* 14, 377–391.
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., MacDonald, H.R., and Radtke, F. (2008). Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* 205, 2515–2523.
- Kogawa, K., Kudoh, J., Nagafuchi, S., Ohga, S., Katsuta, H., Ishibashi, H., Harada, M., Hara, T., and Shimizu, N. (2002a). Distinct clinical phenotype and immunoreactivity in Japanese siblings with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS-1) associated with compound heterozygous novel AIRE gene mutations. *Clin. Immunol.* 103, 277–283.
- Kogawa, K., Nagafuchi, S., Katsuta, H., Kudoh, J., Tamiya, S., Sakai, Y., Shimizu, N., and Harada, M. (2002b). Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol. Lett.* 80, 195–198.
- Koh, A.S., Kingston, R.E., Benoist, C., and Mathis, D. (2010). Global relevance of Aire binding to hypomethylated lysine-4 of histone-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13016–13021.
- Korecka-Polak, A., Duszota, A., Wierzbicki, P., Niemczyk, M., Bocian, K., Kłosowska, D., Paczek, L., Górski, A., and Korczak-Kowalska, G. (2011). Human peripheral blood CD8+ CD28- T cells of renal allograft recipients do not express FOXP3 protein. *Transplant. Proc.* 43, 2917–2921.
- Krangel, M.S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: Accessibility and beyond. *Nat. Immunol.* 4, 624–630.
- Kruisbeek, A.M., Sharrow, S.O., Mathieson, B.J., and Singer, A. (2018). The H-2 phenotype of the thymus dictates the self-specificity expressed by thymic but not splenic cytotoxic T lymphocyte precursors in thymus-engrafted nude mice . Why The JI ? • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision • No Triage ! .
- Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., et al. (2005). Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol* 174, 1862–1870.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A CENTRAL ROLE FOR CENTRAL TOLERANCE. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 571–606.
- Laakso, S.M., Laurinolli, T.T., Rossi, L.H., Lehtoviita, A., Sairanen, H., Perheentupa, J., Kekäläinen, E., and Arstila, T.P. (2010). Regulatory T cell defect in APECED patients is associated with loss of naive FOXP3+ precursors and impaired activated population. *J. Autoimmun.* 35, 351–357.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., and Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential

- for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34, 2480–2488.
- Lafaille, J.J., DeCloux, A., Bonneville, M., Takagaki, Y., and Tonegawa, S. (1989). Junctional sequences of T cell receptor $\gamma\delta$ genes: Implications for $\gamma\delta$ T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59, 859–870.
- Lafaille, J.J., Nagashima, K., Katsuki, M., and Tonegawa, A. (1994). High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient auto-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell* 78, 399–408.
- Lee, J.W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J.E., Cheng, A.C., Yonekura, A.R., Heath, J.K., and Turley, S.J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat. Immunol.* 8, 181–190.
- Legoux, F.P., Lim, J.B., Cauley, A.W., Dikiy, S., Ertelt, J., Mariani, T.J., Sparwasser, T., Way, S.S., and Moon, J.J. (2015). CD4⁺ T Cell Tolerance to Tissue-Restricted Self Antigens Is Mediated by Antigen-Specific Regulatory T Cells Rather Than Deletion. *Immunity* 43, 896–908.
- Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bösl, M.R., Holländer, G.A., Hayashi, Y., de Waal Malefyt, R., et al. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J. Exp. Med.* 208, 383–394.
- LEONARD, M.F. (1946). Chronic idiopathic hypoparathyroidism with superimposed Addison's disease in a child. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 493–506.
- Li, J., Park, J., Foss, D., and Goldschneider, I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 206, 607–622.
- Li, S., Chang, H.H., Niewolik, D., Hedrick, M.P., Pinkerton, A.B., Hassig, C.A., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2014). Evidence that the DNA endonuclease ARTEMIS also has intrinsic 5'-exonuclease activity. *J. Biol. Chem.* 289, 7825–7834.
- Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. (2010). Mechanism and Localization of CD8 Regulatory T Cells in a Heart Transplant Model of Tolerance. *J. Immunol.* 185, 823–833.
- Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., and Alt, F.W. (1995). The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 83, 1079–1089.
- Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B.M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., et al. (2008). Regulatory T Cells Inhibit Dendritic Cells by Lymphocyte Activation Gene-3 Engagement of MHC Class II. *J. Immunol.* 180, 5916–5926.
- Linsk, R., Gottesman, M., Pernis, B., Sommer, S., and Sarkar, G. (1989). Are Tissues a patch quilt of ectopic gene expression? *Science* (80-.). 246, 261.
- Lio, C.-W.J., and Hsieh, C.-S. (2008). A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28, 100–111.
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., and Goodnow, C.C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat. Immunol.* 4, 350–354.
- Liu, X., and Bosselut, R. (2004). Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat. Immunol.* 5, 280–288.

- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., de St. Groth, B.F., et al. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *203*, 1701–1711.
- Liu, Y., Zhang, P., Li, J., Kulkarni, A.B., Perruche, S., and Chen, W. (2008). A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *9*, 632–640.
- Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., and Suciuc-Foca, N. (1998). Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8⁺ CD28⁻ T cells. *Int. Immunol.* *10*, 775–783.
- Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P., and Irla, M. (2015). Thymic crosstalk coordinates medulla organization and T-cell tolerance induction. *Front. Immunol.* *6*.
- Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. (2011). Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur. J. Immunol.* *41*, 1652–1662.
- Mahmud, S.A., Manlove, L.S., Schmitz, H.M., Xing, Y., Wang, Y., Owen, D.L., Schenkel, J.M., Boomer, J.S., Green, J.M., Yagita, H., et al. (2014). Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* *15*, 473–481.
- Malchow, S., Leventhal, D.S., Nishi, S., Fischer, B.I., Shen, L., Paner, G.P., Amit, A.S., Kang, C., Geddes, J.E., Allison, J.P., et al. (2013). Aire-dependent thymic development of tumor-associated regulatory T cells. *Science* (80-.). *1219*, 1219–1224.
- Malek, T.R. (2008). The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 453–479.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. (2002). CD4 Regulatory T Cells Prevent Lethal Autoimmunity in IL-2R β -Deficient Mice. *Immunity* *17*, 167–178.
- Malhotra, D., Linehan, J.L., Dileepan, T., Lee, Y.J., Purtha, W.E., Lu, J. V, Nelson, R.W., Fife, B.T., Orr, H.T., Anderson, M.S., et al. (2016). Tolerance is established in polyclonal CD4⁺ T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat. Immunol.* *17*, 187–195.
- Manley, N.R., and Condie, B.G. (2010). Transcriptional regulation of thymus organogenesis and thymic epithelial cell differentiation (Elsevier Inc.).
- Martins, V.C., Boehm, T., and Bleul, C.C. (2008). Ltr Signaling Does Not Regulate Aire-Dependent Transcripts in Medullary Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* *181*, 400–407.
- Mathis, D., and Benoist, C. (2009). Aire. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 287–312.
- Mayer, C.E., Žuklys, S., Zhanybekova, S., Ohigashi, I., Teh, H.Y., Sansom, S.N., Shikama-Dorn, N., Hafen, K., Macaulay, I.C., Deadman, M.E., et al. (2016). Dynamic spatio-temporal contribution of single β 5t⁺ cortical epithelial precursors to the thymus medulla. *Eur. J. Immunol.* *46*, 846–856.
- McCaughy, T.M., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J. Exp. Med.* *204*, 2513–2520.
- McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2008). Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* *205*, 2575–2584.

- van Meerwijk, J.P., Marguerat, S., Lees, R.K., Germain, R.N., Fowlkes, B.J., and MacDonald, H.R. (1997). Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* *185*, 377–383.
- Mellor, A.L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A.M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., and Munn, D.H. (2004). Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int. Immunol.* *16*, 1391–1401.
- Memon, S.A., Sportès, C., Flomerfelt, F.A., Gress, R.E., and Hakim, F.T. (2012). Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood. *J. Immunol. Methods* *375*, 84–92.
- Merkenschlager, M., Amoils, S., Roldan, E., Rahemtulla, A., O’connor, E., Fisher, A.G., and Brown, K.E. (2004). Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice. *J. Exp. Med.* *200*, 1437–1444.
- Metzger, T.C., Khan, I.S., Gardner, J.M., Mouchess, M.L., Johannes, K.P., Krawisz, A.K., Skrzypczynska, K.M., and Anderson, M.S. (2013). Lineage Tracing and Cell Ablation Identify a Post-Aire-Expressing Thymic Epithelial Cell Population. *Cell Rep.* *5*, 166–179.
- Miller, J.F.A.P. (1965). Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness [32]. *Nature* *208*, 1337–1338.
- Miller, J.F., Morahan, G., and Allison, J. (1989). Extrathymic acquisition of tolerance by T lymphocytes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *54 Pt 2*, 807–813.
- Miqueu, P., Guillet, M., Degauque, N., Doré, J.C., Soulillou, J.P., and Brouard, S. (2007). Statistical analysis of CDR3 length distributions for the assessment of T and B cell repertoire biases. *Mol. Immunol.* *44*, 1057–1064.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., et al. (2009). Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4+T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity* *30*, 899–911.
- Morgan, M.E., Bilsen, J.H.M. Van, Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C., Elferink, B.G., Zanden, L. Van Der, Vries, R.R.P. De, Huizinga, T.W.J., et al. (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans.
- Morrow, T., and Peng, A. (1993). Double-strand signal sequence breaks in V (D) J recombination are blunt. *Genes Dev.* *7*, 2520–2532.
- Mouri, Y., Yano, M., Shinzawa, M., Shimo, Y., Hirota, F., Nishikawa, Y., Nii, T., Kiyonari, H., Abe, T., Uehara, H., et al. (2011). Lymphotoxin Signal Promotes Thymic Organogenesis by Eliciting RANK Expression in the Embryonic Thymic Stroma. *J. Immunol.* *186*, 5047–5057.
- Müller, S.M., Terszowski, G., Blum, C., Haller, C., Anquez, V., Kuschert, S., Carmeliet, P., Augustin, H.G., and Rodewald, H.-R. (2005). Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 10587–10592.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *316*, 1349–1354.

- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. (2007). RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat. Genet.* *39*, 1507–1511.
- Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J.E., Lalot, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., et al. (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* *17*, 393–398.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: Critical Role in li Degradation and CD4 T Cell Selection in the Thymus. *Science* (80-.). *280*, 450–453.
- Nazzari, D., Gradolatto, A., Truffault, F., Bismuth, J., and Berrih-Aknin, S. (2014). Human thymus medullary epithelial cells promote regulatory T-cell generation by stimulating interleukin-2 production via ICOS ligand. *Cell Death Dis.* *5*, e1420-13.
- Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* *455*, 396–400.
- Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., et al. (2006). Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J. Clin. Invest.* *116*, 1292–1301.
- Nitta, T., Nitta, S., Lei, Y., Lipp, M., and Takahama, Y. (2009). CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 17129–17133.
- Nitta, T., Murata, S., Sasaki, K., Fujii, H., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Koyasu, S., Tanaka, K., and Takahama, Y. (2010). Thymoproteasome Shapes Immunocompetent Repertoire of CD8+ T Cells. *Immunity* *32*, 29–40.
- Nobili, L., Lionetti, M., and Neri, A. (2016). Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget* *7*, 50666–50681.
- Oettinger, M., Schatz, D., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* (80-.). *248*, 1517–1523.
- Oftedal, B.E., Hellesen, A., Erichsen, M.M., Bratland, E., Vardi, A., Perheentupa, J., Kemp, E.H., Fiskerstrand, T., Viken, M.K., Weetman, A.P., et al. (2015). Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. *Immunity* *42*, 1185–1196.
- Ohigashi, I., Zuklys, S., Sakata, M., Mayer, C.E., Zhanybekova, S., Murata, S., Tanaka, K., Hollander, G.A., and Takahama, Y. (2013). Aire-expressing thymic medullary epithelial cells originate from 5t-expressing progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 9885–9890.
- Ohigashi, I., Zuklys, S., Sakata, M., Mayer, C.E., Hamazaki, Y., Minato, N., Hollander, G.A., and Takahama, Y. (2015). Adult Thymic Medullary Epithelium Is Maintained and Regenerated by Lineage-Restricted Cells Rather Than Bipotent Progenitors. *Cell Rep.* *13*, 1432–1443.
- Ohki, H., Martin, C., Corbel, C., Coltey, M., and Le Douarin, N.M. (1987). Tolerance induced by thymic epithelial grafts in birds. *Science* *237*, 1032–1035.
- Olivares-Villagómez, D., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific

transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 188, 1883–1894.

Ordóñez, L., Bernard, I., L’Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W.C., 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.

Ordóñez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.C., Subra, J.F., and Saoudi, A. (2013). A Higher Risk of Acute Rejection of Human Kidney Allografts Can Be Predicted from the Level of CD45RC Expressed by the Recipients’ CD8 T Cells. *PLoS One* 8, 1–12.

Org, T., Chignola, F., Hetényi, C., Gaetani, M., Rebane, A., Liiv, I., Maran, U., Mollica, L., Bottomley, M.J., Musco, G., et al. (2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *EMBO Rep.* 9, 370–376.

Ouyang, W., Omar Beckett, Qian Ma, and Li, M.O. (2011). Transforming Growth Factor- β Signaling Curbs Thymic Negative Selection Promoting Regulatory T Cell Development. *Immunity* 32, 642–653.

Paiva, R.S., Lino, A.C., Bergman, M.-L., Caramalho, I., Sousa, A.E., Zelenay, S., and Demengeot, J. (2013). Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 6494–6499.

Palmer, D.B., Viney, J.L., Ritter, M.A., Hayday, A.C., and Owen, M.J. (1993). Expression of the $\alpha\beta$ T-Cell Receptor is Necessary for the Generation of the Thymic Medulla. *Dev. Immunol.* 3, 175–179.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1353–1362.

Penit, C. (1986). In vivo thymocyte maturation. BUdR labeling of cycling thymocytes and phenotypic analysis of their progeny support the single lineage model. *J. Immunol.* 137, 2115–2121.

Pennington, D.J., Silva-Santos, B., Shires, J., Theodoridis, E., Pollitt, C., Wise, E.L., Tigelaar, R.E., Owen, M.J., and Hayday, A.C. (2003). The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor $\gamma\delta$ + and $\alpha\beta$ + cells. *Nat. Immunol.* 4, 991–998.

Perry, J.S.A., Lio, C.-W.J., Kau, A.L., Nutsch, K., Yang, Z., Gordon, J.I., Murphy, K.M., and Hsieh, C.-S. (2014). Distinct contributions of Aire and antigen-presenting-cell subsets to the generation of self-tolerance in the thymus. *Immunity* 41, 414–426.

Peterson, P., Org, T., and Rebane, A. (2008). Transcriptional regulation by AIRE: Molecular mechanisms of central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 948–957.

Picarda, E., Bézie, S., Venturi, V., Echasserieu, K., Mérieau, E., Delhumeau, A., Renaudin, K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegón, I., et al. (2014). MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8+ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* 124, 2497–2512.

Picarda, E., Bézie, S., Boucault, L., Autrusseau, E., Kilens, S., Meistermann, D., Martinet, B., Daguin, V., Donnart, A., Charpentier, E., et al. (2017). Transient antibody targeting of CD45RC induces transplant tolerance and potent antigen-specific regulatory T cells. *JCI Insight* 2, e90088.

- Pircher, H., Brduscha, K., Steinhoff, U., Kasai, M., Mizuochi, T., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., Kyewski, B., and Müller, K. -P (1993). Tolerance induction by clonal deletion of CD4+8+ thymocytes in vitro does not require dedicated antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 669–674.
- Pitkänen, J., Doucas, V., Sternsdorf, T., Nakajima, T., Aratani, S., Jensen, K., Will, H., Vähämurto, P., Ollila, J., Vihinen, M., et al. (2000). The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 16802–16809.
- Pitkänen, J., Rebane, A., Rowell, J., Murumägi, A., Ströbel, P., Möll, K., Saare, M., Heikkilä, J., Doucas, V., Marx, A., et al. (2005). Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 944–953.
- Plotkin, J., Prockop, S.E., Lepique, A., and Petrie, H.T. (2003). Critical Role for CXCR4 Signaling in Progenitor Localization and T Cell Differentiation in the Postnatal Thymus. *J. Immunol.* 171, 4521–4527.
- Poliani, P.L., Kisand, K., Marrella, V., Ravanini, M., Notarangelo, L.D., Villa, A., Peterson, P., and Facchetti, F. (2010). Human Peripheral Lymphoid Tissues Contain Autoimmune Regulator-Expressing Dendritic Cells. *Am. J. Pathol.* 176, 1104–1112.
- Pomie, C., Vicente, R., Vuddamalay, Y., Lundgren, B.A., van der Hoek, M., Enault, G., Kagan, J., Fazilleau, N., Scott, H.S., Romagnoli, P., et al. (2011). Autoimmune regulator (AIRE)-deficient CD8+CD28low regulatory T lymphocytes fail to control experimental colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12437–12442.
- Pomié, C., Ménager-marcq, I., and Meerwijk, J.P.M. Van (2008a). Murine CD8+ regulatory T lymphocytes : The new era. *Hum. Immunol.* 69, 708–714.
- Pomié, C., Ménager-Marcq, I., and van Meerwijk, J.P.M. (2008b). Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: The new era. *Hum. Immunol.* 69, 708–714.
- Pöntynen, N., Miettinen, A., Petteri Arstila, T., Kämpe, O., Alimohammadi, M., Vaarala, O., Peltonen, L., and Ulmanen, I. (2006). Aire deficient mice do not develop the same profile of tissue-specific autoantibodies as APECED patients. *J. Autoimmun.* 27, 96–104.
- Porritt, H.E., Gordon, K., and Petrie, H.T. (2003). Kinetics of Steady-state Differentiation and Mapping of Intrathymic-signaling Environments by Stem Cell Transplantation in Nonirradiated Mice. *J. Exp. Med.* 198, 957–962.
- Powrie, F., and Mason, D. (1990). OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* 172, 1701–1708.
- Pribyl, T.M., Campagnoni, C., Kampf, K., Handley, V.W., and Campagnoni, A.T. (1996). The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *J. Neurosci. Res.* 45, 812–819.
- Proietto, A.I., van Dommelen, S., Zhou, P., Rizzitelli, A., D’Amico, A., Steptoe, R.J., Naik, S.H., Lahoud, M.H., Liu, Y., Zheng, P., et al. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 19869–19874.
- Ramsdell, F., Lantz, T., and Fowlkes, B. (1989). A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science (80-.).* 246, 1038–1041.
- Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kämpe, O., Eskelin, P.,

- Pelto-Huikko, M., and Peltonen, L. (2002). Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* 11, 397–409.
- Ripen, A.M., Nitta, T., Murata, S., Tanaka, K., and Takahama, Y. (2011). Ontogeny of thymic cortical epithelial cells expressing the thymoproteasome subunit $\beta 5t$. *Eur. J. Immunol.* 41, 1278–1287.
- Roberts, N.A., White, A.J., Jenkinson, W.E., Turchinovich, G., Nakamura, K., Withers, D.R., McConnell, F.M., Desanti, G.E., Benezech, C., Parnell, S.M., et al. (2012). Rank Signaling Links the Development of Invariant $\gamma\delta$ T Cell Progenitors and Aire + Medullary Epithelium. *Immunity* 36, 427–437.
- Robey, E., Itano, A., Fanslow, W.C., and Fowlkes, B.J. (1994). Constitutive CD8 expression allows inefficient maturation of CD4+ helper T cells in class II major histocompatibility complex mutant mice. *J. Exp. Med.* 179, 1997–2004.
- Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, D., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G., and Salmon, P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87, 483–492.
- Rock, K.L., and Goldberg, A.L. (1999). DEGRADATION OF CELL PROTEINS AND THE GENERATION OF MHC CLASS I-PRESENTED PEPTIDES Presentation of Peptides on Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *Annu. Rev. Immunol* 17, 739–779.
- Rode, I., Martins, V.C., Küblbeck, G., Maltry, N., Tessmer, C., and Rodewald, H.-R. (2015). Foxn1 Protein Expression in the Developing, Aging, and Regenerating Thymus. *J. Immunol.* 195, 5678–5687.
- Rodewald, H.-R. (2008). Thymus Organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 355–388.
- Rodewald, H.R. (2004). Islets of Thymic Epithelium: Telltale Signs of Epithelial Stem-Progenitor Cell Activity in Thymus Organogenesis. In *Handbook of Stem Cells*, pp. 555–564.
- Rodewald, H.R., Paul, S., Haller, C., Bluethmann, H., and Blum, C. (2001). Thymus medulla consisting of epithelial islets each derived from a single progenitor. *Nature* 414, 763–768.
- Rogers, P.R., Pilapil, S., Hayakawa, K., Romain, P.L., and Parker, D.C. (1992). CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *J Immunol* 148, 4054–65.
- Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P.M. (2002). Preferential Recognition of Self Antigens Despite Normal Thymic Deletion of CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 168, 1644–1648.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol.Rev.* 212, 28–50.
- Rooney, S., Alt, F.W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D.O., Schatz, D.G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J. Exp. Med.* 197, 553–565.
- Rosatelli, M.C., Meloni, A., Meloni, A., Devoto, M., Cao, A., Scott, H.S., Peterson, P., Heino, M., Krohn, K.J.E., Nagamine, K., et al. (1998). A common mutation in Sardinian

autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *Hum. Genet.* *103*, 428–434.

Rossi, S.W., Kim, M.-Y., Leibbrandt, A., Parnell, S.M., Jenkinson, W.E., Glanville, S.H., McConnell, F.M., Scott, H.S., Penninger, J.M., Jenkinson, E.J., et al. (2007). RANK signals from CD4⁺CD25⁺ inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J. Exp. Med.* *204*, 1267–1272.

Saare, M., Rebane, A., Rajashekar, B., Vilo, J., and Peterson, P. (2012). Autoimmune regulator is acetylated by transcription coactivator CBP/p300. *Exp. Cell Res.* *318*, 1767–1778.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 531–562.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing 11-2 Receptor α -Chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1152–1164.

Sakonju, S., Brown, D.D., Engelke, D., Yu, S., Shastry, B.S., and Roeder, R.G. (1981). The binding of a transcription factor to deletion mutants of a 5S ribosomal RNA gene. *Cell* *23*, 665–669.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* *12*, 431–440.

Samaranayake, Y.H., and Samaranayake, L.P. (2001). Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin. Microbiol. Rev.* *14*, 398–429.

Sansom, S.N., Shikama-Dorn, N., Zhanybekova, S., Nusspaumer, G., Macaulay, I.C., Deadman, M.E., Heger, A., Ponting, C.P., and Hollt, G. (2014). Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* *24*, 1918–1931.

van Santen, H.-M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T Reg Cells That Differentiate Does Not Increase upon Encounter of Agonist Ligand on Thymic Epithelial Cells. *J. Exp. Med.* *200*, 1221–1230.

Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* *59*, 1035–1048.

Schlissel, M.S. (1998). Structure of nonhairpin coding-end DNA breaks in cells undergoing V(D)J recombination. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2029–2037.

Schmitt, E.G., and Williams, C.B. (2013). Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* *4*, 1–13.

Schwartz, R.H. (2003). T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 305–334.

Scotto, L., Naiyer, A.J., Galluzzo, S., Rossi, P., Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Fang, J., Favera, R.D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. (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. *Hum. Immunol.* *65*, 1297–1306.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation

- of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3, 135–142.
- Shortman, K., Vremec, D., D'Amico, A., Battye, F., and Boyd, R. (1989). Nature of the thymocytes associated with dendritic cells and macrophages in thymic rosettes. *Cell. Immunol.* 119, 85–100.
- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 2, 3–12.
- Shortman, K., Vremec, D., and Egerton, M. (1991). The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells. *J. Exp. Med.* 173, 323–332.
- Siegel, R.M. (2006). Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 308–317.
- Simpson, E. (2006). A historical perspective on immunological privilege. *Immunol. Rev.* 213, 12–22.
- Smith, K.M., Olson, D.C., Hirose, R., and Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: Evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int. Immunol.* 9, 1355–1365.
- Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Domínguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M., and Pujol-Borrell, R. (1998). Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* 161, 5918–5929.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 139–176.
- Stritesky, G.L., Xing, Y., Erickson, J.R., Kalekar, L.A., Wang, X., Mueller, D.L., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Murine thymic selection quantified using a unique method to capture deleted T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4679–4684.
- Su, M.A., Giang, K., Žumer, K., Jiang, H., Oven, I., Rinn, J.L., DeVoss, J.J., Johannes, K.P.A., Lu, W., Gardner, J., et al. (2008). Mechanisms of an autoimmunity syndrome in mice caused by a dominant mutation in Aire. *J. Clin. Invest.* 118, 1712–1726.
- Subra, J.F., Cautain, B., Xystrakis, E., Mas, M., Lagrange, D., van der Heijden, H., van de Gaar, M.J., Druet, P., Fournie, G.J., Saoudi, A., 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. *J Immunol* 166, 2944–2952.
- Suby, J. a, Lessa, A., Tessarollo, B., and Rodrigues-carvalho, C. (2011). Thymus and autoimmunity- production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. 1.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100–103.
- Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C.G. (2002). The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol.* 169, 2461–2465.
- Taflin, C., Nochy, D., Hill, G., Frouget, T., Rioux, N., Vérine, J., Bruneval, P., and Glotz, D. (2010). Regulatory T cells in kidney allograft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function. *Transplantation* 89, 194–199.

- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.* 6, 152–162.
- Tai, X., Erman, B., Alag, A., Mu, J., Kimura, M., Katz, G., Ginter, T., McCaughy, T., Etzensperger, R., Feigenbaum, L., et al. (2013). Foxp3 Transcription Factor Is Proapoptotic and Lethal to Developing Regulatory T Cells unless Counterbalanced by Cytokine Survival Signals. *Immunity* 38, 1116–1128.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 127–135.
- Takahama, Y., Takada, K., Murata, S., and Tanaka, K. (2012). γ -tubulin-containing thymoproteasome: Specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 92–98.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192, 303–310.
- Taniguchi, R.T., DeVoss, J.J., Moon, J.J., Sidney, J., Sette, A., Jenkins, M.K., and Anderson, M.S. (2012). Detection of an autoreactive T-cell population within the polyclonal repertoire that undergoes distinct autoimmune regulator (Aire)-mediated selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 7847–7852.
- Teh, H.S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., and von Boehmer, H. (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335, 229–233.
- Thiault, N., Darrigues, J., Adoue, V., Gros, M., Binet, B., Peral, C., Leobon, B., Fazilleau, N., Joffre, O.P., Robey, E.A., et al. (2015). Peripheral regulatory T lymphocytes recirculating to the thymus suppress the development of their precursors. *Nat. Immunol.* 16, 628–634.
- Thornton, A.M., Korty, P.E., Tran, D.Q., Wohlfert, E.A., Murray, P.E., Belkaid, Y., and Shevach, E.M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells. *J. Immunol.* 184, 3433–3441.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tykocinski, L.-O., Sinemus, A., Rezavandy, E., Weiland, Y., Baddeley, D., Cremer, C., Sonntag, S., Willecke, K., Derbinski, J., and Kyewski, B. (2010). Epigenetic regulation of promiscuous gene expression in thymic medullary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 19426–19431.
- Ucar, A., Ucar, O., Klug, P., Matt, S., Brunk, F., Hofmann, T.G., and Kyewski, B. (2014). Adult thymus contains foxN1⁺ epithelial stem cells that are bipotent for medullary and cortical thymic epithelial lineages. *Immunity* 41, 257–269.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D.H.D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Takahama, Y. (2004). CCR7 Signals Are Essential for Cortex–Medulla Migration of Developing Thymocytes. *J. Exp. Med.* 200, 493–505.
- Ulyanchenko, S., O'Neill, K.E., Medley, T., Farley, A.M., Vaidya, H.J., Cook, A.M., Blair, N.F., and Blackburn, C.C. (2016). Identification of a Bipotent Epithelial Progenitor Population in the Adult Thymus. *Cell Rep.* 14, 2819–2832.

- Vaidya, H.J., Briones Leon, A., and Blackburn, C.C. (2016). FOXP1 in thymus organogenesis and development. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1826–1837.
- Venanzi, E.S., Gray, D.H.D., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Lymphotoxin pathway and Aire influences on thymic medullary epithelial cells are unconnected. *J Immunol* *179*, 5693–5700.
- Vidović, D., and Matzinger, P. (1988). Unresponsiveness to a foreign antigen can be caused by self-tolerance. *Nature* *336*, 222–225.
- Villaseñor, J., Besse, W., Benoist, C., and Mathis, D. (2008). Ectopic expression of peripheral-tissue antigens in the thymic epithelium: probabilistic, monoallelic, misinitiated. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 15854–15859.
- Viret, C., Lamare, C., Guiraud, M., Fazilleau, N., Bour, A., Malissen, B., Carrier, A., and Guerder, S. (2011). Thymus-specific serine protease contributes to the diversification of the functional endogenous CD4 T cell receptor repertoire. *J. Exp. Med.* *208*, 3–11.
- Vogel, A., Strassburg, C.P., Obermayer-Straub, P., Brabant, G., and Manns, M.P. (2002). The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy–candidiasis–ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components. *J. Mol. Med.* *80*, 201–211.
- Wang, X., Laan, M., Bichele, R., Kisand, K., Scott, H.S., and Peterson, P. (2012). Post-Aire maturation of thymic medullary epithelial cells involves selective expression of keratinocyte-specific autoantigens. *Front. Immunol.* *3*, 1–16.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1723–1742.
- Wekerle, H., Bradl, M., Linington, C., Kääb, G., and Kojima, K. (1996). The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol. Rev.* *149*, 231–243.
- White, A.J., Withers, D.R., Parnell, S.M., Scott, H.S., Finke, D., Lane, P.J.L., Jenkinson, E.J., and Anderson, G. (2008). Sequential phases in the development of Aire-expressing medullary thymic epithelial cells involve distinct cellular input. *Eur. J. Immunol.* *38*, 942–947.
- White, A.J., Nakamura, K., Jenkinson, W.E., Saini, M., Sinclair, C., Seddon, B., Narendran, P., Pfeffer, K., Nitta, T., Takahama, Y., et al. (2010). Lymphotoxin Signals from Positively Selected Thymocytes Regulate the Terminal Differentiation of Medullary Thymic Epithelial Cells. *J. Immunol.* *185*, 4769–4776.
- White, A.J., Jenkinson, W.E., Cowan, J.E., Parnell, S.M., Bacon, A., Jones, N.D., Jenkinson, E.J., and Anderson, G. (2014). An Essential Role for Medullary Thymic Epithelial Cells during the Intrathymic Development of Invariant NKT Cells. *J. Immunol.* *192*, 2659–2666.
- Williams, J.A., Zhang, J., Jeon, H., Nitta, T., Ohigashi, I., Klug, D., Kruhlak, M.J., Choudhury, B., Sharrow, S.O., Granger, L., et al. (2014). Thymic Medullary Epithelium and Thymocyte Self-Tolerance Require Cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L Costimulatory Pathways. *J. Immunol.* *192*, 630–640.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3⁺ Regulatory T Cell Function. *Science* (80-.). *322*, 271–275.

- Wirnsberger, G., Hinterberger, M., and Klein, L. (2011). Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol. Cell Biol.* 89, 45–53.
- Wong, K., Lister, N.L., Barsanti, M., Lim, J.M.C., Hammett, M. V., Khong, D.M., Siatskas, C., Gray, D.H.D., Boyd, R.L., and Chidgey, A.P. (2014). Multilineage potential and self-renewal define an epithelial progenitor cell population in the adult thymus. *Cell Rep.* 8, 1198–1209.
- Wu, L., and Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *17*, 304–312.
- Xystrakis, E., Cavailles, P., Dejean, A.S., Cautain, B., Colacios, C., Lagrange, D., van de Gaar, M.-J., Bernard, I., Gonzalez-Dunia, D., Damoiseaux, J., et al. (2004a). Functional and genetic analysis of two CD8 T cell subsets defined by the level of CD45RC expression in the rat. *J. Immunol.* 173, 3140–3147.
- Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. (2004b). Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104, 3294.
- Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P., and Saoudi, A. (2004c). Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur. J. Immunol.* 34, 408–417.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Illordella, M., Bailey-bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *209*, 1713–1722.
- Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., Koser, S., Pinto, S., Gerdes, N., Lutgens, E., Ishimaru, N., Busslinger, M., et al. (2015a). Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* 42, 1048–1061.
- Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Brors, B., Kyewski, B., Klein, L., Yamano, T., Nedjic, J., Hinterberger, M., Steinert, M., et al. (2015b). Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction Article Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* 42, 1048–1061.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Ogata, K., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Wiest, D.L., Tokunaga, M., and Saito, T. (2006). Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development. *Nat. Immunol.* 7, 67–75.
- Yang, S., Bansal, K., Lopes, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2013). Aire's plant homeodomain(PHD)-2 is critical for induction of immunological tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1833–1838.
- Yang, S., Fujikado, N., Kolodin, D., Benoist, C., and Mathis, D. (2015). Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. *Science* (80-.). 348, 589–594.
- Yasutomo, K., Doyle, C., Miele, L., and Germain, R.N. (2000). The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 404, 506–510.
- Yu, W., Jiang, N., Ebert, P.J.R., Kidd, B.A., Müller, S., Lund, P.J., Juang, J., Adachi, K., Tse, T., Birnbaum, M.E., et al. (2015). Clonal Deletion Prunes but Does Not Eliminate

Self-Specific $\alpha\beta$ CD8⁺ T Lymphocytes. *Immunity* 42, 929–941.

Yu, Y., Zitzner, J.R., Houlihan, J., Herrera, N., Xu, L., Miller, J., Mathew, J.M., Tambur, A.R., and Luo, X. (2011). Common gamma chain cytokines promote rapid in vitro expansion of allo-specific human CD8 + suppressor T cells. *PLoS One* 6, 4–13.

Zhang, S.L., and Bhandoola, A. (2013). Trafficking to the Thymus. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 87–111.

Zhu, M., Chin, R.K., Tumanov, A. V., Liu, X., and Fu, Y.-X. (2007). Lymphotoxin Receptor Is Required for the Migration and Selection of Autoreactive T Cells in Thymic Medulla. *J. Immunol.* 179, 8069–8075.

Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Althage, A., Cooper, S., Klein, P.A., and Klein, J. (1978). On the thymus in the differentiation of “H-2 self-recognition” by T cells: evidence for dual recognition? *J. Exp. Med.* 147, 882–896.

Žumer, K., Plemenitaš, A., Saksela, K., and Peterlin, B.M. (2011). Patient mutation in AIRE disrupts P-TEFb binding and target gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 39, 7908–7919.

Annexes :

Dans cette partie sont présentés les articles pour lequel j'ai participé en collaboration avec les membres de mon équipe. Pour les deux premiers articles présentés j'ai réalisé une partie des expériences qui nous ont été demandé lors du processus de révision. J'ai notamment réalisé les amorces ainsi que les qPCRs pour l'analyse de l'expression des gènes. J'ai par la suite participé aux corrections au niveau de l'écriture de ces articles. Pour l'article dans médecine science ainsi que le chapitre de livre, nous nous sommes répartie la rédaction des différentes parties entre les différents auteurs.

IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance

Séverine Bézie,¹ Elodie Picarda,¹ Jason Ossart,¹ Laurent Tesson,¹ Claire Usal,¹ Karine Renaudin,² Ignacio Anegón,¹ and Carole Guillonnet¹

¹INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology – ITUN, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France.

²Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU, Hôtel-Dieu, Nantes, France.

Cytokines and metabolic pathway-controlling enzymes regulate immune responses and have potential as powerful tools to mediate immune tolerance. Blockade of the interaction between CD40 and CD40L induces long-term cardiac allograft survival in rats through a CD8⁺CD45RC^{lo} Treg potentiation. Here, we have shown that the cytokine IL-34, the immunoregulatory properties of which have not been previously studied in transplantation or T cell biology, is expressed by rodent CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs and human FOXP3⁺CD45RC^{lo}CD8⁺ and CD4⁺ Tregs. IL-34 was involved in the suppressive function of both CD8⁺ and CD4⁺ Tregs and markedly inhibited alloreactive immune responses. Additionally, in a rat cardiac allograft model, IL-34 potently induced transplant tolerance that was associated with a total inhibition of alloantibody production. Treatment of rats with IL-34 promoted allograft survival that was mediated by induction of CD8⁺ and CD4⁺ Tregs. Moreover, these Tregs were capable of serial tolerance induction through modulation of macrophages that migrate early to the graft. Finally, we demonstrated that human macrophages cultured in the presence of IL-34 greatly expanded CD8⁺ and CD4⁺ FOXP3⁺ Tregs, with a superior suppressive potential of antidonor immune responses compared with non-IL-34-expanded Tregs. In conclusion, we reveal that IL-34 serves as a suppressive Treg-specific cytokine and as a tolerogenic cytokine that efficiently inhibits alloreactive immune responses and mediates transplant tolerance.

Introduction

Organ transplantation has undergone substantial improvements in both the prevention and treatment of acute rejection, but sub-clinical episodes and chronic graft dysfunction still heavily impact medium- and long-term graft survival (1). Emerging therapeutic strategies, among them induction of tolerance to donor antigens, are moving to the clinical stage after years of experimental model work (2, 3). Among natural mechanisms and tolerance-inductive strategies, the use of different types of regulatory cells are among the most promising ones (4). The uses of CD8⁺ Tregs have been highlighted in recent years by our group and others in the transplantation field, but also in other pathological situations (5–8). Cytokines, enzymes controlling metabolic pathways, and cell surface molecules capable of inducing tolerance have also been described as new mediators of immune tolerance.

IL-34 was identified in 2008 (9). Studies showed that IL-34 shares homology with M-CSF and that they act through a common receptor, CD115, also called CSF-1R (9), expressed on the cell surface of monocytes, and in the brain through a newly described receptor, receptor-type protein-tyrosine phosphatase ζ (PTP-ζ)

(10). However, studies have demonstrated that IL-34 and M-CSF display distinct biological activity and signal activation (11), in part due to their differing spatial and temporal expression (12). Up to now, IL-34 function has been mainly linked with the survival and function of monocytes and macrophages (osteoclasts, microglia), as well as with DCs (12). IL-34 protein expression in resting cells has been observed in keratinocytes, hair follicles, neurons, proximal renal tubule cells, and seminiferous tubule germ cells (12) and also in heart, brain, lung, liver, kidney, spleen, thymus, testicles, ovaries, prostate, colon, small intestine, spleen red pulp, and osteoclasts (9). Upon inflammation, other cells, such as fibroblasts and articular synovial cells, upregulate IL-34 expression (13, 14). So far, expression of IL-34 by other lymphoid cells, and particularly by T cells, has not been described or demonstrated. Similarly, IL-34 has not been linked to the effects of DCs or T cells on immune function (12). Finally, there is no description to date of a role for IL-34 in transplant tolerance.

CD45RC has been shown in rats, mice, and humans to be a marker of both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs (15–20). In a rat cardiac allograft model, we have previously shown that blockade of CD40-CD40L interaction by CD40Ig treatment induces long-term allograft survival through the generation of CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs (termed CD8⁺CD40Ig Tregs). This is in contrast to natural CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs, which do not inhibit cardiac allograft rejection (18). We have shown that these CD8⁺CD40Ig Tregs impose allogeneic tolerance partially through production of IFN-γ and fibrinogen-like protein 2 (FGL2) (18, 21, 22) and recognition of a dominant MHC II-derived donor peptide presented by recipient MHC I (23). A potential role for FGL2 as an immune tolerogenic

► Related Commentary: p. 3751

Authorship note: Ignacio Anegón and Carole Guillonnet are co-senior authors.

Conflict of interest: Carole Guillonnet, Ignacio Anegón, and Séverine Bézie have filed 3 patents that are pending and are entitled to a share in the net income generated from licensing of these patent rights for commercial development.

Submitted: January 29, 2015; **Accepted:** July 16, 2015.

Reference information: *J Clin Invest.* 2015;125(10):3952–3964. doi:10.1172/JCI81227.

mechanism was first suspected when pan-genomic transcriptomic comparison of CD8⁺CD40Ig Tregs versus CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs from naive animals showed increased *Fgl2* mRNA expression (ArrayExpress database accession number E-MTAB-3535) (21). Results from the same transcriptomic analysis revealed that the cytokine IL-34 is overexpressed in CD8⁺CD40Ig Tregs from long-term recipients compared with that seen in CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs from naive animals.

In this study, we investigate the expression and functional role of IL-34 produced by CD45RC^{lo} Tregs in rats and humans, evaluate the immunoregulatory potential of IL-34 ex vivo in humans and in vivo in an organ transplant model in rats, and elucidate the mechanisms involved. We provide here the first demonstration to our knowledge that IL-34 has immunosuppressive properties. We found that IL-34 was expressed in tolerated cardiac allografts and by CD8⁺CD40Ig Tregs. We also show the involvement of IL-34 in CD8⁺ Treg-suppressive function ex vivo and demonstrate that IL-34 has a significant suppressive function in allogeneic immune responses both ex vivo and in vivo and induces transplant tolerance. We believe we have unraveled the mechanism of this tolerance induction and demonstrate that IL-34-modified macrophages that migrate early to the graft induce highly suppressive and dominant Tregs. Significantly, we demonstrate the specific expression of IL-34 by natural human CD45RC^{lo}FOXP3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs, not effector T cells, as well as the potential of IL-34 to suppress alloreactive responses and its involvement in CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} and CD8⁺CD45RC^{lo} Treg-mediated suppression, providing the first evidence to our knowledge of a role for IL-34 in immune tolerance in humans. Finally, we provide proof of concept that human IL-34-differentiated macrophages expand and potentiate human FOXP3⁺ Tregs. Altogether, we have identified IL-34 as a tolerogenic cytokine that efficiently inhibits antidonor immune responses, thus providing a new mediator of transplant tolerance.

Results

IL-34 expressed by splenic CD8⁺CD40Ig Tregs and tolerated allograft. RNA microarray analysis of CD8⁺CD40Ig Tregs versus naive CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs from spleen showed that *Il34* is among the most upregulated genes by CD8⁺CD40Ig Tregs, with a 4.05-fold change. This upregulation was confirmed by qPCR, with a greater than 11-fold increase in expression of *Il34* mRNA in splenic CD8⁺CD40Ig Tregs from long-term surviving recipients compared with that in natural CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs ($P < 0.05$, Figure 1A).

Analysis of mRNA from whole organs showed that *Il34* mRNA was expressed constitutively in spleen and heart of naive animals, as observed by Lin et al. (ref. 24, Figure 1B, and Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI81227DS1) and was significantly decreased during acute allograft rejection on day 5 in the grafts of nontreated recipients (NT D5, Figure 1B). In correlation with our previous observations that CD8⁺CD40Ig Tregs accumulate in the graft during the first week (21), *Il34* mRNA expression levels were significantly greater on day 5 in AdCD40Ig-treated grafts compared with levels in naive and nontreated recipients (Figure 1B) and had returned to normal by day 120 after transplantation.

Altogether, these results demonstrate that IL-34 is expressed by CD8⁺CD40Ig Tregs. Moreover, the early expression of IL-34 in graft

and spleen suggests its early involvement in the inhibition of acute graft rejection and the possible establishment of allograft tolerance.

IL-34 expressed by CD8⁺CD40Ig Tregs, but not M-CSF, is involved in suppression of alloreactive CD4⁺ T cell proliferation. We have previously demonstrated that CD8⁺CD40Ig Tregs suppress the antidonor proliferation of CD4⁺ effector T cells in response to allogeneic plasmacytoid DCs (pDCs) ex vivo (21). In addition, we have demonstrated the involvement of IFN- γ and FGL2 in this process; however, some suppression remains after blockade of the IFN- γ and FGL2 inhibitory effect (18, 21, 22). To address whether IL-34 is involved in CD8⁺CD40Ig Treg suppression, we tested a neutralizing anti-IL-34 Ab in the suppressive mixed lymphocyte reaction (MLR) assay (Figure 1C and Supplemental Figure 2A). The addition of increasing concentrations of neutralizing anti-IL-34 Ab resulted in a dose-dependent increase in CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation, reversing the CD8⁺CD40Ig Treg-mediated inhibition by up to 59% compared with isotype control Abs used at the highest concentration. Given that IL-34 has homologies with M-CSF, that we observed a significant expression of M-CSF by CD8⁺CD40Ig Tregs compared with natural CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs (Supplemental Figure 3A), and that IL-34 and M-CSF use the same receptor in the macrophage lineage cells and DCs (24, 25), we investigated the possibility that M-CSF could play a role in the suppression of effector CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation. First, we tested the suppressive potential of M-CSF in the MLR assay described above. Interestingly, we observed that M-CSF efficiently suppressed, in a dose-dependent manner, up to 93.5% of CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation (Supplemental Figure 3B), suggesting that M-CSF-mediated suppression, like that for IL-34, acts through pDCs expressing the CD115 receptor (26, 27). However, the addition of a blocking anti-M-CSF Ab or of an isotype control Ab in coculture suppressive assays in the presence of CD8⁺ Tregs did not restore CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation, demonstrating that M-CSF is not involved in CD8⁺CD40Ig Treg-mediated suppression (Figure 1D).

We next tested the involvement of CD115, until now the only receptor for IL-34 described outside the CNS (24, 25), which is only expressed by monocytes and macrophages, conventional DCs (cDCs), and pDCs, and not by CD4⁺ T cells (26, 27). We used an anti-CD115-blocking Ab that has been previously shown to inhibit M-CSF action in both rats and mice (28). We demonstrated that blocking CD115 significantly, although not completely, abrogated, in a dose-dependent manner, CD8⁺ Treg-mediated suppression of CD4⁺ T cell proliferation in the presence of pDCs, in contrast to isotype control Ab (Figure 1E).

In conclusion, we have demonstrated the involvement of IL-34-CD115 interaction, but not M-CSF-CD115 interaction, in the suppressive effect of CD8⁺CD40Ig Tregs on effector CD4⁺ T cell proliferation.

IL-34 is expressed by human FOXP3⁺ T cells and possesses a strong suppressive potential. Since IL-34 has never been demonstrated to be expressed by Tregs, to inhibit antidonor immune responses in humans, or to be involved in Treg-mediated suppression, we sought to assess the potential and applicability of our findings in humans. It has been suggested that human CD45RC^{lo} T cells are associated with Tregs, while CD45RC^{hi} T cells are associated with naive and effector T cells (20, 29). We first analyzed IL-34 protein expression on CD8⁺ and CD4⁺ CD45RC^{lo} cells versus CD45RC^{hi}

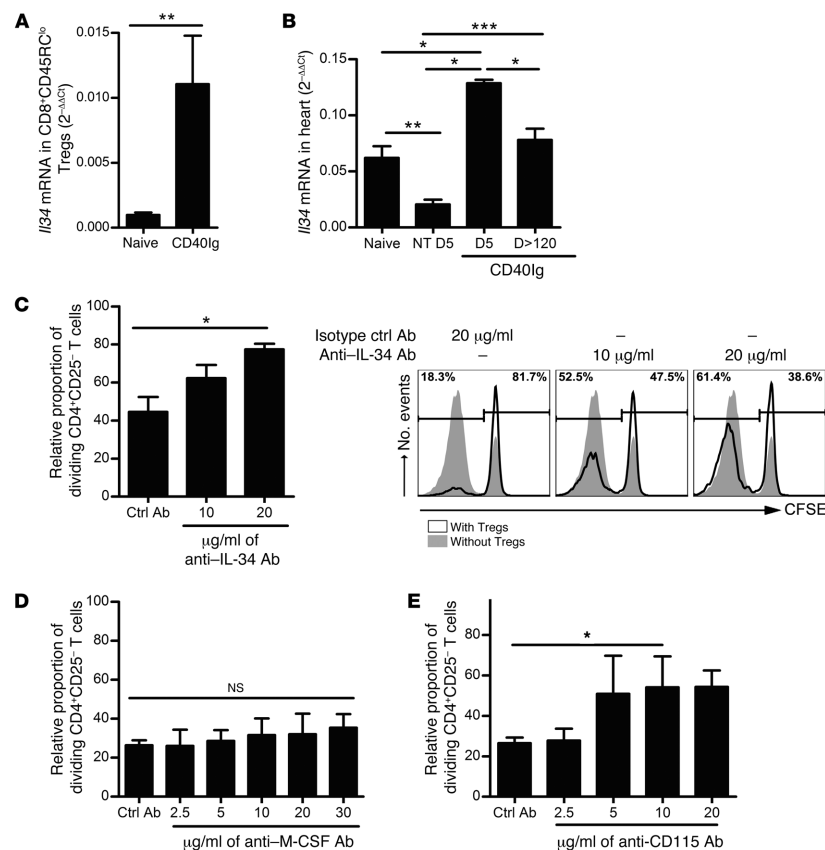


Figure 1. IL-34 and CD115, but not M-CSF, are involved in CD8⁺CD45RC^{lo} Treg-mediated suppression. (A) FACSARIA-sorted CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs from spleen of naive or 120-day-old AdCD40lg-treated recipients ($n = 6$) were analyzed for *Il34* mRNA expression by qPCR. Mann-Whitney U test, $^{**}P < 0.01$. (B) *Il34* mRNA expression levels in cardiac grafts from AdCD40lg-treated recipients on days 5 ($n = 3$) and 120 ($n = 7$) after transplantation were compared with those in grafts from nontreated (NT) recipients on days 5 ($n = 8$), 7 ($n = 8$) and 120 ($n = 6$) and with levels in native hearts from naive animals ($n = 7$). Mann-Whitney U test, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. (C–E) The relative proportion of CFSE-labeled LEW1A dividing CD4⁺CD25⁻ T cells stimulated with donor LEW1W pDCs was analyzed after 6 days of culture in the presence of LEW1A CD8⁺CD40lg Tregs at a 1:1 effector/suppressor ratio. Proliferation after the addition of anti-IL-34-blocking Ab (C), anti-M-CSF-blocking Ab (D), or anti-CD115-blocking Ab (E) was evaluated and compared with that of the appropriate isotypic control ($n = 4$ experiments performed in triplicate). The proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells in the control proliferation condition with pDCs only representing approximately 80% of the cells on day 5 was given a value of 100 in each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells. A representative raw CFSE profile is shown in C (right panel). Kruskal-Wallis and Dunn's post tests, $^{*}P < 0.05$ (C–E).

T cells by multicolor flow cytometry (Figure 2A). Interestingly, we observed that both human CD4⁺CD45RC^{lo} and CD8⁺CD45RC^{lo} T cells expressed significant amounts of IL-34 protein in contrast to CD45RC^{hi} T cells. Moreover, we observed that CD8⁺CD45RC^{lo} T cells expressed significantly more IL-34 than did CD4⁺CD45RC^{lo} T cells. To further discriminate IL-34 expression by Tregs inside the CD45RC^{lo} cells, we analyzed IL-34 expression within FOXP3⁺ Tregs (Figure 2, B and C and Supplemental Figure 4). We observed that IL-34 expression was specific to CD4⁺CD45RC^{lo}FOXP3⁺ and CD8⁺CD45RC^{lo}FOXP3⁺ Tregs, but not in CD4⁺CD45RC^{lo}FOXP3⁻,

CD8⁺CD45RC^{lo}FOXP3⁻, CD4⁺CD45RC^{hi}, or CD8⁺CD45RC^{hi} T cell subsets (Figure 2B), indicating that IL-34 is a Treg-specific cytokine. More precisely, we observed that approximately half of the FOXP3⁺ Tregs (CD4⁺ or CD8⁺) expressed IL-34 (Figure 2C).

Since we suspected a suppressive potential of IL-34 in humans, we added different doses of soluble human IL-34 to an MLR, whereby CD4⁺CD25⁻ CFSE-labeled effector T cells were cultured in the presence of T cell-depleted allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as antigen-presenting cells (APCs) (Figure 2D and Supplemental Figure 2B). We observed

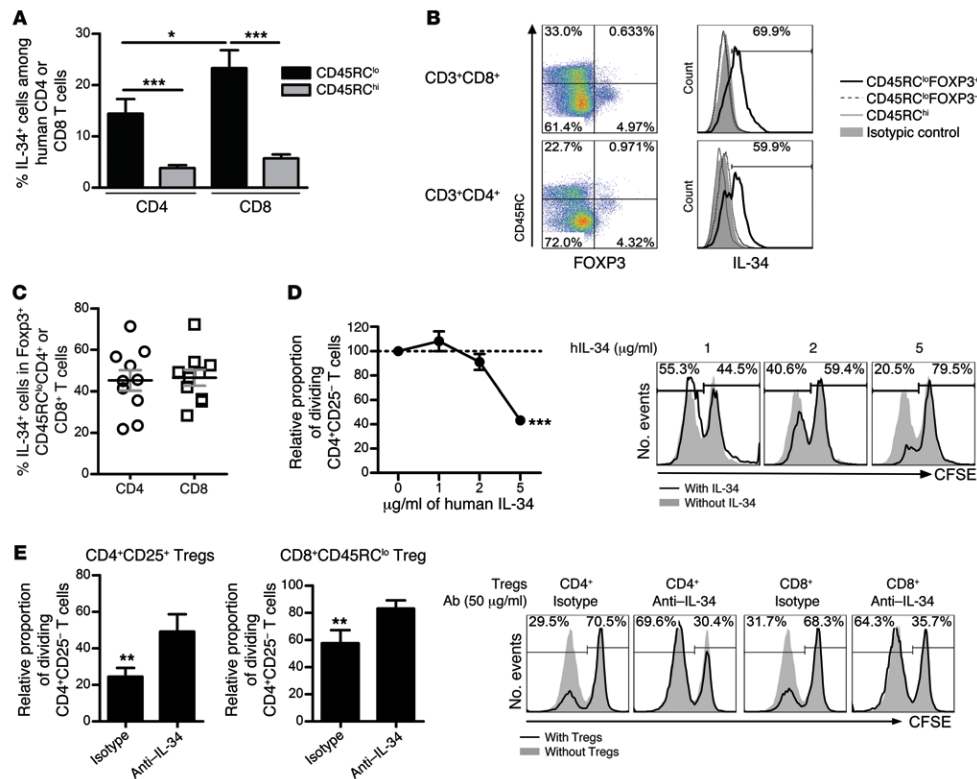


Figure 2. IL-34 is a human FOXP3⁺ Treg-specific cytokine involved in the suppressive activity of antidonor immune responses. The percentage of IL-34⁺ cells in healthy individuals was evaluated in CD4⁺ or CD8⁺ CD45RC^{lo} or CD45RCⁿⁱ T cells (A) or in FOXP3⁺ versus FOXP3⁻ CD45RC^{lo} CD8⁺ or CD4⁺ T cells (B and C). (A) The mean $\pm$ SEM of 27 healthy individuals is represented. Mann-Whitney *U* test, **P* < 0.05, ****P* < 0.001. Representative histogram and plot of healthy individuals (B) showing the mean of expression $\pm$ SEM of 10 healthy individuals (C). (D) Soluble IL-34 was tested for suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic T cell-depleted PBMCs and analyzed by flow cytometry for CFSE dilution after 5 days of culture (*n* = 2–5 experiments performed in duplicate). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells. Representative histogram of 1 experiment: Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cells cocultured with T cell-depleted PBMCs with increased concentrations of IL-34. Two-way ANOVA with Bonferroni's post test versus M-CSF, ****P* < 0.001. (E) The relative proportion of CFSE-labeled dividing CD4⁺CD25⁻ T cells stimulated with allogeneic T cell-depleted PBMCs was analyzed after 5 days of culture, in the presence of CD8⁺CD45RC^{lo} or CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Tregs at 1:1 effector/suppressor ratios. The proliferation after addition of anti-IL-34–blocking Ab was evaluated and compared with isotypic control (*n* = 5–6 experiments performed in triplicate). The proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells in the control proliferation condition with allogeneic T cell-depleted PBMCs only represented approximately 60% of the cells on day 5 and was given a value of 100 in each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells. A representative raw CFSE profile is shown in the right panel. Wilcoxon test (versus proliferation without Tregs = 100), ***P* < 0.01.

significant, dose-dependent inhibition of effector T cell proliferation in the presence of IL-34, thus confirming the suppressive potential of IL-34 on antidonor immune responses. Finally, to demonstrate the involvement of IL-34 in CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} and CD8⁺CD45RC^{lo} Treg-mediated suppressive activity of antidonor immune responses, we added either anti-human IL-34–blocking Ab or a control isotype Ab to an MLR, in which CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ effector T cell proliferation in the presence of allogeneic T cell-depleted PBMCs was inhibited by Tregs (Figure 2E). We observed that blocking IL-34 significantly reverted Treg-

mediated suppression for both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs compared with isotypic control Ab, demonstrating the key role of IL-34 in the suppressive activity of Tregs.

Altogether, these data prove the relevance of our findings and provide proof of concept that IL-34 is a Treg-specific protein and a potential therapeutic target for manipulating the antidonor immune response.

Generation of an adeno-associated viral vector for sustained expression of IL-34. We sought to demonstrate the in vivo suppressive activity of IL-34 and further understand IL-34 mechanisms.

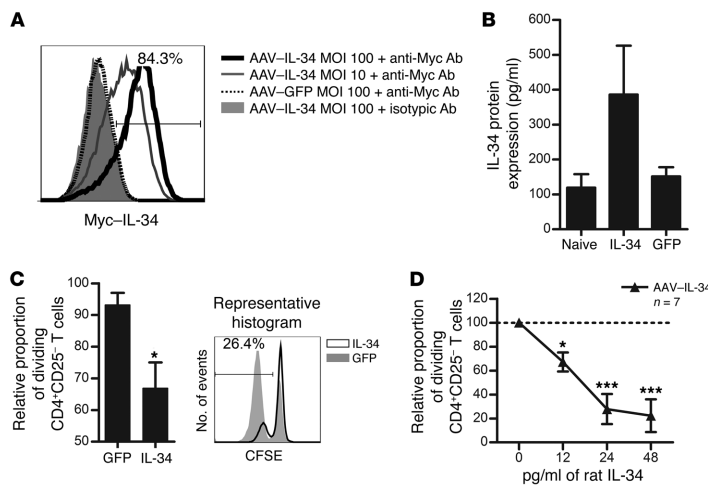


Figure 3. AAV-mediated expression of rat IL-34 inhibits antitumor cellular responses. (A) Cells were transduced with AAV-IL-34 or control AAV-GFP at the indicated MOI and analyzed for IL-34 expression 24 hours later (solid thick black line: AAV-IL-34 MOI 10² labeled with anti-Myc; solid thin gray line: AAV-IL-34 MOI 10; dotted black line: AAV-GFP MOI 10² labeled with anti-Myc Ab; and filled gray area: AAV-IL-34 MOI 10² with isotypic control Ab; 1 representative experiment of 4). (B) IL-34 protein was quantified by ELISA in AAV-IL-34 versus AAV-GFP-treated rats 15 days after infection. Serum of nontreated naive animals was used as a control for IL-34 endogenous expression ($n = 3$). (C) Supernatants of AAV-IL-34 or AAV-GFP-transduced cells were tested for suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs and analyzed for CFSE dilution after 5 days. CD8⁺ Tregs were used as a positive control for suppression ($n = 3$ experiments performed in duplicate). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the normalized percentage of proliferation versus proliferation in the absence of CD8⁺ Tregs (100%). Representative histogram is shown. Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni's post test versus AAV-GFP-transduced cell supernatant dilution, * $P < 0.05$. (D) Serial dilution of sera from AAV-IL-34 or AAV-GFP-treated (not shown) rats or naive animals (dotted line) were tested for suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic pDCs and analyzed for CFSE dilution after 5 days. The proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells with pDCs only represented 80% of the cells on day 5 and was given a value of 100 in each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells. CD8⁺ Tregs were used as positive control of suppression ($n = 3$ experiments performed in duplicate). Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni's post test versus serum from naive rats, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Since recombinant IL-34 rat cytokine is not commercially available and difficult to produce for in vivo experiments, we generated a recombinant adeno-associated viral (AAV) vector encoding rat IL-34, as we have done for other molecules in primates (30) and rats (22, 31). In this vector, the rat *Il34* cDNA was fused with a C-terminal Myc tag, and both the plasmid (pIL-34) and AAV were used to respectively transfect or transduce cells of the HEK293 T cell line (Figure 3A and Supplemental Figure 5). IL-34 expression was analyzed by flow cytometry for the Myc tag. Myc staining was not detectable on pGFP-transfected or AAV-GFP-transduced HEK293 T cells, nor on pIL-34-transfected or AAV-IL-34-transduced HEK293 T cells stained with isotypic control Ab (Figure 3A and Supplemental Figure 5). However, HEK293 T cells transfected with pIL-34 or transduced with AAV-IL-34 displayed strong, dose-dependent expression levels of IL-34 (Figure 3A and Supplemental Figure 5), demonstrating the functionality of the vector.

We next assessed IL-34 production in vivo by ELISA. First, rats were injected i.v. with 1×10^{12} vg/rat of AAV, and sera were collected

on day 15 after injection. We observed an increase in IL-34 protein in the sera of AAV-IL-34-treated rats compared with that in AAV-GFP-treated rats on day 15 (Figure 3B), demonstrating the efficient expression of IL-34 in vivo, in accordance with the expression of genes vectorized by AAVs that we have previously analyzed (30).

We then tested the suppressive potential of AAV-IL-34-transduced HEK293 T cell culture supernatants (Figure 3C) and sera from AAV-IL-34-treated rats (Figure 3D), both of which contain high amounts of IL-34 protein (Figure 3B and data not shown). We observed that both supernatants from AAV-IL-34-transduced cells and sera from AAV-IL-34-treated rats significantly inhibited, in a dose-dependent manner, the proliferative response of CD4⁺ effector T cells stimulated by allogeneic pDCs, whereas supernatants from AAV-GFP-transduced cells and sera from AAV-GFP-treated rats did not (Figure 3, C and D and data not shown).

Altogether, these results demonstrate the functionality of the vector and the suppressive ex vivo efficacy of IL-34 in inhibiting rat effector T cell proliferation, as we have shown in humans (Figure 2D).

Therapeutic effect of IL-34 on allograft tolerance induction. To further determine the suppressive potential of IL-34 in vivo as a therapeutic strategy, we treated recipients with either AAV-IL-34 (1×10^{12} vg/rat) or a control noncoding AAV, delivered i.v. 1 month before transplantation

to obtain optimal transgene expression through the kinetics of AAV vector expression (22, 31). Such treatment with IL-34 alone resulted in a significant prolongation of allograft survival (mean survival time 32.6 ± 7.8 days) compared with controls injected with noncoding AAV (10.4 ± 1.4 days) or untreated recipients (7.8 ± 0.6 days) (Figure 4A). To improve allograft survival, recipients were then treated with a suboptimal dose of rapamycin (0.4 mg/kg/day for 10 days) in addition to the AAV vector. Ten days of rapamycin treatment alone did not significantly extend allograft survival (Figure 4A). In contrast, we observed an indefinite allograft survival in 64% of the recipients given the combined therapy of AAV-IL-34 and rapamycin ($n = 13$, Figure 4A). Analysis of grafts from long-surviving recipients for signs of chronic rejection revealed a complete absence of vascular lesions, i.e., normal vessel structure and absence of leukocyte infiltration into the myocardium in all recipients analyzed (Figure 4B). In addition, analysis of the antitumor Ab presence in the sera from long-surviving recipients revealed a

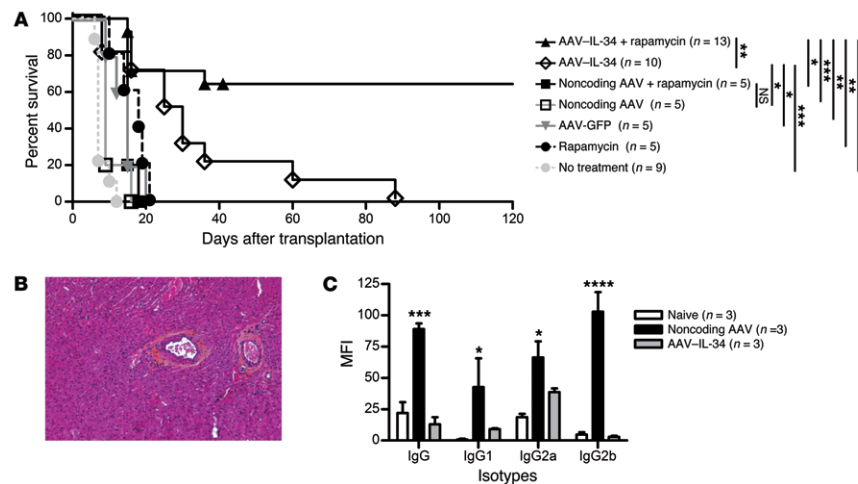


Figure 4. IL34 gene transfer prolongs allograft survival alone and in combination with a suboptimal dose of rapamycin. (A) Recipients given i.v. 10^{12} vg/rat AAV-IL-34 or noncoding AAV or no treatment were grafted 30 days later with no additional treatment or in combination with a suboptimal dose of rapamycin (10 days, starting on day 0). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Log-rank test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (B) Representative image of the anatomopathological analysis of graft from AAV-IL-34 plus rapamycin-treated, day-120 long-term surviving recipients. Original magnification, $\times 100$. (C) IgG alloantibody production was evaluated in naive and treated long-term recipients more than 120 days after transplantation. Graph represents MFI $\pm$ SEM. Two-way ANOVA with Bonferroni's post test, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ for noncoding AAV-IL-34 versus noncoding AAV.

complete inhibition of total IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b antidiator Ab production in contrast to the sera from recipients treated with the noncoding AAV (Figure 4C).

Altogether, we were able to demonstrate that treatment with IL-34, in combination with a suboptimal dose of rapamycin, is a valuable therapeutic strategy for tolerance induction and results in abrogation of all allogeneic immune responses.

Induction of Tregs capable of infectious tolerance following IL-34 treatment. As demonstrated above, IL-34 is produced specifically by CD8⁺CD40Ig Tregs, but we also wanted to assess whether regulatory cells were induced in the context of IL-34 treatment and involved in the long-term allograft survival generated by the AAV-IL-34 and rapamycin combination. To do so, we performed adoptive cell-transfer experiments, putting splenocytes of long-surviving recipients into naive grafted, sublethally irradiated recipients, as we have done previously (18). First, adoptive transfer of 1.5×10^6 splenocytes into secondary naive grafted, irradiated recipients resulted in significant prolongation of allograft survival in 60% of the recipients (Figure 5A), demonstrating that IL-34 efficiently induces regulatory cells. We investigated the anatomopathological status of the graft of first adoptively transferred long-term splenocyte recipients and observed a complete absence of vascular lesions and obstructions (i.e., no signs of chronic rejection) (data not shown). We then determined that this prolongation of allograft survival can be serially transferred at least 3 times into naive grafted, irradiated recipients (Figure 5A, second and third transfers).

We investigated the regulatory cell population allowing serial adoptive tolerance transfer, including that of macrophages (32). To do so, we purified subpopulations of the different main cell

subsets (B cells, T cells, and macrophages) from tolerant recipients treated with IL-34 (Supplemental Figure 2C) and performed adoptive cell transfer into naive grafted, irradiated recipients (Figure 5B). Surprisingly, we observed that tolerance transfer was achieved only with T cell transfer, demonstrating for the first time to our knowledge that Tregs are induced following IL-34 treatment. Although macrophages did not transfer tolerance, IL-34 may induce Tregs through macrophages (see below). To further determine which Treg population (i.e. CD4⁺CD25^{hi} or CD8⁺CD45RC^{lo} T cells) could confer tolerance to newly grafted recipients, we sorted CD4⁺CD25^{hi} and CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs and performed adoptive cell transfer (Figure 5B). We observed that adoptive transfers of both CD4⁺CD25^{hi} and CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs resulted in long-term allograft survival in 50% of recipients, suggesting that both populations of Tregs had been equally potentiated by the IL-34-modified macrophages.

Altogether, these *in vivo* results demonstrate that efficient Tregs are generated following IL-34 treatment in the context of reduced inflammation and transplantation and that those Tregs can induce serial tolerance in a dominant fashion.

Treg induction is mediated by IL-34-modified macrophages infiltrating the graft. We further characterized the effect of IL-34 on macrophages in the context of induction of tolerance to an allograft. We first sorted macrophages from spleen, blood, and graft of AAV-IL-34-treated recipients on day 15 following transplantation (i.e., day 45 after AAV injection) and macrophages from naive rats and analyzed by qPCR a number of genes described in the literature (refs. 33, 34, and Figure 6). Interestingly, we observed that, compared with naive macrophages, macrophages in the graft from

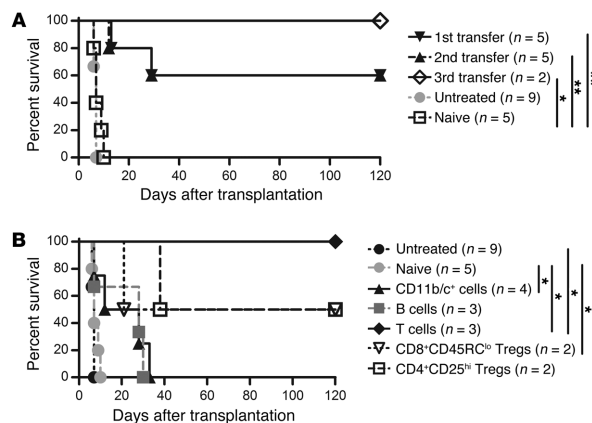


Figure 5. Serial tolerance mediated by Tregs following IL-34 induction. (A) LEW.1A recipients were sublethally irradiated (4.5 Gy) on day -1 and received heart allografts and i.v. injections of 1.5×10^6 splenocytes from long-surviving recipient or naive animals on day 0. Graft survival was monitored by abdominal palpation. (B) LEW.1A recipients were sublethally irradiated (4.5 Gy) on day -1 and received heart allografts and i.v. injections of total splenocytes or purified cell subpopulations (T cells: 4×10^6 ; B cells: 6×10^6 ; CD11b/c⁺ cells: 1.5×10^6 ; CD8⁺CD45RC⁺ Tregs: 4×10^6 ; CD4⁺CD25^{hi} Tregs: 4×10^6) from long-surviving recipients on day 0. Graft survival was monitored by abdominal palpation. Log-rank test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

AAV-IL-34-treated recipients strongly upregulated arginase 1 and inducible NO synthase (*Inos*), both of which are implicated in the metabolism of essential amino acids and described as common mechanisms of immunoregulation of suppressive macrophages by limiting the proliferation of T lymphocytes (35, 36). We also observed increased expression of *Cd14* and decreased expression of *Cd23*, *Cd86*, and *Il10*, mostly in the graft but also in the spleen and the blood of AAV-IL-34-treated macrophages, compared with naive macrophages. Finally, we observed no significant differences in *Cd16*, *Cd32*, *Il1*, *Tgfb*, or *Tnfa* expression. It is also interesting to note that there were significant differences between macrophages located in the blood versus those in the graft (*Arg1*, $P = 0.0243$; *Cd14*, $P = 0.0357$; *Cd23*, $P = 0.0303$; *Il10*, $P = 0.0470$), suggesting that IL-34-modified regulatory macrophages migrate and locate in the graft quickly after transplantation.

To prove that IL-34-modified macrophages play a role in tolerance induction, macrophages were depleted using clodronate-loaded liposomes, from day -25 before transplantation to day 3 after transplantation, and treated simultaneously with IL-34 or noncoding AAV plus a suboptimal dose of rapamycin over a period of 10 days. As a result, AAV-IL-34 injected 30 days before transplantation could not act through macrophages that were depleted at that same time. Significantly, by the time the liposome depletion started, most of the AAV serotype 8 had been integrated into the hepatocytes. We observed that recipients treated with clodronate-loaded liposomes rejected their graft more quickly after transplantation than did the control group animals, demonstrating that macrophages are essential in tolerance induction by IL-34 (Figure 7).

IL-34-differentiated macrophages efficiently induce and potentiate human CD4⁺ and CD8⁺ FOXP3⁺ Tregs. Given that we have demonstrated a modified macrophage phenotype following IL-34 administration to rats and induction of potentiated Tregs able to adoptively transfer tolerance to grafted recipients, we wondered whether these results could be reproduced ex vivo in humans. To investigate this, CD14⁺ monocytes from healthy volunteers were cell sorted and differentiated in the presence of IL-34 for 6 days, and the phenotype was analyzed (Supplemental Figure 6). We

observed that IL-34-differentiated macrophages expressed higher levels of CD163, CD14, HLA-DR, CD86, and CD80 than did fresh monocytes. The differentiated macrophages were then added to allogeneic PBMCs for 15 days, then the proportion, number, and suppressive capacity of Tregs were analyzed (Figure 8). Interestingly, we observed that, following culture with IL-34-differentiated macrophages, FOXP3⁺CD45RC^{lo}CD4⁺ and FOXP3⁺CD45RC^{lo}CD8⁺ T cells increased as a percentage of CD4⁺ or CD8⁺ T cells by 5- and 8.2-fold, respectively (Figure 8, A and B). This increase in percentage was also accompanied by an increase in the number of FOXP3⁺CD45RC^{lo}CD4⁺ and FOXP3⁺CD45RC^{lo}CD8⁺ T cells of 83.4- and 100.6-fold, respectively (Figure 8C). Most important, we observed that the IL-34-expanded CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Tregs and CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs displayed a highly potent suppressive capacity up to a 16:1 effector/suppressor ratio, where we observed approximately 50% of the suppression compared with unstimulated and polyclonally stimulated CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} Tregs and CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs (Figure 8D and Supplemental Figure 2D).

Altogether, these results demonstrate that IL-34-differentiated monocytes have the capacity to selectively expand and to not only maintain, but potentiate, the suppressive capacity of FOXP3⁺ Tregs.

Discussion

The biological importance of IL-34 remains, to date, largely unknown and debatable. The current understanding of the role of IL-34 was mostly driven by the study of pathological situations in which IL-34 was found to exert inflammatory effects, as M-CSF does. Studies have shown that M-CSF administration increases inflammation in a model of collagen-induced rheumatoid arthritis (37) and that IL-34 correlates with the severity of synovitis (13) and can be induced by TNF- α , as M-CSF can (38). Furthermore, both IL-34 and M-CSF induce proinflammatory cytokines such as IL-6, IP-10/CXCL10, IL-8/CXCL8, and MCP1/CCL2 (39). In contrast, it has also been shown that M-CSF and, more recently, IL-34, alone or in combination with other cytokines, can induce regulatory macrophages (32, 40–43). In transplantation, it has been demonstrated that pretreatment of mice with M-CSF expands macrophages and inhibits graft-versus-host disease (GVHD) (44).

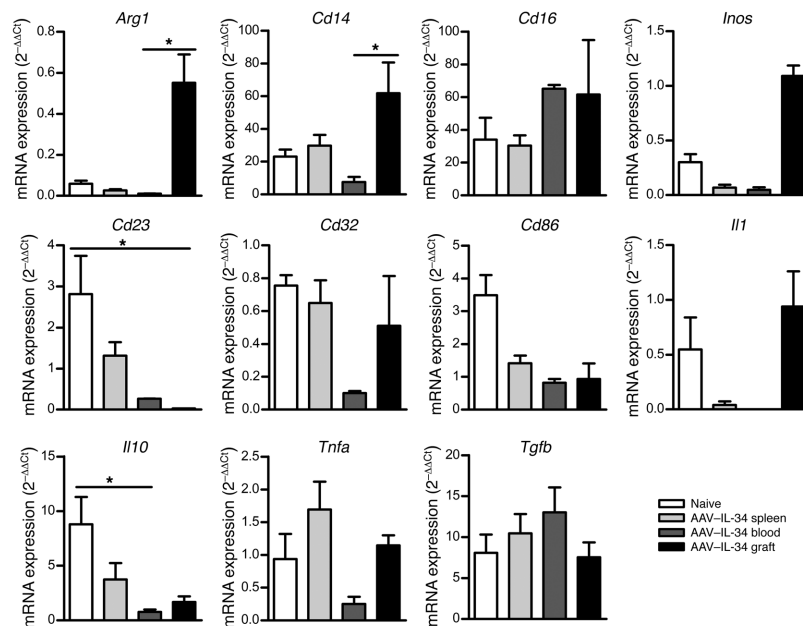


Figure 6. Transcript accumulation in macrophages following IL-34 treatment. mRNA expression was assessed by qPCR on sorted macrophages from untreated spleen or AAV-IL-34-treated spleen, blood, and graft of recipients on day 15 after transplantation. Results are normalized to *Hprt* and expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t} \pm$ SEM. Kruskal-Wallis and Dunn's post tests, * $P < 0.05$.

In addition, a combination of M-CSF and IFN- γ differentiates monocytes into regulatory macrophages capable of prolonging heart allograft survival in an iNOS-dependent manner (36). These studies highlight the paradoxical role of both M-CSF and IL-34. In our study, in an attempt to unravel the complex mechanisms of tolerance induction in transplantation, we provide evidence, for the first time to our knowledge, of the unexpected properties of IL-34 as a master regulator of immune responses and tolerance. We also provide what we believe to be the first proof that IL-34 can be expressed by rat CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs and human FOXP3⁺ Tregs and, most important, that potent Tregs are induced by IL-34 treatment. This induction of Tregs is due to the generation of regulatory macrophages and is associated in vivo with a reduction of both inflammation and antigen presentation.

We have previously demonstrated that treatment of cardiac graft recipients with an adenovirus encoding CD40Ig leads to indefinite allograft survival in 93% of recipients and that this acceptance is mediated by CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs in an IFN- γ , IDO-, and FGL2-dependent manner. We more recently demonstrated that CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs recombined a biased restricted V β 11 repertoire to recognize a dominant MCH class II-derived peptide and that this peptide induces Tregs and induces tolerance (23). In the present study, we show that IL-34 is expressed at high levels by tolerated grafts from AdCD40Ig-treated recipients, and importantly, also by splenic CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs from the same recipients. Furthermore, CD8⁺CD45RC^{lo} Treg-mediated suppres-

sion can be partially abrogated by blockade of IL-34. Thus, IL-34 possesses immunosuppressive properties that have never, to our knowledge, been studied and acts in complement with FGL2, IDO, and IFN- γ in the CD40Ig model of suppression mediated by CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs (21, 22).

While we observed that M-CSF was also significantly upregulated by CD8⁺CD40Ig Tregs and that M-CSF significantly inhibited antidonor immune responses ex vivo ($P = 0.0159$ and $P < 0.05$, respectively), there was no involvement of M-CSF in this model, demonstrating that this property is specific to IL-34. This might be due to a lesser amount of M-CSF being secreted compared with IL-34 and to a lower suppressive capacity of M-CSF (250 ng/ml of rat M-CSF required for 75% suppression versus 24 pg/ml of rat IL-34). Accumulating evidence suggest that IL-34 and M-CSF exhibit specific and nonredundant properties. This is supported by structural analysis comparisons showing that IL-34 and M-CSF bind differently to CD115 (11, 25). The recent identification of a second distinct receptor for IL-34 reinforces this interpretation (10). Very recently, IL-34-deficient mice have been generated that exhibit an absence of certain cell subsets such as Langerhans cells and microglia (12), effects that have not been observed in M-CSF-KO mice. This demonstrates not only a different temporal and spatial expression role, but also different functional effects with IL-34 compared with M-CSF.

In order to emphasize the significance of our findings, we analyzed IL-34 expression by human FOXP3⁺CD45RC^{lo} CD4⁺

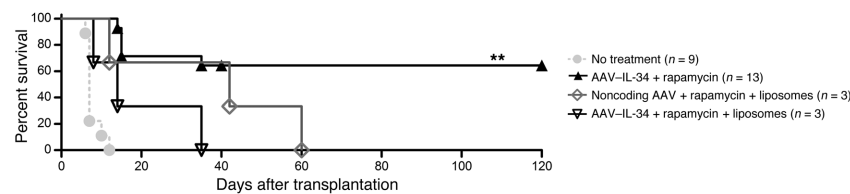


Figure 7. Macrophage depletion results in allograft rejection following IL-34 treatment. On day -30, allograft recipient animals received i.v. 10^{12} vg/ rat AAV-IL-34 or noncoding AAV or were untreated, with or without weekly i.p. administration of clodronate liposomes from day -25 to day 3, and were grafted on day 0 in combination with a suboptimal dose of rapamycin (10 days, starting on day 0). Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Log-rank test, ** $P < 0.01$.

and CD8⁺ Tregs. Strikingly, we observed a specific and uniquely high level of expression of IL-34 by FOXP3⁺CD45RC^{lo} CD4⁺ and CD8⁺ Tregs that did not occur for CD45RC^{hi} and FOXP3⁺CD45RC^{lo} CD4⁺ and CD8⁺ T cells, demonstrating that among T cells, Tregs specifically express IL-34. In addition, we also demonstrated the ex vivo-suppressive potential of IL-34 alone on the antidonor immune response, suggesting its potential as a target therapeutic in transplantation and, by extension, in autoimmune diseases. However, we observed that 5 μ g/ml human IL-34 was needed to significantly suppress in vitro human antidonor immune responses, while it is known that IL-10 and TGF- β act in the ng/ml range to suppress effector T cell responses, suggesting that either the conditions we used to test the suppressive capacity of IL-34 were not optimal or that IL-34 is less potent at inhibiting antidonor immune responses than IL-10 or TGF- β . Interestingly, we managed to demonstrate that blocking IL-34 in a suppressive assay with CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} or CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs restored effector T cell proliferation, confirming the important contribution of IL-34 to human Treg-mediated activity. The concentration of the anti-IL-34 Ab was in a relatively high range, but we cannot exclude that the affinity of this Ab is not optimal, and the adequate isotype- and species-negative control validates this observation. The generation of IL-34-deficient rats using engineered nucleases as previously done in our laboratory (45, 46) is under way and will help to further address the key role of IL-34 in Treg function. Similarly, the generation of FOXP3-GFP rats will help to define whether FOXP3⁺ Tregs are the only Tregs that express IL-34 and to further explore the role of IL-34 in Treg biology. The therapeutic value of this molecule is evidenced by the generation of an AAV encoding IL-34. With this vector, we were able to show the potent immunosuppressive properties of IL-34 in vitro and, more important, in vivo, where we obtained tolerance in 64% of the recipients when IL-34 was combined with a suboptimal dose of rapamycin. We also demonstrated that such therapy results in abrogation of all allogeneic immune responses and of tolerance induction. Previous studies have demonstrated that both M-CSF and IL-34 can differentiate monocytes into regulatory macrophages (32, 36) and that the regulatory macrophages induced in vitro by M-CSF and IFN- γ can be used in vivo to prolong heart allograft survival in mice (36). Another study has demonstrated that administration of M-CSF before transplantation into mice can expand macrophages and limit donor T cell expansion and GVHD (44). Chen et al. showed an increase in the CD11b⁺ cell

population in mice treated with soluble IL-34 protein (47). Other studies revealed a decrease in pDCs and cDCs in CD115-deficient osteopetrotic mice (27) and an M-CSF-induced increase in DC numbers (26). Surprisingly, in our study, in contrast with other studies, an in vivo IL-34 tolerogenic effect following administration was mainly transferred by Tregs (either CD4⁺CD25^{hi} or CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs). We demonstrated that the tolerance achieved in AAV-IL-34-treated recipients can be transferred to newly grafted, irradiated recipients for at least 3 generations and that this effect is mediated by Tregs but, despite an increase in the CD11b⁺ cell population (data not shown), not by splenic macrophages. However, since T cells do not express the CD115 receptor, we hypothesized and demonstrated that IL-34 mediated its effect on Tregs through macrophages. Regulatory macrophages can anergize CD4 effector T cells (48), convert T cells into Tregs (49), and inhibit other APCs (50). We demonstrate that IL-34-induced regulatory macrophages migrate early to the graft and express high levels of arginase 1 and iNOS, suggesting that immunoregulatory mechanisms limit the proliferation and survival of effector T lymphocytes (35, 36). These results highlight the functional differences between IL-34 and M-CSF and add to the debate on this topic, as several studies have shown a proinflammatory role of M-CSF, which increases macrophage proliferation and accumulation in rejected renal allografts (51).

To provide the proof of concept that a similar mechanism exists in humans, we differentiated monocytes in the presence of IL-34. We were able to demonstrate that IL-34-differentiated macrophages that are added to total allogeneic PBMCs efficiently expand and potentiate the ability of FOXP3⁺ Tregs to inhibit antidonor immune responses. It should be noted that both IL-34 and FOXP3 coexpression in Tregs remained stable. Altogether, these data suggest a retroactive loop of IL-34-secreting Tregs that are able to induce regulatory macrophages that in turn induce new IL-34-secreting Tregs.

In conclusion, we describe here the role of a new cytokine, IL-34, in transplant tolerance, and we reveal its potential as a therapy in transplantation and, by extension, in other diseases. We also demonstrate for the first time to our knowledge that this cytokine can be produced by Tregs and that, in turn, administration of IL-34 results in the potent induction of Tregs capable of tolerance induction in a dominant manner, opening new possibilities for the generation of Tregs that could be transferable to the human setting.

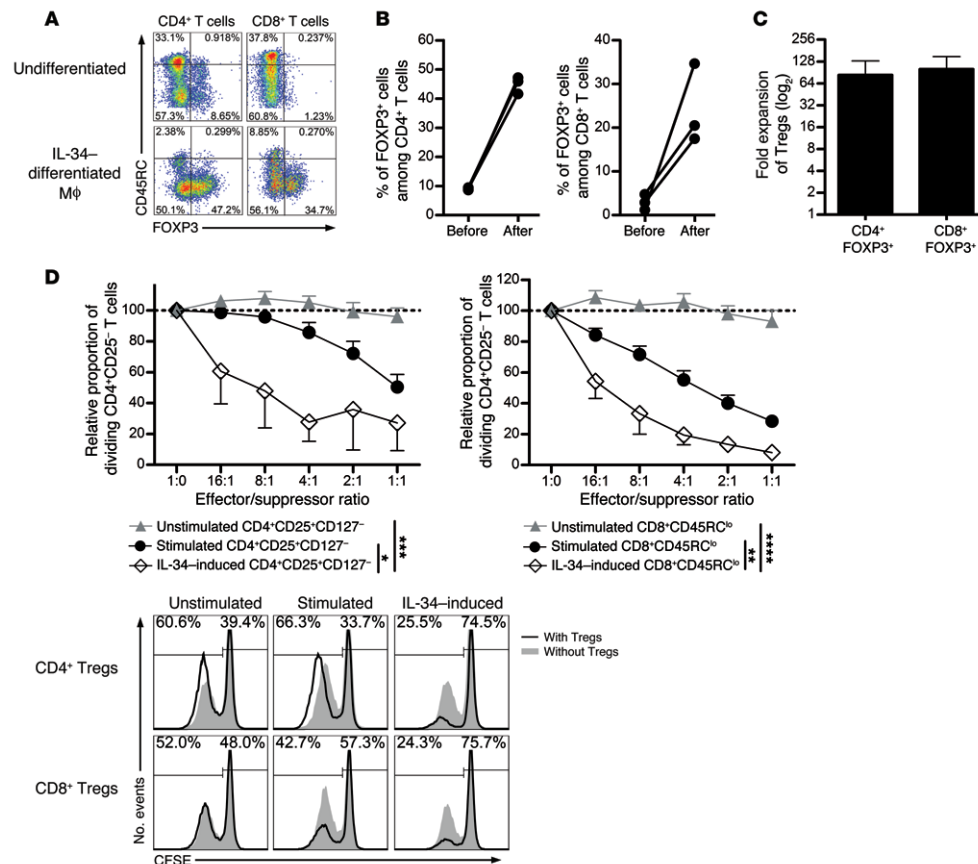


Figure 8. Efficient human FOXP3⁺ Treg expansion and potentiation following IL-34-induced macrophage differentiation. CD14⁺ monocytes were differentiated for 6 days with IL-34 or not and added to total allogeneic PBMCs for 21 days. The percentage of FOXP3⁺ cells was evaluated in PBMCs among CD4⁺ or CD8⁺ CD45RC^{lo} or CD45RC^{hi} T cells. A representative plot (**A**) and graph (**B**) are shown before and after culture for 3 healthy individuals. Mφ, macrophages. (**C**) Fold expansion was evaluated for FOXP3⁺ CD4⁺ or CD8⁺ Tregs. (**D**) Unstimulated, stimulated, or IL-34-expanded CD4⁺CD25⁻CD127⁻ and CD8⁺CD45RC⁻ Tregs were tested for suppression of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation in response to allogeneic T cell-depleted PBMCs and analyzed by flow cytometry for CFSE dilution after 5 days of culture ($n = 3$). The proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells in the control proliferation condition with allogeneic T cell-depleted PBMCs only represented approximately 60% of the cells on day 5 and was given a value of 100 in each experiment. Results are expressed as the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁻ T cells. A representative raw CFSE profile is shown. Two-way repeated-measures ANOVA, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

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 (18). Heart survival was evaluated by palpation through the abdominal wall, and heart beat was graded from +++ to -.

Healthy volunteer blood collection and PBMC separation. Blood was diluted 2-fold with PBS before PBMCs were isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation (Eurobio) at 770 g for 20 minutes at room temperature without braking. Collected PBMCs were washed in 50 ml PBS at 620 g for 10 minutes.

Rat splenocyte purification. Spleens were digested by collagenase D for 15 minutes at 37°C, stopped with 0.01 mM EDTA, and red cells were lysed.

Cell sorting. Macrophages were sorted on TCRαβ⁺ (R7/3) and TCRγδ⁺ (V65) cells and CD45RA-FITC⁺ (OX33) and CD11b/c-APC⁺ (OX42) cells. Naive LEW.1A CD4⁺CD25⁻ T cells and LEW.1W pDC and LEW.1A CD8⁺CD45RC^{lo} Treg subsets were sorted as previously described (21). The Abs used for the sorting of T cells (TCRαβ, clone R7/3), CD4⁺CD25⁻ T cells (clones OX35 and OX39), CD8⁺CD45RC^{lo} T cells (clones OX8 and OX22), and TCR CD45RA⁺CD4⁺CD45R⁺ pDCs (clones His24 and OX35) were obtained from the European Collection

Table 1. Summary of the primers used

Gene	Primer	Sequence
Il34	Forward	CTGGCTGCTCTACCTGA
	Reverse	TGTCGTGGCAAGATATGGCAA
Arg1	Forward	CCAACTCTTGGGAAGACACCA
	Reverse	GTGATGCCCCAGATGACTTT
Il10	Forward	TGCTATGTGCTGCTCTTACTG
	Reverse	TCAAATGCTCTTGTATTCTGG
Inos	Forward	GACCAAACTGTGTCTCTGGA
	Reverse	TACTCTGAGGCTGACACAAGG
Cd14	Forward	CAACAGGCTGGATAGGAACCT
	Reverse	TGACTACGCGAGATTATACGC
Cd16	Forward	GTGAACCTAGACCTGAATGGG
	Reverse	CACCTGCTCTTAAGCTGGCACT
Cd86	Forward	ACAGCAAAAGACACCAAGG
	Reverse	CTGTCTTCTCTGAGCTCTCTC
Cd23	Forward	TCCTCTATGGCACTGGGAAC
	Reverse	TTGTGACATCTGAAGAGCTCG
Cd32	Forward	TGCTCTCAGGCACTTGTACC
	Reverse	GGAGTAGCAGGAGCTGAGAAT
Tnfr	Forward	CTTATCTACTCCAGGTTCTCTCA
	Reverse	GAGACTCTCCAGGTACATGG
Il1	Forward	GTCAAGCAACATCAACAAAGG
	Reverse	CACAGGATATTAGAGTCGTC
Tgfb	Forward	CTCAACACTGCGACAGCTCC
	Reverse	ACGATCATGTTGGACAACCTGT
Csf1	Forward	CGAGGTGTCGGAGCACTGTA
	Reverse	CGATCAACTGCTGCAAAATCTG

of Cell Culture. Biotin-labeled mAbs were visualized using streptavidin-phycoerythrin-Cy7 or streptavidin-Alexa Fluor 405 (BD Biosciences). Human CD4⁺CD25⁺ T cells were sorted by gating on CD3⁺CD4⁺CD25⁺ cells (clones SKY7, L-200, and MA251; BD Biosciences), CD4⁺ Tregs by gating on CD25^{hi} and CD127^{lo} cells (clone HIL7-R M21; BD Biosciences), and CD8⁺ Tregs by gating on CD3⁺CD4⁺CD45RC^{lo} cells (clone MT2; IQ Products). A FACSAria I cell sorter (BD Biosciences) was used to sort cells.

mAbs and flow cytometry. Rat IL-34-Myc was detected using an anti-Myc Ab (9E10; Sigma-Aldrich). Blocking Abs against IL-34 (PAB16574; Abnova and clone 578416; R&D Systems); CD115 (MCA1898; Serotec); and M-CSF (AB-416-NA; R&D Systems) were used in MLR assays.

Abs against MHC II (OX6); CD11b/c (OX42); and CD45RA⁺ B cells (OX33) were analyzed to characterize rat cell phenotypes.

Abs against CD3-PECy7 (SKY7; BD Biosciences); CD4-PerCPy5.5 (L200; BD Biosciences); CD25-APCCy7 (M-A251; BD Biosciences); CD127-PE (HIL7-R M21; BD Biosciences); CD45RC-FITC (MT2; IQ Product); FOXP3-APC (236A/E7; eBioscience); and IL-34-PE (578416; R&D Systems) were used to characterize human cell phenotypes.

Fluorescence was measured with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences), and FlowJo software was used to analyze data. Cells were first gated by their morphology, excluding dead cells by selecting DAPI-viable cells (Supplemental Figure 2).

Adoptive cell transfer. Rat cells were sorted as previously described (ref. 5, 8, and Supplemental Figure 2C) using a FACSAria cell sorter (BD Biosciences) by gating on TCRαβ-APC (R7/3), CD45RA-FITC (OX33), and CD11b/c-biotin-streptavidin PECy7-positive (OX42)

cells. Recipients of splenocytes from IL-34-treated rats were defined as first transfers, and then iterative transfers were defined as second to third transfers. Total splenocytes (1.5 × 10⁸ cells) and FACSAria-sorted CD45RA⁺ B cells (6 × 10⁷); T cells (4 × 10⁷); CD11b/c⁺ cells (1.5 × 10⁷); CD4⁺CD25^{hi} Tregs (4 × 10⁶); or CD8⁺CD45RC^{lo} Tregs (4 × 10⁶) were adoptively transferred i.v. the day before heart transplantation into naive LEW.1A recipients that had received 4.5 Gy whole-body irradiation the same day.

MLR. Sorted rat or human CD4⁺CD25⁺ T cells were plated in triplicate with allogeneic rat pDCs or allogeneic human T cell-depleted PBMCs, respectively, in 200 μl complete RPMI-1640 medium in round- or conic-bottomed 96-well plates, respectively, at 37°C and 5% CO₂. Proliferation of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ T cells was analyzed by flow cytometry 6 days later by gating on TCR⁺CD4⁺ cells among living cells (DAPI) (Supplemental Figure 2A). Sera from AAV-IL-34-treated recipients, AAV-GFP-treated recipients, and naive rats were added in coculture to reach final concentrations of 3.12%, 6.25%, and 12.5%. Supernatant of transduced cells was added to CD4⁺T cells and pDCs at a final concentration of 20% for the suppressive activity test. Rat IL-34-, CD115-, or M-CSF-blocking Abs were tested for blocking action at 1.25 to 30 μg/ml in the presence or absence of CD8⁺CD40Ig Tregs. Human IL-34 Ab was used at 50 μg/ml, and variable numbers of Tregs were added. Isotype control Abs were used at the highest concentration displayed in the respective graphs. M-CSF protein (ab56288; Abcam) was tested from 0.1 to 2 μg/ml. Soluble human IL-34 (eBioscience) was added at a concentration of 1, 2, or 5 μg/ml for the suppressive activity test.

qPCR. Total RNA was isolated from cells using TRIzol reagent (Invitrogen) or an RNeasy Mini Kit (QIAGEN). RNA from macrophages was amplified with a MessageAmp II aRNA Amplification Kit according to the manufacturer's instructions (Life Technologies) and reverse transcribed with random primers and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies). qPCR was performed using the Fast SYBR Green technology in a 20-μl final reaction volume containing 10 μl Master Mix 2X (Life Technologies), 0.6 μl primers (10 μM), 1 μl cDNA, and 8.4 μl water. The reaction was performed on the Applied Biosystems StepOne system (Life Technologies). Thermal conditions were as follows: 3 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 15 seconds at -5°C of the melting temperature with a final melting curve stage. The oligonucleotides used in this study are listed in Table 1.

AAV generation and use in vitro and in vivo. Complete cDNA sequences of rat IL-34 (9), or GFP as a control, were positioned downstream of an RSV promoter. Plasmids were first tested in HEK293T cells transfected with lipofectamine reagent (Life Technologies). Cells were analyzed for IL-34-Myc expression 48 hours later by FACS with anti-Myc Ab. Then, plasmids were used to produce AAV vectors of serotype 8 (Viral Vector Core, INSERM UMR 1089, Nantes, France). HEK293T cells were transduced with 10 or 100 MOI vector genome copies/cell of AAV-IL-34 or AAV-GFP and 5 MOI AdLacZ. Twenty-four hours later, the cells were harvested and analyzed for IL-34-Myc expression by FACS, and supernatant was tested for suppression activity on CD4⁺ T cells responding to allogeneic pDCs, at 1:10 and 1:5 dilutions. Recombinant AAV-IL-34, AAV-GFP, and noncoding AAV (1 × 10¹² vector genomes/rat) vectors were injected i.v. into 4-week-old rats 1 month before transplantation to allow optimal expression from AAV vectors (30). Recipients were orally administered 0.4 mg/kg/day rapamycin from the day of transplantation (day 0) until 10 days

after transplantation. Blood samples were taken on day 120 for donor-allospecific Ab quantification and IL-34 protein quantification in serum by ELISA (ELO11657RA; Cusabio).

Clodronate liposome in vivo treatment. Clodronate liposomes for macrophage depletion were purchased from Vrije University (Netherlands) (www.clodronateliposomes.org) and prepared as recommended (52). Briefly, 2.5 ml suspended solution was administered i.p. weekly from day -25 to day 3.

Donor-specific alloantibody quantification. Donor spleens were digested by collagenase D, stopped with 0.01 mM EDTA, and red cells were lysed. Serum from recipients was added to donor splenocytes at a 1:8 dilution and incubated with either anti-rat IgG-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories); 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 Laboratories). A FACSCanto (BD Biosciences) was used to measure fluorescence, and data were analyzed using FlowJo software. The geometric mean of fluorescence (mean fluorescence intensity [MFI]) of tested sera was divided by the mean MFI of 5 naive LEW.1A sera as a control.

Anatopathologic analysis of cardiac grafts. Graft samples were fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. Five-micrometer coronal sections were stained with H&E-saffron. Tissues were analyzed by a pathologist (K. Renaudin) blinded to the groups, and chronic rejection was evaluated as previously described (53).

Treg and monocyte differentiation protocol. PBMCs from healthy volunteer (HV) blood were isolated by Ficoll gradient, and monocytes were elutriated according to forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) morphologic parameters. CD14⁺ monocytes were then sorted by FACSARIA, washed, and seeded at 1×10^6 /ml in medium (RPMI 1640, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 10% FCS supplemented with 50 ng/ml hIL-34 (eBioscience)). On day 6, cells were harvested, stimulated with 100 ng/ml LPS for 24 hours for phenotype analysis, or seeded at 4×10^5 /ml with 1 to 5 allogeneic PBMCs in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 5% AB serum). IL-2 (25 U/ml) and IL-15 (10 ng/ml) were freshly added on days 10, 13, and 16. Macrophages were removed by successive transfers of floating cells to a new plate on days 19 and 21 for 48 hours and 2 hours, respectively. On day 21, cells were stimulated with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin A for phenotype analysis, or T cells, CD8⁺CD45RC⁺ T cells, and CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo} T cells were sorted by FACSARIA for suppression assays. Fresh syngeneic CD4⁺CD25⁺ T cells were used as responder T cells stimulated with allogeneic APCs isolated from the same donor as that of the CD14⁺ cells. Proliferation was assessed 5 days later by CFSE dilution, by

gating on CD3⁺CD4⁺ cells after exclusion of DAPI-labeled dead cells and CPD405-labeled CD4⁺ Tregs.

Statistics. Mann-Whitney *U* and Kruskal-Wallis tests were used for PCR analyses. ANOVA tests were used for coculture experiments, a 2-way ANOVA test and Bonferroni's post tests were applied for donor-directed Ab detection, and a log-rank (Mantel-Cox) test was used to analyze survival curves. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Study approval. Animal experiments were approved by the ethics committee of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France; CEEA.2013.52). Blood was collected from healthy donors, after informed consent was given, at the Etablissement Français du Sang (Nantes, France).

Acknowledgments

We thank Emmanuel Merieau and Bernard Martinet for technical assistance with animal models. We thank the Viral Vector Core of the CHU de Nantes, INSERM UMR 1089, which is supported by the Association Française Contre les Myopathies, for producing the viral vectors. We thank the Fondation Progreffe and the Société Francophone de Transplantation for financial support and the Crédit Agricole for the donation of the FACSARIA. This work was performed as part of the LabEX ImmunoGraft Oncology (IGO) program supported by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01. This work was also supported by funding from the Institut Hospitalo-Universitaire-Centre Européen des Sciences de la Transplantation et Immunothérapie project, which received French Government financial support and was managed by the National Research Agency via the investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire region. C. Guillonnet was supported for this work by a Junior Basic Science grant from European Society for Organ Transplantation (ESOT). I. Anegon was supported by a Roche Organ Transplantation Research Foundation (ROTRF) grant. S. Bézie was supported by Progreffe and the Société Francophone de Transplantation. E. Picarda was supported by an INSERM-Region Pays de la Loire Fellowship. J. Ossart was supported by Progreffe and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Address correspondence to: Carole Guillonnet or Ignacio Anegon, INSERM UMR 1064 – Center for Research in Transplantation and Immunology – ITUN, 30 Bd. Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone: 33.2.40087410; E-mail: carole.guillonnet@univ-nantes.fr (C. Guillonnet), ignacio.anegon@univ-nantes.fr (I. Anegon).

- Nankivell BJ, Borrowers RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2326–2333.
- Srinivas TR, Kaplan B. Transplantation in 2011: New agents, new ideas and new hope. *Nat Rev Nephrol*. 2012;8(2):74–75.
- Londino MC, Danger R, Giral M, Souillou JP, Sanchez-Fueyo A, Brouard S. A need for biomarkers of operational tolerance in liver and kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2012;12(6):1370–1377.
- Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):417–430.
- Niederhorn JY. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):327–331.
- Picarda E, Anegon I, Guillonnet C. T-cell receptor specificity of CD8(+) Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy*. 2011;3(4 suppl):35–37.
- Guillonnet C, Picarda E, Anegon I. CD8+ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(6):751–756.
- Menoret S, Guillonnet 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.
- Wei S, 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;88(3):495–505.
- Nandi S, et al. Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem*. 2013;288(30):21972–21986.
- Chihara T, 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;17(12):1917–1927.
12. Wang Y, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol.* 2012;13(8):753–760.
 13. Chemel M, et al. Interleukin 34 expression is associated with synovitis severity in rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(1):150–154.
 14. Baud'huin M, et al. Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol.* 2010;221(1):77–86.
 15. Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR. 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. *J Exp Med.* 1983;158(3):795–810.
 16. Xystrakis E, Bernard I, Dejean AS, Alsaati T, Druet P, Saoudi A. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RC^{high} but not the CD45RC^{low} subset. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):408–417.
 17. Xystrakis E, et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood.* 2004;104(10):3294–3301.
 18. Guillonnet C, et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 2007;117(4):1096–1106.
 19. Powrie F, Mason D. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J Exp Med.* 1990;172(6):1701–1708.
 20. Ordóñez L, Bernard I, L'Faqihi-Olive FE, Ter-vaert JW, Damoiseaux J, Saoudi A. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One.* 2009;4(4):e5287.
 21. Li XL, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol.* 2010;185(2):823–833.
 22. Bezie S, et al. Fibrinogen-like protein 2/fibroblastin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS One.* 2015;10(3):e0119686.
 23. Picarda E, et al. MHC-derived alloepitope activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2497–2512.
 24. Lin H, et al. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science.* 2008;320(5877):807–811.
 25. Garceau V, et al. Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CS9F-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products. *J Leukoc Biol.* 2010;87(5):753–764.
 26. Fancke B, Suter M, Hochrein H, O'Keeffe M. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood.* 2008;111(1):150–159.
 27. MacDonald KP, et al. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J Immunol.* 2005;175(3):1399–1405.
 28. Gilmore GL, Shaddock RK. Inhibition of day-12 spleen colony-forming units by a monoclonal antibody to the murine macrophage/monocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood.* 1995;85(10):2731–2734.
 29. Ordóñez L, et al. A higher risk of acute rejection of human kidney allografts can be predicted from the level of CD45RC expressed by the recipients' CD8 T cells. *PLoS One.* 2013;8(7):e69791.
 30. Toromanoff A, et al. Safety and efficacy of regional intravenous (i.v.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther.* 2008;16(7):1291–1299.
 31. Le Texier L, et al. Immunoregulatory function of IL-27 and TGF- β 1 in cardiac allograft transplantation. *Transplantation.* 2012;94(3):226–233.
 32. Foucher ED, et al. IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN- γ . *PLoS One.* 2013;8(2):e56045.
 33. Martínez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Front Immunol.* 2014;5:13.
 34. Murray PJ, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14–20.
 35. Cobbold SP, et al. Infectious tolerance via the consumption of essential amino acids and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(29):12055–12060.
 36. Riquelme P, et al. IFN- γ -induced iNOS expression in mouse regulatory macrophages prolongs allograft survival in fully immunocompetent recipients. *Mol Ther.* 2013;21(2):409–422.
 37. 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;68(1):144–150.
 38. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):533–544.
 39. 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;52(3):215–220.
 40. 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;60(4):1465–1472.
 41. 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;20(1):79–102.
 42. Sakurai T, Yamada M, Shimamura S, Motoyoshi K. Recombinant human macrophage-colony stimulating factor suppresses the mouse mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol.* 1996;171(1):87–94.
 43. Duluc D, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 2007;110(13):4319–4330.
 44. Hashimoto D, et al. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Exp Med.* 2011;208(5):1069–1082.
 45. Menoret S, et al. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur J Immunol.* 2010;40(10):2932–2941.
 46. Larcher T, et al. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2014;9(10):e110371.
 47. Chen Z, Buki K, Vaaranen J, Gu G, Vaananen HK. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One.* 2011;6(4):e18689.
 48. Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA. Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood.* 2002;99(4):1465–1473.
 49. Liu G, Duan K, Ma H, Niu Z, Peng J, Zhao Y. An instructive role of donor macrophages in mixed chimeras in the induction of recipient CD4⁺Foxp3⁺ Treg cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(8):827–835.
 50. Holt PG, Schon-Hegrad MA, Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med.* 1988;167(2):262–274.
 51. 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;3(3):294–300.
 52. Van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods.* 1994;174(1–2):83–93.
 53. Guillonnet C, et al. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF- κ B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol.* 2004;172(3):1619–1629.

THE POWER TO SEE

CytoFLEX FLOW
CYTOMETER
Advanced Sensitivity
and Resolution



Compensatory Regulatory Networks between CD8 T, B, and Myeloid Cells in Organ Transplantation Tolerance

This information is current as of November 15, 2016.

Séverine B  zie, Elodie Picarda, Jason Ossart, Bernard Martinet, Ignacio Anegon and Carole Guillonnet

J Immunol 2015; 195:5805-5815; Prepublished online 9 November 2015;

doi: 10.4049/jimmunol.1500473

<http://www.jimmunol.org/content/195/12/5805>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2015/11/07/jimmunol.1500473.DCSupplemental.html>

References This article **cites 43 articles**, 9 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/195/12/5805.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://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://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994. Copyright    2015 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved. Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Compensatory Regulatory Networks between CD8 T, B, and Myeloid Cells in Organ Transplantation Tolerance

Séverine B  zie,¹ Elodie Picarda,¹ Jason Ossart, Bernard Martinet, Ignacio Anegon, and Carole Guillonnet

In transplantation tolerance, numerous regulatory populations have the capacity to inhibit allograft rejection; however, their compensatory capacities have never been clearly evidenced. We have previously demonstrated that the tolerogenic effect mediated by CD8⁺CD45RC^{low} regulatory T cells (Tregs) in a model of organ transplantation with CD40lg could be abrogated by permanent depletion of CD8⁺ cells that resulted in allograft rejection in half of the recipients. This result demonstrated that CD8⁺ Tregs were essential, but also that half of the recipients still survived indefinitely. We also demonstrated that no other regulatory populations, besides CD8⁺ Tregs, could induce and maintain allograft tolerance in CD40lg-treated tolerant animals. In the current study, we analyzed the mechanisms that arose following CD8⁺ Treg depletion and allowed establishment of networks of new regulatory cells to maintain allograft survival. We identified regulatory B cells (Bregs) and regulatory myeloid cells (RegMCs) as being responsible of the maintenance of the long-term allograft survival. We demonstrated that both regulatory cell subsets efficiently inhibited antidonor immune responses in adoptively transferred recipients. Although Bregs were induced, they were not essential for the maintenance of the graft as demonstrated in IgM-deficient recipients. In addition, we showed that RegMCs were the most suppressive and acted alone, whereas Bregs activity was associated with increased suppressive activity of other subsets in adoptively transferred recipients. Altogether, to our knowledge, we demonstrated in this study for the first time the emergence of both Bregs and RegMCs following Tregs depletion and highlighted the importance of regulatory cell networks and their synergistic potential in transplantation. *The Journal of Immunology*, 2015, 195: 5805–5815.

The recent findings and descriptions of numerous regulatory populations that can play a role in various situations suggest the existence of a vast cooperation and association between them. It also pinpoints that there is a need for a better comprehension of these networks, and that such understanding has implication for advances in immune tolerance. The identification of regulatory populations has greatly been improved these past few

years with the identification of new markers. In particular, the regulatory potential of new subsets such as B cells or myeloid cells (MCs) has been unraveled and lots of efforts are being done to identify specific markers and mechanisms, as it has been done for CD4⁺ regulatory T cells (Tregs), and more recently for CD8⁺ Tregs (1).

We and others have demonstrated the immunoregulatory potential of regulatory B cells (Bregs) in transplantation tolerance in rodents and human (2–8) and described different subsets of Bregs with distinct mechanisms (9, 10). Regulatory MCs (RegMCs) have been less studied, but data are emerging demonstrating their protective potential in rodent models of transplantation, but also more recently in clinical trials (11, 12). In addition, regulatory populations seems to share some important mechanisms of action (such as IL-10 secretion), and it is thus important to characterize and understand their tolerogenic properties in rodent models and how we can modulate emergence of such networks of regulatory populations before translation into human.

We have been studying in depth for several years a subset of CD8⁺ Tregs that is characterized by the low expression of the marker CD45RC (1, 7, 13–20). We have demonstrated that following CD40lg treatment, only CD8⁺CD45RC^{low} T cells are capable of infectious allogeneic tolerance through dominant suppression by expression of IFN- , which in turn induces IDO expression, but also expression of fibrinogen-like protein 2/fibronectin (21) and IL-34 (20). We also showed that CD8⁺CD45RC^{low} T cell and plasmacytoid dendritic cells (pDC) 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 (14). We have identified a donor MHC class II-derived peptide (Du51) that is recognized by TCR-biased CD8⁺CD45RC^{low} Tregs. We generated a labeled tetramer (MHC-I RT1.A^a/Du51) and demonstrated that RT1.A^a/Du51-specific

INSERM UMR1064–Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie–Institut de Transplantation et de Recherche en Urologie et N  phrologie, 44093 Nantes, France; and Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Faculté de Médecine, Université de Nantes, 44093 Nantes, France

¹S.B. and E.P. are cofirst authors.

Received for publication February 25, 2015. Accepted for publication October 11, 2015.

This work was supported by the Fondation Progreffe. This work was realized in the context of the LabEX ImmunoGraft Oncology program supported by the National Research Agency via investment of the future program ANR-11-LABX-0016-01 and under the auspices of the Institut Hospitalo-Universitaire-Cesti project which received French government financial support managed by the National Research Agency via investment of the future program ANR-10-IBHU-005. The Institut Hospitalo-Universitaire-Cesti project is also supported by Nantes M  tropole and the Pays de la Loire Region. C.G. was supported by a Junior Basic Science grant from the European Society for Organ Transplantation. I.A. was supported by a Roche Organ Transplantation Research Foundation grant. S.B. was supported by Progreffe and the Société Francophone de Transplantation. E.P. was supported by an INSERM-Region Pays de la Loire Fellowship. J.O. was supported by Progreffe and the Fondation pour la Recherche Médicale.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Carole Guillonnet, INSERM UMR1064–Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie–Institut de Transplantation et de Recherche en Urologie et N  phrologie, 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. E-mail address: carole.guillonnet@univ-nantes.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: BN, Brown Norway; Breg, regulatory B cell; HO-1, heme oxygenase-1; KO, knockout; MC, myeloid cell; pDC, plasmacytoid dendritic cell; qPCR, quantitative PCR; RegMC, regulatory MC; T1, transitional type 1; Treg, regulatory T cell; WT, wild-type.

Copyright    2015 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/15/\$25.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1500473

Downloaded from <http://www.jimmunol.org/> at Universite Nantes BU Sante on November 15, 2016

CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were the most suppressive subset of the total Treg population and were essential for *in vivo* tolerance induction. Finally, we demonstrated that treatment of transplant recipients with the Du51 peptide resulted in indefinite prolongation of allograft survival through induction of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs (16). Altogether, we clearly demonstrated that Ag-specific CD8⁺ Tregs are essential to tolerance induction. In addition, we showed that tolerance could be abrogated by cotreatment of recipients with anti-CD8 α depleting mAb (13). Permanent depletion of peripheral blood CD8 α ⁺ cells resulted in allograft rejection in half of the recipients demonstrating the key role of that regulatory T cell population. However, it also pinpointed that half of the recipients still survived and that suggested emergence of alternative regulatory mechanisms (13). In this study, we analyzed the events that arose following CD8⁺ Tregs depletion to inhibit allograft rejection. Surprisingly, we identified populations of Bregs and RegMCs, which were not present before depletion of CD8⁺ Tregs, capable of inhibiting acute allograft rejection and maintaining indefinite allograft survival in some of the recipients. We demonstrated that those new regulatory populations acted in a dominant fashion, capable of inducing new allograft survival in secondary grafted recipients. We showed also that RegMCs were the most potent, acting independently of Bregs, whereas Bregs acted through other regulatory subsets. Altogether, we unraveled the potential of networks of regulatory cells in transplantation, and that usage of the right conditions for appearance of new regulatory populations could lead to more efficient targeted therapies.

Materials and Methods

Cardiac transplantation model

Heart from a LEW.1W rat (donor) or Brown Norway (BN) rat (third party) was transplanted in a heterotopic abdominal position into an MHC incompatible LEW.1A rat (recipient). Graft was immediately injected with 2.5×10^{10} infectious particles/rat AdCD40lg intramyocardium as described previously (22). Then, 4 mg/kg anti-CD8 α depleting mAb (OX8) or irrelevant control Ab (3G8) was injected i.p. weekly from day 0 until the sacrifice and harvesting of samples at day 120. For adoptive transfer, recipients were sublethally irradiated (4.5 Gy) and transferred with cells 1 d before transplantation (see below). Graft 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 (CEEAA.2013.51).

Adoptive cell transfer

Spleen was digested by collagenase D for 15 min at 37°C and stopped with 10 μ M EDTA, and red cells were lysed. Total splenocytes (1×10^8), or purified cell populations of MCs (7×10^6), B ($1.5\text{--}3 \times 10^5$), T (2.5×10^5), and NK ($2\text{--}6 \times 10^6$) cells sorted with >99% purity by FACS Aria (BD Biosciences, Mountain View, CA) by gating on CD11b/c⁺ (OX42), CD45RA⁺ (OX33), TCR $\alpha\beta$ ⁺ (R7/3), and TCR CD161^{high} (3.2.3), respectively, were transferred i.v. into sublethally irradiated recipients the day before the graft.

Mixed leukocyte reaction

CD4⁺CD25⁻ effector T cells and pDCs were sorted from naive LEW.1A and LEW.1W, respectively, as described previously (14). A total of 2.5×10^4 effector cells was stimulated at a pDC:effector ratio of 1:4, and variable numbers of suppressor cells were added. MCs, B cells, and T cells were sorted from long-surviving recipients or naive rats (see above). Proliferation of CFSE-labeled effector cells was assessed by flow cytometry after 6 d of coculture by gating on effector cells among living cells (DAPI negative).

mAbs and staining

The Abs used for T cells (TCR $\alpha\beta$, clone R7/3), CD4⁺CD25⁻ T cells (clones OX35 and OX39), CD8⁺CD45RC^{low} T cells (clones OX8 and OX22), pDCs (TCR⁻CD4⁺CD45R⁺, clones OX35 and His24), MCs (CD11b/c⁺, clone OX42), NK cells (TCR⁻CD161^{high}, clone 3.2.3), and

B cells (CD45RA⁺, clone OX33) staining were obtained from the European Collection of Cell Culture (Salisbury, U.K.). Biotin-labeled mAbs were visualized using streptavidin-PE-Cy7 (BD Biosciences). B cells were characterized with anti-CD24 (clone His50), CD5 (clone OX19), CD27 (clone LG.3A10; BD Biosciences, Mountain View, CA), IgM (clone MARM4; Serotec), and IgD (clone MARD3; Serotec). Fluorescence was assessed with a Canto II cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed with the FlowJo software (Tree Star USA). A FACS Aria I (BD Biosciences) was used to sort cells. Cells were first gated by their morphology and DAPI-negative viable cells.

CTL assay

Splenocytes were isolated and used directly as effector cells. ⁵¹Cr (100 μ Ci for 1 h at 37°C)-labeled LEW.1W, BN, and LEW.1A splenic Con A (2 μ g/ml, in the presence of IL-2 at 100 U/ml for 3 d) blasts were used as target cells. The effector and target cells were plated in triplicate round bottom 96-well microtiter plates (10^4 target cells/well) at E:T ratios of 100:1 in the culture medium. After incubation (6 h at 37°C), the plates were centrifuged, ⁵¹Cr was measured using a beta counter, and the percentage of specific lysis was calculated as $100 \times (\text{cpm experimental release} - \text{spontaneous release}) / \text{cpm (maximal release} - \text{spontaneous release})$. Maximal release, cells incubated with 1% SDS; spontaneous release, cells incubated with medium. Spontaneous release was always <10%.

Alloantibody detection

Serum of recipients was added to donor splenocytes at a range of serial dilution from 1/10 to 1/270, and incubated with either anti-rat IgG-FITC (112-096-071; Jackson ImmunoResearch Laboratories), anti-rat IgG1 (MCA 194; Serotec), anti-rat IgG2a (MCA 278; Serotec), or anti-rat IgG2b (MCA 195; Serotec), and anti-Ms Ig-FITC (115-095-164; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Direct LEW.1W background staining was eliminated.

PCR analysis

mRNA isolation and retrotranscription was performed on total graft as done previously (13). For sorted cells, RNA was isolated using RNeasy Mini Kit, amplified with MessageAmp II aRNA Amplification Kit, according to the manufacturer instructions (Life Technologies), and reverse transcribed with random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies). The quantification of specific mRNA levels was performed using SybR Green technology after normalization to hypoxanthine phosphoribosyltransferase values as described already (13). The reaction was performed on the Applied Biosystems StepOne (Life Technologies). Oligonucleotides used in this study are reported in Table I.

Statistical analysis

A log-rank (Mantel-Cox) test was used to analyze survival curves. Mann-Whitney was applied for PCR analysis, CTL assay, and phenotypic analysis of spleen. Two-way ANOVA and Bonferroni posttest was used to analyze MLR and alloantibodies production.

Results

Compensatory regulatory mechanism establishment in absence of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs resulted in partial allograft survival

We previously demonstrated that CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were critical component of the regulation induced by CD40-CD40L costimulatory blockade in a model of indefinite allograft survival (13). Depletion of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs using anti-CD8 α mAbs during 120 d resulted in allograft rejection in ~40% of the CD40lg-treated recipients (Fig. 1A) (13), whereas injection of irrelevant mAbs (3G8) did not. Recipients treated with the anti-CD8 α Ab were depleted in CD8 α ⁺ cells during all the course of the treatment, as assessed at days 30, 60, and 120 in the blood and at day 120 in the spleen, compared with recipients treated with the irrelevant Ab (Supplemental Fig. 1). These results suggested that although CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were essential, still 60% of the depleted recipients survived long-term, and we wondered whether other regulatory cell subsets that were not involved in CD40lg-mediated allograft survival (13) arose following CD8⁺CD45RC^{low} Tregs depletion to compensate their regulatory activity. In addition, control anti-CD8 α -treated recipients quickly rejected their

Table I. Primers used in this study

Gene	Primer	Sequence
<i>HO-1</i>	Forward	5'-CCACAGCTCGACAGCATGTC-3'
	Reverse	5'-GTTTCGCTCTATCTCCTCTTCCA-3'
<i>PirB</i>	Forward	5'-AAGCAGGGATAGAGACCAGCA-3'
	Reverse	5'-GCCTGGAGGGTTTACTTGG-3'
<i>Tmem176b</i>	Forward	5'-CGGAACCTCCAGGTCTTGAA-3'
	Reverse	5'-GATCAGTCGCTTCTCCCTG-3'
<i>IL-6</i>	Forward	5'-CAAAGCCAGAGTCATTGAGAGC-3'
	Reverse	5'-GGTCTTTAGCCACTCTTCTGT-3'
<i>Arginase 1</i>	Forward	5'-CCAACTCTTGGGAAGACACCA-3'
	Reverse	5'-GTGATGCCCCAGATGACTTT-3'
<i>IL-10</i>	Forward	5'-TGCTATGTTGCCTGCTTACTG-3'
	Reverse	5'-TCAATGCTCCTTGATTCTGG-3'
<i>iNOS</i>	Forward	5'-GACCAACTGTGTGCTTGA-3'
	Reverse	5'-TACTCTGAGGGCTGACACAAGG-3'
<i>CD14</i>	Forward	5'-CAACAGGCTGGATAGGAACCT-3'
	Reverse	5'-TGACTACGCAGAGTTATACGC-3'
<i>CD16</i>	Forward	5'-GTGAACCTAGACCTGAATGGG-3'
	Reverse	5'-CACTGTCTTAACTCTGGCACT-3'
<i>CD86</i>	Forward	5'-ACAGCAAAAGACCCACGG-3'
	Reverse	5'-CTGTTCATTCTGAGCCTCCTC-3'
<i>CD23</i>	Forward	5'-TCCTTCTATGGCACTGGGAAAC-3'
	Reverse	5'-TTGTGACATCTGAAGACCTGG-3'
<i>CD32</i>	Forward	5'-TGCTCTCAGGACTTTGTACC-3'
	Reverse	5'-GGAGTAGCAGCCAGTCAGAAAT-3'
<i>TNF-α</i>	Forward	5'-CTTATCTACTCCAGGTCTCTTCAA-3'
	Reverse	5'-GAGACTCCTCCAGGTACATGG-3'
<i>Foxp3</i>	Forward	5'-CCCAGGAAAGACAGCAACCTT-3'
	Reverse	5'-CTGCTTGGCAGTGCTTGAGAA-3'
<i>TGF-β</i>	Forward	5'-CTCAACACCTGCACAGCTCC-3'
	Reverse	5'-ACGATCATGTTGGACAACCTGCT-3'

allograft in a similar manner than untreated recipients, demonstrating that anti-CD8α treatment alone cannot induce regulatory cells (Fig. 1A). Importantly, although we could not exclude a role for deletion of CD8α⁺ effector T cells, we observe no modification of absolute number and percentages of other immune populations in spleen and blood over the course of the treatment (Supplemental Fig. 2). To address the potential generation of regulatory cells, we performed adoptive cell transfer of total splenocyte populations from day 120 long-term surviving CD8α-depleted recipients, as we have done previously (13). Surprisingly, we observed that adoptive cell transfer of total splenocytes from CD8α-depleted recipients resulted in indefinite allograft survival in 70% of the irradiated grafted recipients (Fig. 1B) contrary to controls transferred with naive splenocytes. This allograft survival could be serially transferred because adoptive transfer of splenocytes from long-term surviving first-transferred recipients to newly secondary grafted irradiated recipients also resulted in indefinite allograft survival (Fig. 1B). To determine how much of the adoptive transfer effect was due to the leucopenic state of the recipients, we adoptively transferred splenocytes from CD40Ig-treated or CD8α-depleted CD40Ig-treated recipients into grafted nonirradiated recipients (Fig. 1B). We observed that adoptive transfer to a nonirradiated recipient resulted in allograft rejection. These results suggested that dominant regulatory cells, which were not present before, arose following CD8⁺CD45RC^{low} Tregs depletion and that the leucopenic state of the recipient is essential for the adoptive transfer effect.

To identify the regulatory population, we sorted T, NK, B cells, and MCs from the spleen of CD8α-depleted recipients (7, 13, 16) and performed adoptive cell transfer of individual populations into irradiated grafted recipients (Fig. 1C). We observed that adoptive transfer of NK cells and TCR⁺ cells lacking CD8⁺ cells (>97.5% of CD4⁺ cells) resulted in rapid allograft rejection, demonstrating that CD4⁺ Tregs could not compensate the absence of CD8⁺ Tregs in our model. Interestingly, we observed that B cells and MCs from

CD8α-depleted recipients were both able to induce indefinite allograft survival in ~30% of the recipients (Fig. 1C), suggesting that both regulatory populations were involved in the long-term survival of CD8α-depleted recipients. Given that we showed an absence of regulatory activity of those populations in CD40Ig-treated recipients [only adoptive transfer of CD8⁺ T cells could induce allograft survival in newly grafted irradiated recipients while adoptive transfer of non-CD8 cells (labeled CD8⁺ depleted) or non-T cells (labeled T cell depleted) resulted in allograft rejection (13)], these results suggested that both populations acquired regulatory function upon CD8⁺ Treg depletion. To determine the Ag specificity of B cells and MCs from CD8α-depleted CD40Ig-treated recipients, we performed adoptive transfer experiment of sorted B cells and MCs in secondary irradiated recipients grafted with a third-party (BN) graft (Fig. 1C). Interestingly, we observed that both B cells and MCs from anti-CD8α CD40Ig-treated recipients could not inhibit allograft rejection in third-party grafted recipients, suggesting that the graft-protective effect is Ag specific.

Given their regulatory potential in vivo, B cells and MCs will be referred as Bregs and RegMCs in the rest of this article.

Long-term surviving recipients displayed increased Bregs and RegMCs in the spleen, increased regulatory molecules in the graft, and cytotoxic antiallogeneic responses

Further phenotypic analysis of long-surviving CD8α-depleted recipients revealed that percentages of T, CD4⁺, DCs, and NK⁺ cells in spleen of CD8α-depleted CD40Ig-treated recipients were comparable to controls (Supplemental Fig. 2B), whereas percentage of B cells was significantly increased compared with naive or control CD40Ig+irr. mAb-treated recipients (Fig. 2A). Percentage of MCs was significantly increased compared with naive, and we observed a trend for an increase compared with control CD40Ig+irr. mAb-treated recipients (Fig. 2A). In addition, we observed no modification in absolute numbers of other splenic populations from anti-CD8α

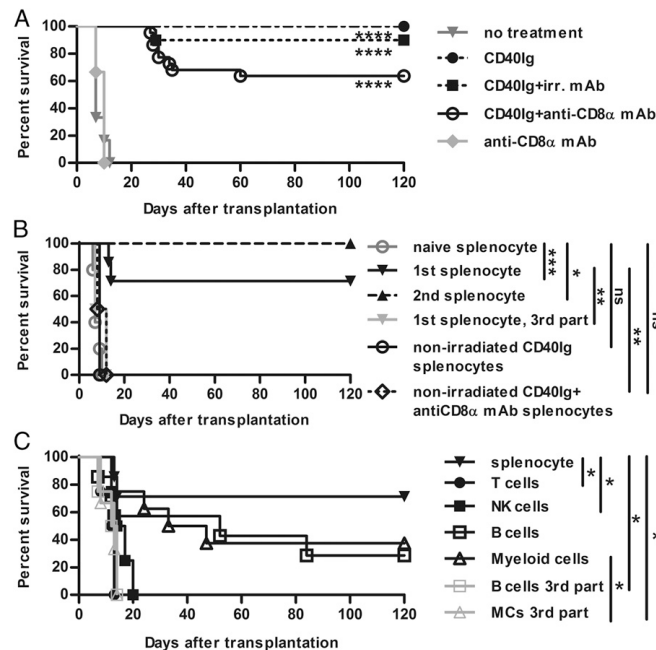


FIGURE 1. Emergent Bregs and RegMCs maintain allograft acceptance following CD8⁺ Tregs depletion. **(A)** Recipients of heart allograft were either untreated ($n = 6$) or treated with AdCD40lg alone (CD40lg, $n = 30$) or CD40lg in combination with an irrelevant Ab as control (CD40lg+irr. mAb, $n = 10$) or CD40lg in combination with an anti-CD8α depleting Ab (CD40lg+anti-CD8α mAb, $n = 22$) or treated with anti-CD8α mAb alone ($n = 3$). **** $p < 0.0001$ compared with untreated rats. **(B)** LEW.1A recipients were sublethally irradiated, grafted with allogeneic LEW.1W heart and i.v. injected with 10^8 splenocytes from naive rats ($n = 5$) or from long-surviving CD8α-depleted CD40lg-treated recipients (first splenocyte transfer, $n = 7$). Splenocytes from long-surviving first splenocyte-transferred recipients were i.v. injected to newly irradiated grafted recipients (second splenocyte transfer, $n = 3$). Splenocytes from long-surviving CD8α-depleted CD40lg-treated recipients were also transferred into irradiated recipients grafted with a third-party donor heart (first splenocytes transfer third party, $n = 2$), or into nonirradiated recipients grafted with LEW.1W heart (nonirradiated CD40lg+anti-CD8α mAb spl transfer, $n = 2$) versus splenocytes from long-surviving CD40lg-treated rats (non-irradiated CD40lg spl transfer, $n = 3$). **(C)** T cells ($n = 4$), NK cells ($n = 6$), B cells ($n = 7$), and MCs ($n = 8$) were sorted from spleen of long-surviving CD40lg+anti-CD8α mAb-treated rats by gating on TCR⁺ cells, TCR-CD161^{high}, CD45RA⁺ cells, and CD11b/c⁺ cells, respectively, and transferred to sublethally irradiated recipients grafted with LEW.1W or third-party BN donor the day before the graft. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

or irr. mAb-treated CD40lg-treated recipients demonstrating that the increase in percentage did not result from a decrease in splenocyte subsets (Supplemental Fig. 2B). This suggested that B cells and MCs homeostasis was affected by the CD8α depletion in contrast to other splenic populations.

To investigate the impact of Bregs and RegMCs emergence on molecules expressed by the tolerated allograft, we analyzed by quantitative PCR (qPCR) at day 120 a panel of regulatory molecules that have been described as important in the maintenance of the long-term survival (Fig. 2B) (13, 23). Interestingly, we observed a significant increased expression of IL-6 and IL-10, two cytokines that have been linked with Bregs and RegMCs (24, 25), in CD8α-depleted recipients compared with controls. We also observed a significant increase in PirB, Tmem176b, and heme oxygenase-1 (HO-1) expression, and several tolerogenic molecules that are important for the maintenance of tolerance in the graft (23, 26–28). We also observed a significant upregulation of Foxp3 following CD8α depletion suggesting the presence of regulatory cells in the graft, possibly RegMCs (29). Finally, we observed no differences in expression of perforin, IL-2, TGF-β, and CTLA-4 (data not shown). Altogether, this different mRNA expression pattern emphasizes the involvement of different

populations of regulatory cells in tolerance induction (i.e., CD8⁺ Tregs in CD40lg+irr. mAb versus Bregs and RegMCs in CD40lg + anti-CD8α mAb) and suggests their migration to the graft.

To explore the potential increase in antiallogeneic effector mechanisms in the CD8α-depleted CD40lg-treated recipients, possibly through Bregs and RegMCs, as such killer activity has been described for both in the literature (30, 31), we analyzed the cytotoxic activity of splenocytes 120 d after transplantation toward ⁵¹Cr-labeled syngeneic, allogeneic, or third-party Con A blasts. Noncoding control Add1324-treated animals that had rejected their grafts displayed significant donor-specific anti-LEW.1W CTL activity (Fig. 2C) and, as already described (22), recipients treated with CD40lg with or without the irrelevant mAb showed significantly reduced CTL activity compared with Add1324-treated recipients (18.3% of specific lysis $\pm$ 1.4 versus 8.9 ± 0.9 and 7.8 ± 1.6 , respectively; $p < 0.01$). Surprisingly, splenocytes from CD8α-depleted CD40lg-treated recipients displayed significant anti-donor CTL activity comparable with that of Add1324-treated control animals (17.6 ± 4.2 versus 18.3 ± 1.4) (Fig. 2C), suggesting the emergence of a CD8⁺ cell population with antidonor cytotoxic activity. Anti-third-party BN CTL responses were <5% (data not shown).

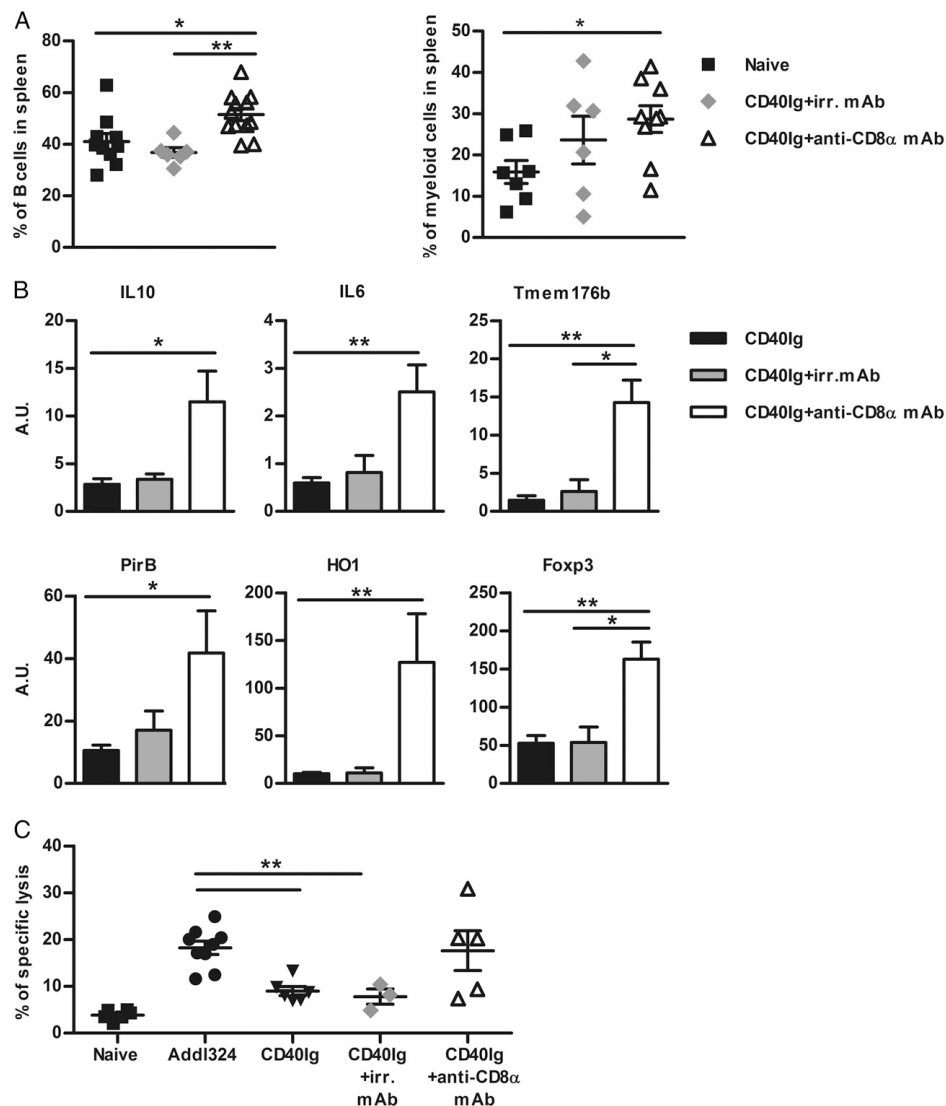


FIGURE 2. Emergence of new regulatory cells correlates with phenotype and genes modification as well as antidonor cytotoxic responses. **(A)** B cells (CD45RA⁺ cells) and MCs (CD11b/c⁺ cells) were quantified by flow cytometry in spleen of either naive ($n = 7$) or long-surviving recipients treated with CD40Ig+anti-CD8α mAb ($n = 9$) or CD40Ig+irr. mAb ($n = 6$). **(B)** Grafts from long-surviving recipients treated with CD40Ig ± anti-CD8α (CD40Ig, $n = 9$; CD40Ig+anti-CD8α mAb, $n = 4$) or irrelevant mAbs ($n = 3-4$) were analyzed by qPCR for genes expression. **(C)** Antidonor cytotoxic responses of splenocytes from naive ($n = 6$), control Ad (Addl324, $n = 9$), CD40Ig ($n = 6$), CD40Ig+irr. ($n = 3$), or anti-CD8α ($n = 5$) mAbs-treated recipients were evaluated. Splenocytes were isolated and used directly as effector cells. ⁵¹Cr (100 μCi for 1 h at 37°C)-labeled LEW.1W splenic Con A blasts were used as target cells. The effector and target cells were plated for 6 h, and the percentage of specific lysis was calculated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Immature CD24⁺CD5⁺CD27⁻ Bregs emerged following CD8⁺ Treg depletion

To further characterize the phenotype of Bregs that emerged following CD8⁺ Treg depletion, we analyzed by flow cytometry Bregs in our model according to their expression of different

markers as defined in the literature (32). We compared activation status of B cells from the spleen of naive, CD40Ig with irrelevant or anti-CD8α mAb-treated recipients using coexpression of the IgM and IgD markers (Fig. 3A) as well as the expression of CD24, CD5, CD27, IL-10, MHC class II, and FcγRIIB markers (Fig. 3B;

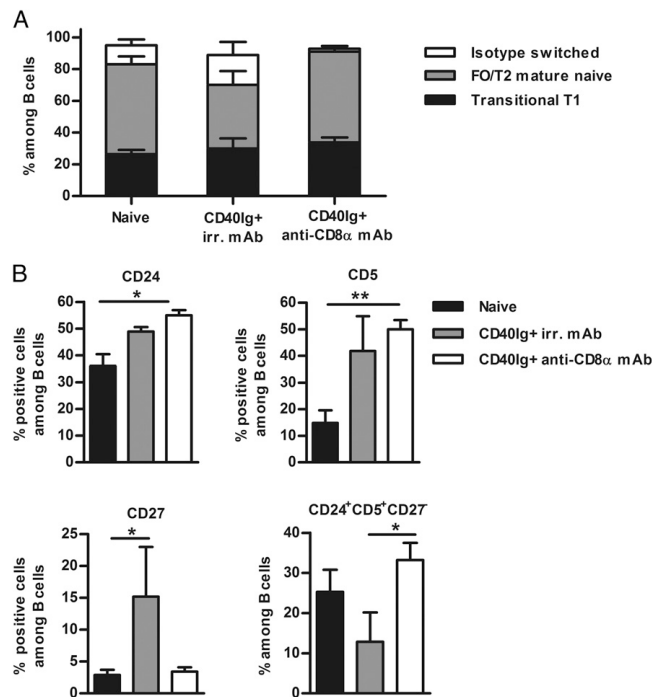


FIGURE 3. Phenotypic characterization of B cells from long-surviving recipients. B cells from spleen of naive ($n = 10$), long-surviving CD40Ig+ irr. mAb ($n = 3$), or anti-CD8 α mAb ($n = 6$) treated recipients were harvested 120 d after the graft and defined as transitional T1 ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$), follicular/transitional T2 mature naive ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{high}}$), and isotype-switched ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{low}}$) B cells (**A**) and analyzed for CD24, CD5, and CD27 marker expression (**B**) by flow cytometry. Results are expressed as percentage of positive cells among splenic B cells (CD45RA⁺ cells). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

data not shown). We observed in the spleen of CD8 α -depleted CD40Ig-treated recipients slightly more transitional type 1 (T1) ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{low}}$) or follicular/T2 ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{IgD}^{\text{high}}$) and less isotype switched B cells ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{IgD}^{\text{low}}$) than in naive or CD40Ig+irr. mAb-treated recipients (Fig. 3A). Interestingly, we observed that B cells from CD8 α -depleted CD40Ig-treated recipients expressed high levels of the early lineage markers CD5 and CD24 ($p < 0.05$ compared with naive B cells) and low level of the memory marker CD27 ($p < 0.01$ compared with CD40Ig+irr. mAb-treated recipients) (Fig. 3B). In addition, analysis of the coexpression of the three markers CD24, CD5, and CD27 demonstrated a significant increase in CD24⁺CD5⁺CD27⁺ Bregs, therefore demonstrating that in the CD8 α -depleted CD40Ig-treated recipients there is an induction of CD24⁺CD5⁺CD27⁺ B cells. However, we observed no significant difference for IL-10, MHC class II, and Fc γ RIIb expression between the different groups (data not shown).

Altogether, these results suggest an induction of more immature CD24⁺CD5⁺CD27⁺ Bregs following CD8⁺ Treg depletion.

Bregs display superior suppressive potential and Bregs are not required to inhibit allograft rejection

Because we could not further phenotype MCs using Abs because of the lack of available reagents in rat, we performed qPCR of genes described in the literature as being expressed by MCs (11) on FACSARIA-sorted MCs from spleen of naive and long-term RegMC-transferred recipients (Fig. 4). We observed a trend for an increased expression of CD16 and TNF- α in MCs from RegMC-transferred recipients compared with MCs from naive recipients, whereas IL-1, IL-6, iNOS, Tmem176b, and CD23 were decreased. We observed no differences in expression of IL-10, CD14, CD32, CD86, PirB, Arginase-1, TGF- β , Foxp3, and HO-1.

To further determine the requirement of Bregs versus RegMCs in allograft survival following CD8 α depletion, we treated LEW.1A Wild-type (WT) or IgM-knockout rats (IgM-KO) characterized by an absence of peripheral B cells (7, 33) with CD40Ig+anti-CD8 α mAb and grafted them with a LEW.1W heart (Fig. 5A). We observed that the allograft of IgM-KO rats treated with CD40Ig+anti-CD8 α mAb survived indefinitely compared with untreated grafted IgM-KO rats and with no differences compared with WT rats treated with CD40Ig+anti-CD8 α , suggesting that although Bregs with a tolerogenic potential emerged following CD8⁺ Treg depletion, they were not necessary to maintain the long-term allograft survival in presence of CD40Ig and RegMCs. To demonstrate the crucial role of macrophages, we depleted MCs using clodronate liposomes, as demonstrated by others (34). Unfortunately, we observed that control grafted LEW.1A recipients treated with clodronate liposomes alone tolerated their allograft long term (data not shown), preventing any conclusion on such experiment as macrophage depletion on itself inhibits allograft rejection.

To further assess the regulatory potential of Bregs and RegMCs in our model, we tested them ex vivo in a suppressive assay in presence of CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ syngeneic effector T cells and allogeneic or third-party APCs as we have done previously (14). Regulatory populations from naive, CD40Ig+irr. mAb or CD40Ig+anti-CD8 α mAb-treated recipients were added at different effector: suppressor ratios and the inhibition of effector T cell proliferation (CFSE dilution) was assessed 6 d later (Fig. 5B, 5C). Interestingly, we observed that RegMCs from CD40Ig+anti-CD8 α mAb-treated recipients displayed higher suppressive capacity on antidonor immune response for all ratios tested compared with control RegMCs from naive recipients or

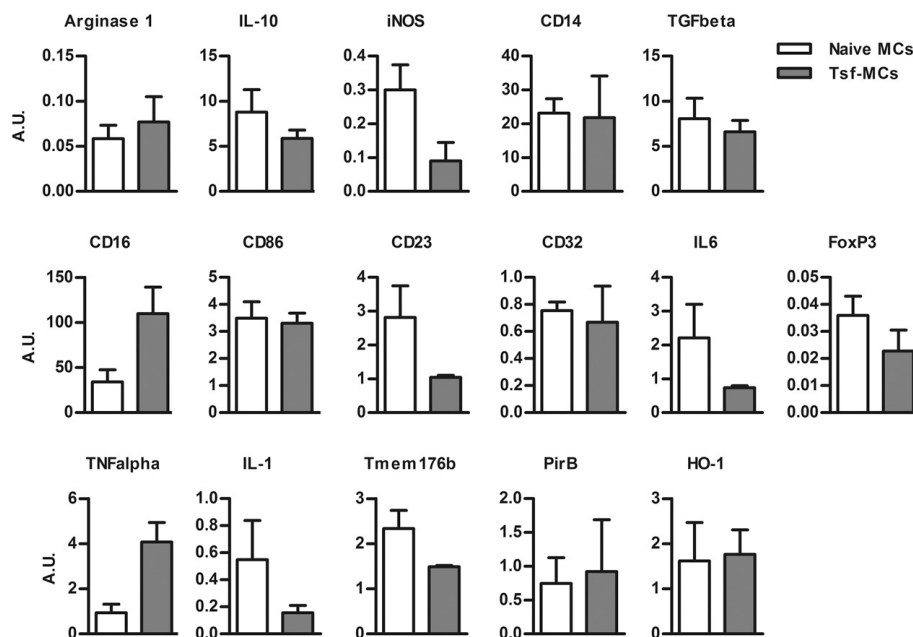


FIGURE 4. Myeloid cells characterization in adoptively transferred recipients. Expression of genes associated to myeloid lineage was analyzed by qPCR on MCs sorted from spleen of either naive ($n = 3$) or long-surviving RegMCs adoptively transferred recipients ($n = 2$) by gating on CD11b/c⁺ live cells.

CD40lg+irr. mAb-treated recipients (Fig. 5B). In contrast, we observed that Bregs from either naive, CD40lg+irr. mAb or CD40lg+anti-CD8 α mAb-treated recipients showed a low and comparable suppressive capacity (Fig. 5C). These results suggest that RegMCs acquired increased suppressive activity in absence of CD8⁺ Tregs whereas Bregs did not. In addition, we observed no suppressive activity of MCs from anti-CD8 α CD40lg-treated recipients toward third-party Ags, emphasizing the Ag specificity of the MCs (Fig. 5B, 5C).

We next analyzed the suppressive capacity of MCs and B cells from adoptively transferred recipients that received respectively RegMCs and Bregs from long-term CD8 α -depleted CD40lg-treated recipients in presence of CFSE-labeled CD4⁺CD25[−] syngeneic effector T cells and allogeneic APCs. Interestingly, we observed that MCs from long-term RegMC-transferred recipients showed significantly increased suppressive capacity compared with naive MCs (Fig. 5D), suggesting that RegMCs that were adoptively transferred either survived long-term or induced new RegMCs with increased suppressive potential. On the contrary, B cells from long-term recipients that were adoptively transferred with Bregs from CD40lg+anti-CD8 α mAb-treated recipients did not demonstrated any suppressive activity on CFSE-labeled CD4⁺CD25[−] syngeneic effector T cells (Fig. 5E), suggesting that the long-term survival achieved with adoptively transferred Bregs was probably dependent on other cell subsets.

Decreased alloimmune cellular and humoral responses following Bregs or RegMCs adoptive transfer

To further understand the effect of adoptively transferred Bregs and RegMCs on the allogeneic responses, we first measured ex vivo the proliferative capacity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from Breg-transferred or RegMC-transferred recipients compared with naive

CD8⁺ and CD4⁺ T cells in presence of allogeneic APCs for 6 d (Fig. 6A, 6B). Interestingly, we observed a significant dose-dependent decreased capacity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from adoptively transferred recipients to proliferate in presence of allogeneic APCs in comparison with naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We also noticed a stronger effect on the proliferative capacity of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in RegMC-transferred recipients than in Breg-transferred recipients, suggesting that RegMCs are more efficient at controlling the allogeneic cellular immune response.

Furthermore, we analyzed the alloantibody production in the serum of long-surviving d120 Breg- or RegMC-transferred recipients in comparison with naive or untreated recipients that had rejected their graft early (Fig. 6C). We observed very low IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b alloantibodies production equivalent in both Breg- and RegMC-transferred recipients compared with controls. Altogether, these results demonstrated the efficacy of Bregs and RegMCs at controlling the antidonor immune responses.

Establishment of long-term graft survival following Bregs, but not RegMCs, transfer is associated with increased suppressive activity of other cell subsets

Finally, to understand the contribution of other regulatory populations in the long-term survival obtained following RegMCs or Bregs adoptive transfer, we analyzed ex vivo the suppressive activity of CD8⁺ Tregs, CD4⁺ Tregs, and MCs or B cells from long-term surviving recipients in presence of allogeneic APCs and CFSE-labeled syngeneic CD4⁺CD25[−] effector T cells for 6 d (Fig. 7 and data not shown). Interestingly, in Breg-transferred recipients, we observed a significant dose dependent increase in the suppressive activity of CD8⁺ Tregs and MCs (Fig. 7) but not CD4⁺ Tregs (data not shown). In comparison, in RegMC-transferred recipients, we did not observe any differences in the suppressive

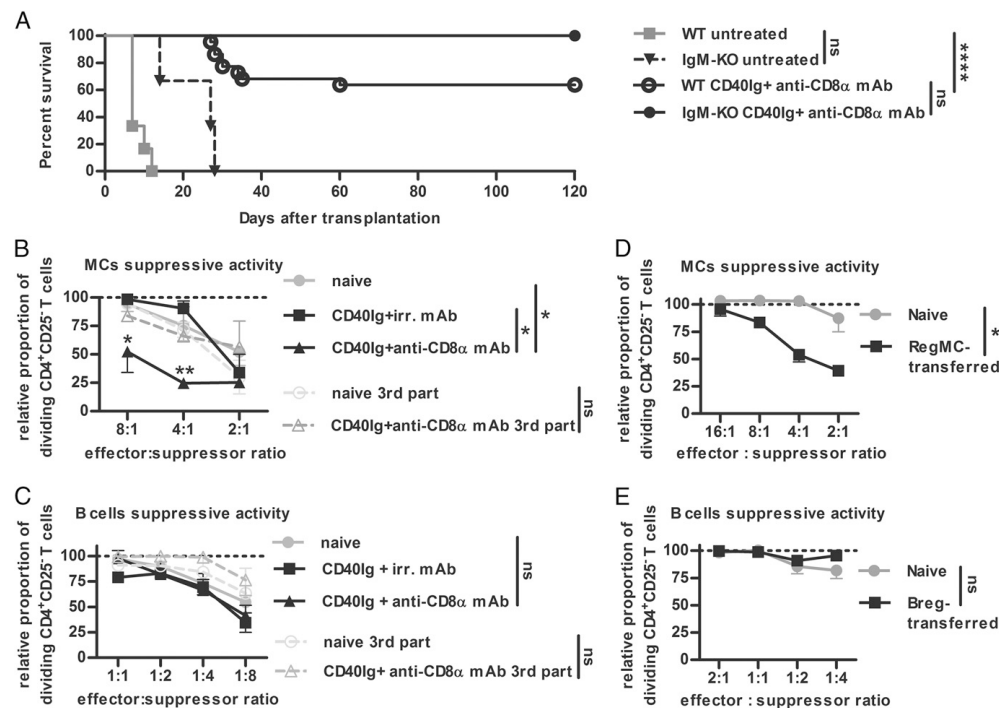


FIGURE 5. RegMCs display superior suppressive potential, and Bregs are not required to inhibit allograft rejection. **(A)** WT or IgM-KO LEW.1A recipients were either untreated ($n = 6$ and 3 , respectively) or treated ($n = 22$ and 2 , respectively) with CD40lg+anti-CD8α mAb, and monitored for graft survival by palpation through the abdominal wall. **(B–E)** Suppressive activity of MCs (**B** and **D**) and B cells (**C** and **E**) from naive ($n = 4$), CD40lg+anti-CD8α mAb ($n = 2$) and CD40lg+irr. mAb ($n = 2$)-treated (**B** and **C**) or from RegMC- (**D**, $n = 3$) or Breg-transferred (**E**, $n = 2$) long-surviving recipients, was tested on CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ effector T cells proliferation stimulated by allogeneic pDCs from the donor of the graft (LEW.1W) or a third-party (BN) rat, at several effector:suppressor ratios. The proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells in the control condition with pDCs only was given a value of 100 in each experiment. Graphs represent the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

capacity of B cells, CD4⁺ Tregs, and CD8⁺ Tregs compared with controls (data not shown). These results suggested that the long-term maintenance of the graft in Breg-transferred recipients was associated, and possibly supported by CD8⁺ Tregs with modified suppressive capacity and MCs, whereas long-term maintenance of the graft in RegMC-transferred recipients was not, underlying the importance of networks between regulatory cells in transplantation.

Discussion

The recent identification of numerous regulatory populations has suggested that dynamic regulatory networks exist to control immune responses in situations such as transplantation or cancer. The dynamic of these networks is underlined by the fact that, while no other regulatory subsets existed before depletion of a crucial Treg subset involved in transplantation tolerance, rejection occurred in only half of the recipients (13), suggesting the emergence of a new regulatory subset able to control the antidonor immune response. This is of great importance in immune tolerance-inducing treatments as this suggests the existence of collaborative pathways that can be used to manipulate the emergence of regulatory cells. In fact, in a previous attempt to control the immune response to the allograft, we cotreated recipients with CD40lg and an anti-CD28 modulating Ab, and surprisingly observed a shift of the regulation

toward emergence of IDO-dependent non-T regulatory cells (18). In this model, although we observed a true tolerance, this tolerance to the allograft could not be transferred to secondary recipients, suggesting that the IDO-dependent non-T regulatory cells were less powerful than the CD8⁺CD45RC^{low} Tregs but also that by manipulating the costimulatory CD28/B7 pathway, we had influenced the generation of regulatory cells. The use of regulatory cells as a therapeutic in transplantation is one of the current major challenge and aims at developing more specific and efficient targeted strategies (1, 35, 36). A better understanding of such pathways could provide basis for combined cellular immunotherapies (5). Our studies also provide a beware signal on emergence of less efficient regulatory populations.

In the present paper, we unraveled the regulatory mechanisms that took place following CD8⁺ Tregs depletion, enabling long-term allograft survival, transferrable in a dominant fashion to secondary grafted recipients. In this study, we identified immature Bregs and RegMCs (probably macrophages given that they represent the majority of CD11b/c⁺MCs) as being responsible equally of the control of anti-donor immune responses, leading to indefinite allograft survival in 30% of the recipients. CD40L is expressed by T cells, but also by B cells, macrophages and DCs (37) and it is possible that by blocking the CD40-CD40L costimulatory pathway with CD40lg, we interfere with the effector

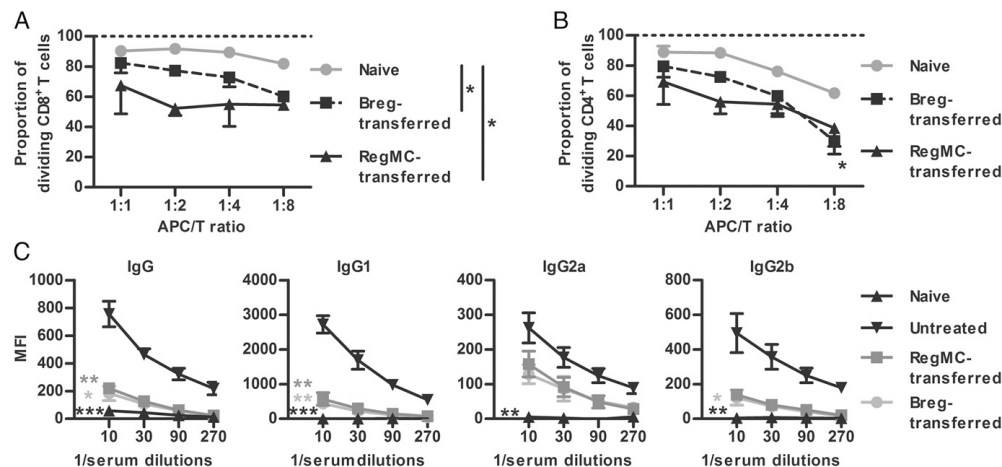


FIGURE 6. Decreased T cells alloreactivity and alloantibody responses after RegMC and Breg transfer. CD8⁺ T cells (**A**) and CD4⁺ T cells (**B**) from naive ($n = 2$), long-surviving recipients transferred with Bregs ($n = 2$) or RegMCs ($n = 2$) were sorted by FACSaria, CFSE-labeled and tested for their proliferative response to allogeneic APCs (pDCs) under decreasing T:APC ratios. Graphs represent the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells. * $p < 0.05$ versus naive. (**C**) Presence of donor-specific IgG and IgG1, IgG2a, and IgG2b subtypes alloantibodies was quantified by FACS in serum of naive ($n = 3$), grafted untreated ($n = 3$), RegMC- ($n = 3$), and Breg- ($n = 2$)-transferred long-surviving recipients. Sera were harvested directly after rejection or 120 d after transplantation. Graphs represent MFI $\pm$ SEM analyzed on total living splenocytes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus untreated recipients.

function of B cells and MCs (38) and modulate their activity toward tolerogenic regulation of effector responses. Although we did not observe a potentiated role for CD4⁺CD25⁺ Tregs in in-

hibition of acute allograft rejection when adoptively transferred to newly grafted irradiated recipients, CD4⁺CD25⁺ Tregs remain suppressive. Despite the fact that we could not specifically deplete CD4⁺ Tregs in absence of specific tools in rats, we believe that they play an important role in supporting the function of Bregs and RegMCs. Although Bregs and RegMCs have already been described as involved in transplantation tolerance (3, 5, 11, 12, 39), their possible synergistic and equal involvement in inhibition of antidonor immune responses had never been described. As for CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, we believe that Bregs and RegMCs emerge at early time point in presence of Ags (14). These cells sustain a long-term potent activity in presence of anti-CD8 α treatment and low CD40lg levels, which might not be reversed by modification of the treatment. Phenotypic analysis of Bregs revealed a significant expression of the CD24⁺ and CD5⁺ markers, an absence of expression of the memory CD27 marker, as well as a decreased isotype switched population, altogether suggesting the presence of an immature population of Bregs in the spleen of long-surviving recipients following CD8 α depletion. Phenotypic analysis of RegMCs did not revealed significant modification of gene expression, although we detected a slight increase in expression of CD16 and TNF- α , as well as a decreased expression of CD23 and iNOS. Description of a clear phenotype for Bregs and RegMCs in the literature is still very controversial (40–43), and we and other believe that the situation and model in which those cells were identified are crucial to determine the phenotype (41). In addition, in rat, there is very little description of those cells (3, 44). In this study, we did not intend to fully characterize Bregs and RegMCs, but rather understand their signature, their contribution to alloresponses control and possible mechanisms of action. Indeed, following depletion of CD8⁺ Tregs, the development of such regulatory populations was associated with the emergence of cytotoxic antidonor immune responses, that correlated with described killer activity of Bregs and RegMCs (30, 31), and with decreased cellular and humoral immune responses, particularly

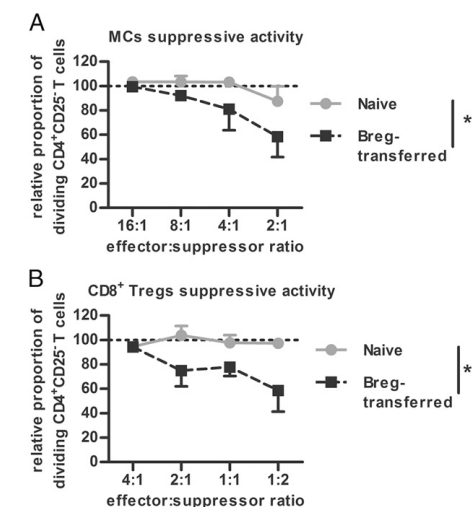


FIGURE 7. Increased suppressive activity of MCs and CD8⁺ Tregs following Bregs adoptive transfer. MCs (**A**) and CD8⁺ Tregs (**B**) from naive ($n = 2$) or long-surviving Breg-transferred ($n = 2$) recipients were sorted and tested for their suppressive activity on CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ T cells proliferative response to allogeneic pDCs. The proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells in the control condition with pDCs only was given a value of 100 in each experiment. Graphs represent the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells. * $p < 0.05$.

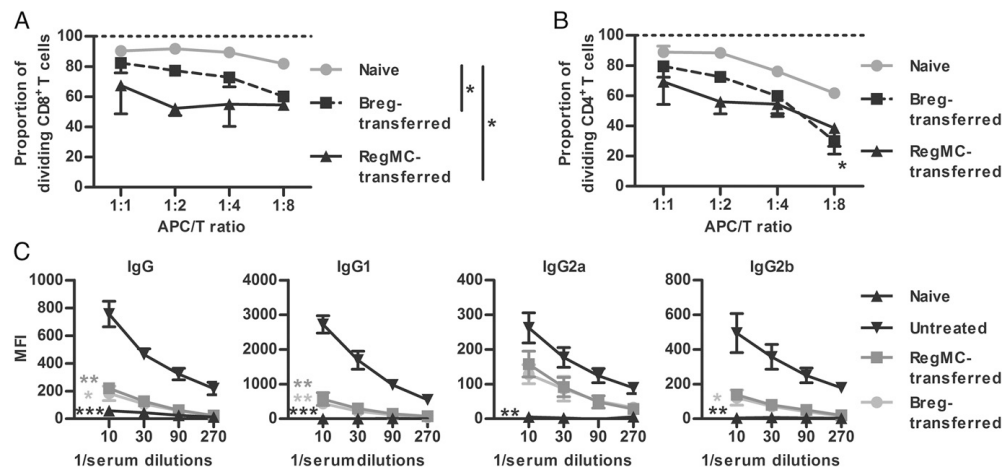


FIGURE 6. Decreased T cells alloreactivity and alloantibody responses after RegMC and Breg transfer. CD8⁺ T cells (**A**) and CD4⁺ T cells (**B**) from naive ($n = 2$), long-surviving recipients transferred with Bregs ($n = 2$) or RegMCs ($n = 2$) were sorted by FACSaria, CFSE-labeled and tested for their proliferative response to allogeneic APCs (pDCs) under decreasing T:APC ratios. Graphs represent the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells. * $p < 0.05$ versus naive. (**C**) Presence of donor-specific IgG and IgG1, IgG2a, and IgG2b subtypes alloantibodies was quantified by FACS in serum of naive ($n = 3$), grafted untreated ($n = 3$), RegMC- ($n = 3$), and Breg- ($n = 2$)-transferred long-surviving recipients. Sera were harvested directly after rejection or 120 d after transplantation. Graphs represent MFI $\pm$ SEM analyzed on total living splenocytes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus untreated recipients.

function of B cells and MCs (38) and modulate their activity toward tolerogenic regulation of effector responses. Although we did not observe a potentiated role for CD4⁺CD25⁺ Tregs in in-

hibition of acute allograft rejection when adoptively transferred to newly grafted irradiated recipients, CD4⁺CD25⁺ Tregs remain suppressive. Despite the fact that we could not specifically deplete CD4⁺ Tregs in absence of specific tools in rats, we believe that they play an important role in supporting the function of Bregs and RegMCs. Although Bregs and RegMCs have already been described as involved in transplantation tolerance (3, 5, 11, 12, 39), their possible synergistic and equal involvement in inhibition of antidonor immune responses had never been described. As for CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, we believe that Bregs and RegMCs emerge at early time point in presence of Ags (14). These cells sustain a long-term potent activity in presence of anti-CD8 α treatment and low CD40lg levels, which might not be reversed by modification of the treatment. Phenotypic analysis of Bregs revealed a significant expression of the CD24⁺ and CD5⁺ markers, an absence of expression of the memory CD27 marker, as well as a decreased isotype switched population, altogether suggesting the presence of an immature population of Bregs in the spleen of long-surviving recipients following CD8 α depletion. Phenotypic analysis of RegMCs did not revealed significant modification of gene expression, although we detected a slight increase in expression of CD16 and TNF- α , as well as a decreased expression of CD23 and iNOS. Description of a clear phenotype for Bregs and RegMCs in the literature is still very controversial (40–43), and we and other believe that the situation and model in which those cells were identified are crucial to determine the phenotype (41). In addition, in rat, there is very little description of those cells (3, 44). In this study, we did not intend to fully characterize Bregs and RegMCs, but rather understand their signature, their contribution to alloresponses control and possible mechanisms of action. Indeed, following depletion of CD8⁺ Tregs, the development of such regulatory populations was associated with the emergence of cytotoxic antidonor immune responses, that correlated with described killer activity of Bregs and RegMCs (30, 31), and with decreased cellular and humoral immune responses, particularly

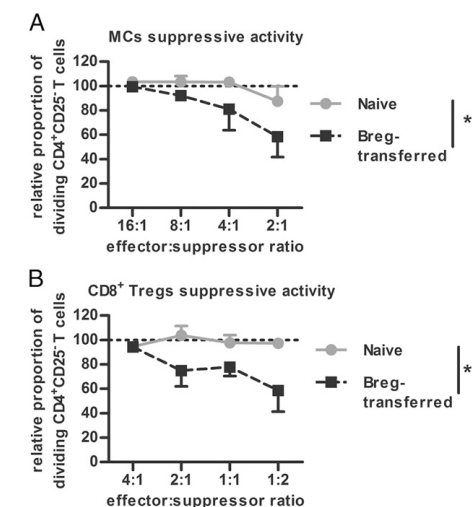


FIGURE 7. Increased suppressive activity of MCs and CD8⁺ Tregs following Bregs adoptive transfer. MCs (**A**) and CD8⁺ Tregs (**B**) from naive ($n = 2$) or long-surviving Breg-transferred ($n = 2$) recipients were sorted and tested for their suppressive activity on CFSE-labeled CD4⁺CD25⁺ T cells proliferative response to allogeneic pDCs. The proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells in the control condition with pDCs only was given a value of 100 in each experiment. Graphs represent the mean $\pm$ SEM of the relative proportion of dividing CD4⁺CD25⁺ T cells. * $p < 0.05$.

evident for RegMCs. In addition, we described a strong induction of immunosuppressive molecules in the graft, such as IL-10 or even Foxp3, correlating also with described Bregs and RegMCs characteristics (11, 29, 42), and suggesting homing of new regulatory cells to the graft. Although we identified Bregs as being involved in allograft survival, treatment with CD40lg and depletion of CD8⁺ cells in B cell-deficient rats resulted in identical allograft survival compared with WT rats, suggesting that in absence of B cells, RegMCs were potent enough to inhibit allograft rejection. This was confirmed by ex vivo suppressive assay using Bregs or RegMCs, where RegMCs demonstrated a superior suppressive capacity than Bregs. In an attempt to demonstrate the crucial role of macrophages, we depleted MCs using clodronate liposomes, as demonstrated by others (34). Unfortunately, we observed that control grafted LEW.1A recipients treated with clodronate liposomes alone tolerated their allograft long-term (data not shown), preventing any conclusion on such experiment as macrophage depletion on itself inhibits allograft rejection. As we observed that Bregs were less efficient than RegMCs, we investigated the regulatory potential of the other regulatory cell subsets in adoptively transferred long-term surviving recipients. We speculated that Bregs and RegMCs might modify/induce regulatory potential of other cell subsets. We observed that both MCs and CD8⁺CD45RC^{low} Tregs were more suppressive in Breg-transferred recipients, whereas the regulatory potential of various cell subsets was not affected in RegMC-transferred recipients. This induction was correlated with the initial regulatory activity of Bregs (versus RegMCs) and emphasizes the dynamic regulatory networks activity.

In conclusion, in this paper, we have demonstrated the dynamic of the regulatory cell subsets and showed that in absence of CD8⁺CD45RC^{low} Tregs, other regulatory subsets identified in this paper as Bregs and RegMCs emerged to inhibit antidonor immune responses and induced indefinite allograft survival. Importantly, these new regulatory subsets were capable of inducing dominant tolerance to adoptively transferred recipients, and modified other regulatory cells activity. Altogether, this study highlights the importance of a better understanding of emergence of synergistic regulatory cells to control immune responses in situations such as transplantation or cancer.

Acknowledgments

We thank Emmanuel Mérieau and Claire Usal for technical assistance in animal models; Séverine Ménoret for providing the IgM-deficient rats (Transgenesis Rat and Immunophenomic Platform-Nantes); the Vector Core of the University Hospital of Nantes, which is supported by the Association Française Contre les Myopathies, for producing the adenoviral vectors; and the Crédit Agricole for the donation of the FACS Aria.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Guillonnet, C., E. Picarda, and I. Anegon. 2010. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15: 751–756.
- Vitale, G., F. Mion, and C. Pucillo. 2010. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Mol. Immunol.* 48: 1–8.
- Le Texier, L., P. Thebault, A. Lavault, C. Usal, E. Mérieau, 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.
- Pallier, A., S. Hillon, R. Danger, M. Giral, M. Racapé, N. Degaue, E. Dugast, J. Ashton-Chess, S. Pettré, J. J. Lozano, 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 Int.* 78: 503–513.
- Lee, K. M., R. T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M. M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, et al. 2014. TGF- β -producing regulatory

- B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 44: 1728–1736.
- Chesneau, M., A. Pallier, F. Braza, G. Lacombe, S. Le Gallou, D. Baron, M. Giral, R. Danger, P. Guerif, H. Aubert-Wastiaux, et al. 2014. Unique B cell differentiation profile in tolerant kidney transplant patients. *Am. J. Transplant.* 14: 144–155.
- Bézie, S., E. Picarda, L. Tesson, K. Renaudin, J. Durand, S. Ménoret, E. Mérieau, E. Chiffolleau, C. Guillonnet, L. Caron, and I. Anegon. 2015. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS One* 10: e0119686. Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119686>.
- Chesneau, M., L. Michel, E. Dugast, A. Chenouard, D. Baron, A. Pallier, J. Durand, F. Braza, P. Guerif, D. A. Laplaud, et al. 2015. Tolerant kidney transplant patients produce b cells with regulatory properties. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 2588–2598.
- Blair, P. A., L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, and C. Mauri. 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: 129–140.
- Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, et al. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117: 530–541.
- Hutchinson, J. A., P. Riquelme, E. K. Geissler, and F. Fändrich. 2011. Human regulatory macrophages. *Methods Mol. Biol.* 677: 181–192.
- Hutchinson, J. A., P. Riquelme, B. Sawitzki, S. Tomiuk, P. Miqueu, M. Zuhayra, H. H. Oberg, A. Pascher, U. Lützen, U. Janssen, et al. 2011. Cutting edge: immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J. Immunol.* 187: 2072–2078.
- Guillonnet, 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.
- Li, X. L., S. Ménoret, S. Bézie, L. Caron, D. Chabannes, M. Hill, F. Halary, M. Angin, M. Heslan, C. Usal, et al. 2010. Mechanism and localization of CD8⁺ regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J. Immunol.* 185: 823–833.
- Picarda, E., I. Anegon, and C. Guillonnet. 2011. T-cell receptor specificity of CD8⁺ Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 3(4 Suppl.): 35–37.
- Picarda, E., S. Bézie, V. Venturi, K. Echasserieau, E. Mérieau, A. Delhumeau, K. Renaudin, S. Brouard, K. Bernardeau, I. Anegon, and C. Guillonnet. 2014. MHC-derived alloepitope activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J. Clin. Invest.* 124: 2497–2512.
- Picarda, E., J. Ossart, S. Bézie, and C. Guillonnet. 2015. [Key role of alloepitope-specific CD8⁺ Tregs in transplantation]. *Med. Sci. (Paris)* 31: 22–24.
- Guillonnet, C., C. Séveno, A. S. Dugast, X. L. Li, K. Renaudin, F. Haspot, C. Usal, J. Veziers, I. Anegon, and B. Vanhove. 2007. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40lg-treated heart allograft recipients. *J. Immunol.* 179: 8164–8171.
- Ménoret, S., C. Guillonnet, S. Bézie, L. Caron, I. Anegon, and X. L. Li. 2011. Phenotypic and functional characterization of CD8⁺ T regulatory cells. *Methods Mol. Biol.* 677: 63–83.
- Bézie, S., E. Picarda, J. Ossart, L. Tesson, C. Usal, K. Renaudin, I. Anegon, and C. Guillonnet. 2015. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J. Clin. Invest.* 125: 3952–3964.
- Bézie, S., E. Picarda, L. Tesson, K. Renaudin, J. Durand, S. Ménoret, E. Mérieau, E. Chiffolleau, C. Guillonnet, L. Caron, and I. Anegon. 2015. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS One* 10: e0119686.
- Guillot, C., C. Guillonnet, P. Mathieu, C. A. Gerdes, S. Ménoret, C. Braudeau, L. Tesson, K. Renaudin, M. G. Castro, P. R. Löwenstein, and I. Anegon. 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. *J. Immunol.* 168: 1600–1609.
- Liu, J., Z. Liu, P. Witkowski, G. Vlad, J. S. Manavalan, L. Scotto, S. Kim-Schulze, R. Cortesini, M. A. Hardy, and N. Suci-Foca. 2004. Rat CD8⁺FOXP3⁺ T suppressor cells mediate tolerance to allogeneic heart transplants, inducing PIR-B in APC and rendering the graft invulnerable to rejection. *Transpl. Immunol.* 13: 239–247.
- Rosser, E. C., K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, N. A. Carter, K. A. Harris, S. A. Jones, N. Klein, and C. Mauri. 2014. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat. Med.* 20: 1334–1339.
- Chen, M. F., F. C. Kuan, T. C. Yen, M. S. Lu, P. Y. Lin, Y. H. Chung, W. C. Chen, and K. D. Lee. 2014. IL-6-stimulated CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁺ myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncotarget* 5: 8716–8728.
- Imada, M., K. Masuda, R. Satoh, Y. Ito, Y. Goto, T. Matsuoaka, S. Endo, A. Nakamura, H. Kawamoto, and T. Takai. 2009. Ectopically expressed PIR-B on T cells constitutively binds to MHC class I and attenuates T helper type 1 responses. *Int. Immunol.* 21: 1151–1161.
- Segovia, M., C. Louvet, P. Charnet, A. Savina, G. Tilly, L. Gautreau, L. Carretero-Iglesia, G. Berioui, I. Cebrian, T. Cens, et al. 2014. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant.* 14: 1021–1031.
- Simon, T., I. Anegon, and P. Blancou. 2011. Heme oxygenase and carbon monoxide as an immunotherapeutic approach in transplantation and cancer. *Immunotherapy* 3(4 Suppl.): 15–18.
- Leavy, O. 2011. Immune regulation: macrophages join the FOXP3 suppressor gang. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 438.

30. Montandon, R., S. Korniotis, E. Layseca-Espinosa, C. Gras, J. Mégret, S. Ezine, M. Dy, and F. Zavala. 2013. Innate pro-B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: E2199–E2208.
31. Bonardelle, D., K. Benihoud, N. Kiger, and P. Bobé. 2005. B lymphocytes mediate Fas-dependent cytotoxicity in MRL/lpr mice. *J. Leukoc. Biol.* 78: 1052–1059.
32. Mauri, C., and M. R. Ehrenstein. 2008. The “short” history of regulatory B cells. *Trends Immunol.* 29: 34–40.
33. Ménoret, S., A. L. Iscache, L. Tesson, S. Rémy, C. Usal, M. J. Osborn, G. J. Cost, M. Brüggemann, R. Buelow, and I. Anegón. 2010. Characterization of immunoglobulin heavy chain knockout rats. *Eur. J. Immunol.* 40: 2932–2941.
34. Van Rooijen, N., and A. Sanders. 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* 174: 83–93.
35. Leguern, C. 2011. Regulatory T cells for tolerance therapy: revisiting the concept. *Crit. Rev. Immunol.* 31: 189–207.
36. Lombardi, G., P. Sagoo, C. Scotta, H. Fazekasova, L. Smyth, J. Tsang, B. Afzali, and R. Lechler. 2011. Cell therapy to promote transplantation tolerance: a winning strategy? *Immunotherapy* 3(4 Suppl.): 28–31.
37. Li, X. L., S. Ménoret, B. Le Mauff, M. Angin, and I. Anegón. 2008. Promises and obstacles for the blockade of CD40-CD40L interactions in allo-transplantation. *Transplantation* 86: 10–15.
38. van Kooten, C., and J. Banchereau. 1997. Functional role of CD40 and its ligand. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113: 393–399.
39. Nouël, A., Q. Simon, C. Jamin, J. O. Pers, and S. Hillion. 2014. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front. Immunol.* 5: 11.
40. Rey-Giraud, F., M. Hafner, and C. H. Ries. 2012. In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7: e42656.
41. Stolp, J., L. A. Turka, and K. J. Wood. 2014. B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 10: 389–397.
42. Clatworthy, M. R. 2011. Targeting B cells and antibody in transplantation. *Am. J. Transplant.* 11: 1359–1367.
43. Martinez, F. O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6: 13.
44. Xu, L., F. Yang, R. Lin, C. Han, J. Liu, and Z. Ding. 2014. Induction of m2 polarization in primary culture liver macrophages from rats with acute pancreatitis. *PLoS One* 9: e108014.

RÉFÉRENCES

8. Rink JC. Stem cell systems and regeneration in planaria. *Dev Genes Evol* 2013 ; 223 : 67-84.
9. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 17396-401.
10. Joubert PE, Pombo Grégoire I, Meiffren G, et al. Autophagie et pathogènes « Bon appétit Messieurs ! ». *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 41-7.

NOUVELLE

Rôle clé des Treg CD8⁺ spécifiques d'un allopeptide en transplantation

Élodie Picarda, Jason Ossart, Séverine Bézie, Carole Guillonnet

Inserm UMR1064 - centre de recherche en transplantation et immunologie - ITUN, centre hospitalier universitaire de Nantes, faculté de médecine, université de Nantes, 30, boulevard Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. carole.guillonnet@univ-nantes.fr

La transplantation d'organes

À l'heure actuelle, la transplantation d'organe chez l'homme reste la meilleure stratégie thérapeutique en cas de défaillance terminale d'un organe (cœur, foie, rein, poumon, etc.). La prise conjointe de traitements immunosuppresseurs est indispensable pour éviter le rejet du greffon, perçu comme un élément étranger n'appartenant pas au « soi ». Cependant, ces drogues non spécifiques ont des effets secondaires souvent graves, troubles métaboliques, infections ou cancers. De plus, elles ne permettent pas d'enrayer la survenue du rejet chronique à long terme. Face à ces deux problèmes majeurs, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes plus spécifiques du greffon est devenu une nécessité.

Les Treg : arbitres du système immunitaire

Les mécanismes immunologiques du rejet de greffe impliquent de nombreuses cellules et molécules du système immunitaire, notamment les lymphocytes T effecteurs (Teff). L'action délétère de ces cellules peut être contrebalancée par des lymphocytes T dits « régulateurs » (Treg), capables de moduler les réponses immunitaires. Via leur TCR (*T cell receptor*), les Treg reconnaissent

spécifiquement des alloantigènes du donneur, présentés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), puis ils s'activent et inhibent les réponses allo-immunes. Au cours des deux dernières décennies, de nombreux types de Treg ont été identifiés, incluant les Treg CD4⁺, mais aussi CD8⁺, ces derniers suscitant un intérêt croissant. On distingue trois sous-types de Treg : les cellules dérivées du thymus (tTreg), représentant 5 à 10 % du répertoire des lymphocytes T CD4⁺, les Treg générés *in vitro* (iTreg) et les Treg induits *in vivo* en périphérie (pTreg) [1]. Les Treg CD8⁺ jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie immune, et ils sont impliqués dans le contrôle d'un large panel de réponses immunes telles que l'immunité intestinale, l'auto-immunité, le privilège immunitaire de l'œil¹, la tolérance orale aux antigènes alimentaires, ainsi que le rejet de greffe [2, 3].

Les Treg CD8⁺CD45RC^{low} en transplantation : rôle et mécanismes d'action

Des études phénotypiques et fonctionnelles récentes ont permis de distinguer plusieurs sous-populations de Treg CD8⁺ chez la souris, le rat et l'Homme. Une population en particulier, les Treg naturels (naïfs) de type CD8⁺CD45RC^{low} a été identifiée chez le rat en 2004 [6]. Dans un modèle d'allotransplantation cardiaque incompatible chez le rat, nous avons montré pour la première fois que le blocage de la voie de costimulation CD40/CD40L² (via un adénovirus codant pour la molécule CD40lg empêchant l'interaction ligand-récepteur) induit une survie indéfinie de l'allogreffe. Le mécanisme met en jeu la génération *in vivo* de Treg CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques d'antigènes du donneur (aTreg CD8⁺CD45RC^{low}) et dont le répertoire est biaisé en faveur de l'expression de la chaîne Vβ11 du TCR [4, 5]. Contrairement aux Treg naïfs, les aTreg CD8⁺CD45RC^{low} sont capables de transférer la tolérance à des receveurs secondaires naïfs. Nous avons décrit

¹ Dans certains organes, moelle épinière, œil et cerveau, l'accès des cellules du système immunitaire est très contrôlé, faisant de ces organes des sites « immuns privilégiés ». Ces organes sont de ce fait à l'abri d'une réponse immunitaire potentiellement délétère.

² CD40 est un membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Il est exprimé à la surface des lymphocytes B et des CPA. CD40 interagit avec son ligand, CD40L (CD154), exprimé sélectivement à la surface des lymphocytes T activés, et cette interaction est indispensable à la coopération entre lymphocytes B et lymphocytes T.

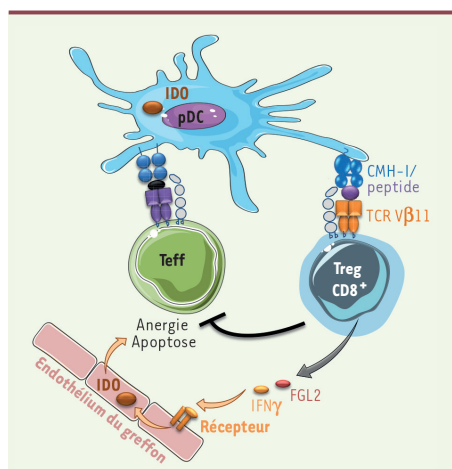


Figure 1. Mécanisme d'action des aTreg CD8⁺CD45RC^{low}. Les aTreg CD8⁺CD45RC^{low}, dont le répertoire est biaisé pour la chaîne Vβ11 du TCR, inhibent la prolifération des lymphocytes T effecteurs stimulés par des pDC allogéniques via la sécrétion de molécules immunorégulatrices, comme IFNγ, inducteur d'IDO, et FGL2.

que les aTreg CD8⁺CD45RC^{low} exercent leur fonction régulatrice via la sécrétion d'interféron γ (IFNγ), qui induit l'expression d'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les cellules endothéliales du greffon [4] (Figure 1). Par ailleurs, nos récentes études démontrent que les aTreg CD8⁺CD45RC^{low} utilisent *in vitro* des mécanismes suppressifs dépendant d'un contact, impliquant le tandem IFNγ et *fibrinogen-like protein 2* (FGL2) (Bezie *et al.*, en révision), mais aussi indépendant de ce contact et faisant intervenir IDO [6]. Enfin, les aTreg CD8⁺CD45RC^{low} interagissent de façon privilégiée *in vitro* et *in vivo* avec les cellules dendritiques de type plasmacytoïde (pDC) [6].

Identification des alloantigènes reconnus par les aTreg CD8⁺CD45RC^{low}

Les difficultés techniques d'identification des alloantigènes expliquent en partie notre méconnaissance des alloantigènes interagissant spécifiquement avec les Treg CD8⁺, et de leur rôle dans la génération et la fonction de ces Treg. Connaître ces cibles antigéniques est pourtant crucial en transplantation pour développer de nouvelles thérapies ciblées spécifiques d'antigènes [7]. En effet, des études chez l'animal ont montré que

n'affectent pas l'ensemble des réponses immunes [8]. Dans notre modèle d'allo-greffe incompatible pour le CMH, nous avons testé *in vitro* 82 allopeptides dérivés des régions polymorphiques des molécules du CMH du donneur, qui étaient des cibles potentielles spécifiques des aTreg CD8⁺CD45RC^{low}. Grâce à un test de coculture *in vitro* des Treg avec des pDC syngéniques et chaque allopeptide, nous avons identifié, pour la première fois dans un contexte de transplantation, un peptide naturel dominant, appelé Du51, dérivé du CMH de classe II du donneur et capable d'activer les aTreg CD8⁺CD45RC^{low}, à la fois dans leur phénotype et dans leur capacité d'inhibition des réponses T allo-réactives [9].

Potentiel régulateur des aTreg CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques du Du51

Grâce à la génération d'un tétramère de complexe CMH-I/Du51³, nous avons détecté la présence et l'accumulation *in vivo* de la sous-population de aTreg spécifique du Du51 dans le greffon cardiaque et la rate des receveurs trai-

³ Les tétramères sont des complexes synthétiques de molécules CMH contenant un antigène spécifique et un marqueur fluorescent. Ils peuvent se lier aux lymphocytes T exprimant le récepteur spécifique et permettent de détecter ces derniers.

tés avec CD40lg. Nous avons pu montrer pour la première fois que les aTreg CD8⁺CD45RC^{low} spécifiques du Du51 exercent *in vitro* une activité suppressive supérieure à celle des Treg naïfs polyclonaux, et sont nécessaires *in vivo* à l'induction d'une tolérance à la greffe. Cette observation confirme l'intérêt des thérapies cellulaires ciblées, spécifiques d'antigènes, dans un contexte de transplantation chez l'homme. De plus, nous avons démontré que le répertoire TCR des aTreg CD8⁺CD45RC^{low} est biaisé pour la chaîne Vβ11, et que sa diversité est statistiquement plus restreinte que celle du répertoire des Treg CD8⁺CD45RC^{low} naïfs.

Induction de tolérance à l'allogreffe par le peptide Du51

Finalement, l'identification du Du51 nous a permis de tester son potentiel thérapeutique *in vivo* dans l'induction de tolérance à l'allogreffe, en particulier via l'amplification des aTreg CD8⁺CD45RC^{low}. Nous avons utilisé un dispositif original d'administration du peptide par une minipompe osmotique, placée dans la cavité abdominale une semaine avant la greffe et diffusant continuellement le peptide jusqu'à trois semaines postgreffe (Figure 2). Ce traitement prolonge à lui seul la survie d'une allogreffe cardiaque avec une tolérance indéfinie du greffon chez 80 % des receveurs. En revanche, l'administration, simultanément à ce peptide, d'anticorps bloquant le CMH-I ou éliminant les cellules CD8⁺ *in vivo*, empêche l'induction de tolérance, démontrant que le développement de Treg CD8⁺ fait intervenir une interaction TCR/CMH-I/Du51 spécifique lors du traitement. L'ensemble de ces résultats met en évidence le potentiel des thérapies mono-peptidiques pour induire des Treg capables de contrôler

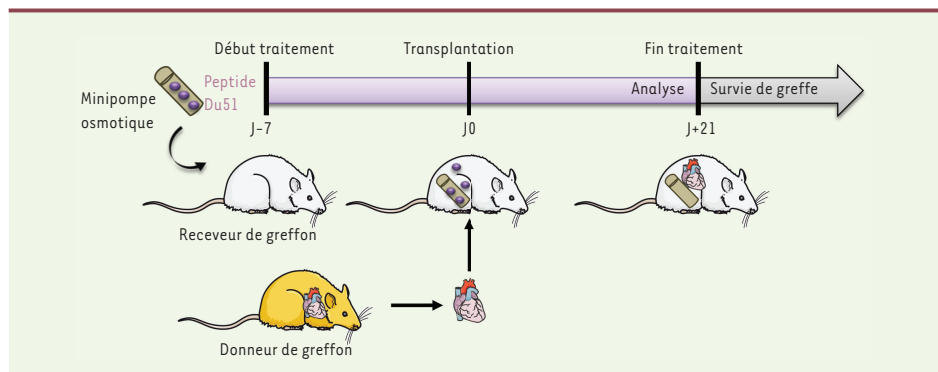


Figure 2. Protocole de thérapie mono-peptidique chez le rat. Le peptide Du51 est administré de façon continue par une minipompe osmotique pendant une durée totale de 28 jours.

les réponses allo-immunes responsables de la survenue des rejets aigu et chronique d'allogreffe.

Vers une thérapie cellulaire ciblée chez l'homme ?

Dans le contexte actuel d'évolution vers une médecine personnalisée, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques et diagnostiques en transplantation humaine. Un premier essai international de thérapie cellulaire personnalisée avec des Treg CD4⁺ amplifiés dirigés contre des cellules du donneur est actuellement en cours (The ONE Study). Notre étude des Treg CD8⁺ spécifiques du Du51 chez le rat suggère le fort potentiel thérapeutique de leurs équivalents chez l'homme. En effet, des Treg CD8⁺ humains, spécifiques de peptides homologues dérivés du CMH (ou HLA) du donneur, pourraient être sélectionnés à l'aide de tétramères, puis amplifiés, ou amplifiés sélectivement *ex vivo* par une stimulation avec l'allopeptide, avant d'être réinjectés au patient. Par ailleurs, la présence dans le sang

de Treg spécifiques de peptides dérivés du HLA pourrait être analysée et servir d'outil pronostique pour la survie de greffons. Le suivi de cette population représenterait une alternative à la biopsie des greffons – un geste très invasif – et permettrait une prise en charge plus précoce et efficace des patients transplantés via l'adaptation de leur traitement. Enfin, l'administration d'un peptide immuno-modulateur dérivé du HLA pourrait suffire en elle-même à prévenir des réponses allo-immunes et ainsi réduire la prise d'immunosuppresseurs non spécifiques et délétères à long terme. Cependant, de nombreux paramètres tels que l'efficacité, la sûreté, les mécanismes d'action, la biodisponibilité et le coût de ces thérapies cellulaires et peptidiques restent à étudier avant d'envisager une application clinique future à grande échelle. ♦

Key role of allopeptide-specific CD8⁺ Tregs in transplantation

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Shevach EM, Thornton AM. α Tregs, β Tregs, and γ Tregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 2014 ; 259 : 88–102.
2. Pomié C, Ménager-Marcq I, Meerwijk JPM van. Murine CD8⁺ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol* 2008 ; 69 : 708–14.
3. Guillonnet C, Picarda E, Aneagon I. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 ; 15 : 751–6.
4. Guillonnet C, Hill M, Hubert FX, et al. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007 ; 117 : 1096–1106.
5. Guillot C, Guillonnet C, Mathieu P, et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40-CD40 ligand results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 2002 ; 168 : 1600–9.
6. Li XL, Ménoret S, Bezie S, et al. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 2010 ; 185 : 823–33.
7. Picarda E, Aneagon I, Guillonnet C. T-cell receptor specificity of CD8⁺ Tregs in allotransplantation. *Immunotherapy* 2011 ; 3 : 35–7.
8. Juvet SC, Whatcott AG, Bushell AR, et al. Harnessing regulatory T cells for clinical use in transplantation: the end of the beginning. *Am J Transplant* 2014 ; 14 : 750–63.
9. Picarda E, Bézie S, Venturi V, et al. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest* 2014 ; 124 : 2497–512.



Tarifs d'abonnement m/s - 2015

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 109 dans ce numéro de m/s



PUBLISHED BY

INTECH

open science | open minds

World's largest Science,
Technology & Medicine
Open Access book publisher



2750+
OPEN ACCESS BOOKS



96,000+
INTERNATIONAL
AUTHORS AND EDITORS



89+ MILLION
DOWNLOADS



BOOKS
DELIVERED TO
151 COUNTRIES

AUTHORS AMONG
TOP 1%
MOST CITED SCIENTIST



12.2%
AUTHORS AND EDITORS
FROM TOP 500 UNIVERSITIES



Selection of our books indexed in the
Book Citation Index in Web of Science™
Core Collection (BKCI)

Chapter from the book *Frontiers in Transplantology*

Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/frontiers-in-transplantology>

Interested in publishing with InTechOpen?
Contact us at book.department@intechopen.com

Tolerance in Organ Transplantation

Laetitia Boucault, Séverine Bézie, Jason Ossart and
Carole Guillonnet

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/62653>

Abstract

Transplantation is often the best option to treat organ end stage failure. Transplanted patients need to take long-term immunosuppressive drugs to inhibit rejection and maintain their graft. But those therapies have numerous important side effects such as cancer induction and opportunistic infections. Thus, the development of novel therapies to induce specific rather than general immunosuppression and therefore, tipping the balance between effector and regulatory functions to inhibit transplant rejection is a major goal in the field. One major approach is the blockade of costimulatory signals to abort effector T-cell activation following TCR engagement and to promote regulatory T cells. Here we summarized the research to date that details immune mechanisms involved in tolerance in organ transplantation and strategies toward tolerance.

Keywords: Transplantation, Tolerance, Costimulation, Tregs, Immunointervention

1. Introduction

The primary role of the immune system is to protect against foreign antigens without reacting against self-antigens. In this objective, some mechanisms of immune tolerance have been set up. Immune tolerance is defined in general by a total absence of specific reaction against antigens, and particularly self-antigens and a break in immune tolerance can lead to autoimmune disorders. Understanding the mechanisms of immunological tolerance is crucial for the development of strategies to manipulate the immune system in the context of organ transplantation. Here, we provide a comprehensive summary of the immune mechanisms involved in transplant rejection and tolerance induction and the research to date leading to new strategies toward tolerance, as well as their translation to the clinics.

2. Tolerance in organ transplantation

In the context of transplantation, the graft is recognized as foreign antigens and immune responses are triggered. Immunosuppressive treatments can repress total immune responses, including responses against the graft, but these drugs are well known for inducing side effects such as cardiovascular diseases or increased opportunistic infections and malignancies, and lead to high morbidity and mortality, even when avoiding excessive immunosuppression [1]. In addition, current immunosuppressive regimens have marginal effects on long-term allograft survival with for example a half-life of 10 years for kidney transplantation. In fact, these drugs can even be deleterious in the establishment of tolerance. Some cases of tolerance spontaneously acquired by patients who stopped their immunosuppressive treatments because of side effects and noncompliance have been reported [2, 3]. Tolerance in transplantation is defined by the following criteria: the graft must be definitely accepted without any lesions of chronic rejection, and the recipient should not be on treatment at the moment of analysis and should be able to develop immune responses against any other foreign antigen (i.e. immunocompetent), and thus represents the center of immunologist efforts working in the field of transplantation. The most commonly transplanted solid organ is the kidney, but the field of solid organ transplantation also includes the heart, liver, pancreas, lung or intestine. Nowadays, transplantation still remains the best solution for organ failure, even in the face of graft rejection. There are three types of solid graft rejection:

- The quickest mechanism of rejection, said hyperacute rejection, takes place between minutes to hours after transplantation. It is mediated by the presence of pre-existent circulating antibodies against A, B molecules expressed by red blood cells [4, 5] and acquired antibodies against the human leukocyte antigen (HLA) [6, 7]. Those antibodies allow the immune system of the grafted patients to strongly recognize the molecules present at the surface of graft endothelium and lead to the destruction of this endothelium through complement cascade, neutrophils, and monocytes. Nowadays, hyperacute rejection is no longer a concern due to the establishment of pre-transplantation tests as cross-match test, where closest HLA compatibility between donor and recipient is ensured (concerning mainly HLA-A, B, and DR) and blood group typing.
- The months following transplantation, acute rejection can occur. Two mechanisms can be involved in this process. The cell-mediated rejection is induced by presentation of alloreactive molecules by APCs (Antigen Presenting Cells) to recipient's T lymphocytes, leading such activated lymphocytes to infiltrate and destroy the grafted organ [8]. The humoral mechanism acts through generation of alloantibodies directed mainly against MHC (major histocompatibility complex) class I by activated alloreactive B lymphocytes leading to antibody-dependent cellular cytotoxicity of endothelial cells (ADCC) [9]. Prevention of acute rejection is now ensured in more than 85% of cases by the current repertoire of immunosuppressive drugs available [10].
- Even though, the main problem in transplantation which remains unsolved is the long-term allograft dysfunction or chronic rejection. This phenomenon is slow and progressive but irreversible and cannot be controlled by immunosuppressive drugs. It is characterized by

an increase of the thickness of the intima's layer of graft vessels, leading to the ischemia of the tissue and finally to graft loss. Chronic rejection is mediated by the antigen-specific cellular and humoral immune responses against the graft. These immune responses lead to the recruitment of inflammatory mediators to the graft through the activation of the endothelium, and the secretion of free radicals and damage signals which activate muscle vessels proliferation.

Thus, T cells play an important role in graft rejection. In solid organ transplantation, naive T cells from the recipient are activated by recognition of blood group (ABO), donor major histocompatibility complex (MHC), minor histocompatibility complex (mHC, MICA, MICB, H-Y), or nonpolymorphic peptides (collagen, angiotensin II receptor) presented by professional APCs from the recipient or the donor or directly from endothelial cells of the graft (mostly MHC class I) [11]. Thus, T cells can be primed by three distinct pathways.

The direct allorecognition: when the transplanted organ is reperfused, intact MHC/peptide (MHCP) at the surface of APCs from the donor travel to the lymphoid organs of the recipients where they interact with CD4⁺ and CD8⁺ alloreactive naive T cells and active them [8, 12]. This pathway is generally associated with acute rejection because donor's APCs persist a few months following transplantation. In addition, intact MHCP at the surface of endothelial cells of the graft can activate and maintain allogeneic CD8⁺ effector T-cell responses [13].

The indirect allorecognition: this pathway involves the presentation of allogeneic peptides derived from donor MHC molecules and presented by APCs of the recipient. Dominant peptides presented by this pathway are generally derived from hypervariable regions. This pathway involves capture, processing, and presentation of alloantigens and is predominantly used by CD4⁺ T cells and most of the alloantigens are presented by MHC class II. However, cross-presentation on MHC class I can occur and CD8⁺ T cells can also be activated [14–16]. The indirect allopresentation pathway is also necessary for B cells activation, since their activation depends on CD4⁺ T cells help [17]. The indirect allorecognition is involved in both acute and chronic rejection since the alloantigens are present during all the life of the allograft [18–21].

The semi-direct allorecognition: Lechler's team reported that APCs from the recipient can capture entire intact MHC/peptide complexes expressed at the surface of the donor's APCs. Those complexes are internalized, processed, and presented directly to CD8⁺ T cells or indirectly to CD4⁺ T cells. This presentation pathway involves the phenomenon of trogocytosis, i.e. the exchange of membrane fragments between cells in contact [22–24]. Brown and al have reported *in vivo*, in a model of transplantation in mice, the presence of intact donor MHC-I and MHC-II on the surface of DCs, B cells, and macrophages [25].

2.1. The immune tolerance

To date, two elaborated and complementary mechanisms of immune tolerance have been described as central tolerance and peripheral tolerance (see **Figure 1**).

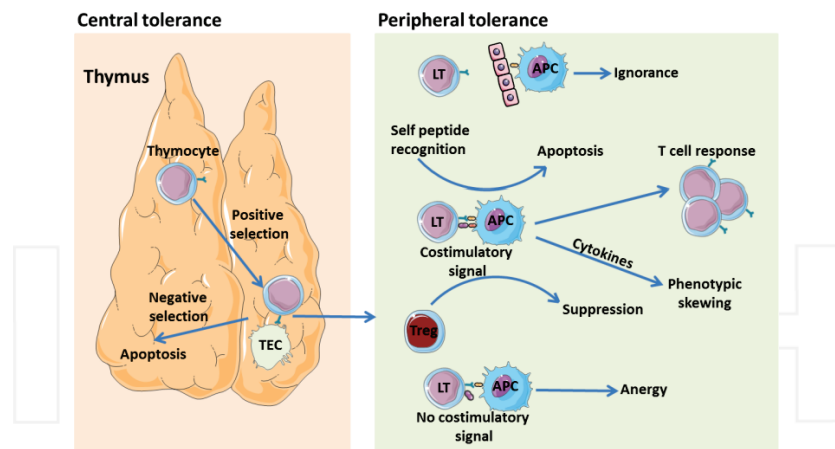


Figure 1. Central and peripheral tolerance. In the thymus, tight interactions between TCRs and self-antigens presented by thymic epithelial cells (TEC) induce thymocytes apoptosis. Four mechanisms induce peripheral tolerance: ignorance, apoptosis, phenotypic skewing and anergy. Appropriate combination of signals results in complete T-cell activation.

2.1.1. Central tolerance

In the context of immune tolerance, the T lymphocyte lineage is particularly important. T lymphocytes, B lymphocytes, and NK cells derive from a common hematopoietic precursor from foetal liver during embryogenesis or from adult bone marrow. The CD3⁺CD4⁺CD8⁺ TCR⁺ thymocytes colonize the thymus and undergo different stages of maturation leading to TCR rearrangement. During their migration to the cortex, cells also acquire expression of CD3, CD4, and CD8 molecules and undergo a step of positive selection. All CD4⁺CD8⁺ cells said double-positive (DP) thymocytes express a complete $\alpha\beta$ TCR but only 20–25% of them are able to interact with the MHC [26, 27]. Cells that strongly interact with MHC class I become CD8⁺ simple positive (SP) and the one which interact with MHC class II becomes CD4⁺ SP [28–30]. This interaction provides a survival signal to thymocytes that can pursue their education by migrating into the thymic medulla. In this medulla, SP thymocytes undergo the second step of immune central tolerance called negative selection. After positive selection, the TCR repertoire is very large and uncontrolled; thymocytes are able to recognize a broad range of foreign antigens but also self-antigens. The maturation of thymocytes expressing a TCR against self-antigens can lead to autoimmune disease in the periphery. Negative selection consists in the inhibition of potentially autoreactive thymocytes by clonal deletion or by induction of anergy if receptor editing fail. This selection is mediated by medullary thymic epithelial cells (mTECs) that are the only antigens presenting cells (APCs) expressing a panel of ectopic tissue-specific antigens (TSA). The expression of those TSA is mainly under control of a transcription regulator named Auto-Immune REgulator (AIRE) [31]. Two mechanisms of TSA presentations can occur in the medulla. The first one is the direct presentation by mTEC that can be sufficient

to induce negative selection of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells [32, 33]. The second mechanism of presentation is mediated by thymic dendritic cells which are able to get TSAs from mTECs and to present them to thymocytes [34]. Thymocytes able to strongly recognize a TSA presented by mTECs or DCs receive a signal that leads to apoptosis [35]. After negative selection, approximately 5% of total thymocytes can finally go to the periphery.

2.1.2. *Peripheral tolerance*

Due to the absence of self-antigen presentation in the thymus [36], or the low affinity of T cells for self-antigens [37], autoreactive T cells escape sometimes from thymic negative selection. To complete the efficacy of central tolerance, the immune system developed many tools to neutralize these cells and avoid autoimmune diseases. These mechanisms are either passive, concerning antigen ignorance, T-cell anergy or apoptosis induction and phenotypic skewing, or active when mediated by regulatory cells [38].

Antigen ignorance allows autoreactive T cells to persist as functional circulating T cells while never primed by any antigen [39]. Indeed, antigens can be masked by anatomical barriers like lens proteins, spermatozooids, or nervous system protein protected by the meninges barrier. Besides, a low amount of antigens can be sufficient to activate cytotoxic T lymphocytes previously primed but not naive T lymphocytes [40].

On the contrary, a high amount of antigen can induce T-cell apoptosis. This mechanism called activation-induced cell death is induced by Fas signaling pathway [41]. Indeed, Fas expression deficiency results in autoimmunity [42]. Autoreactive T-cell peripheral deletion can also result from a lack of costimulatory signal or of growth factor. [43–45]. Likewise, the absence of costimulatory molecules induces a Fas-mediated apoptosis of autoreactive B cells [46], but anyway the autoreactive B cells escaping the clonal deletion are unlikely to meet the T cells specific to the same antigen they need to be completely primed [47, 48].

Autoreactive T cells can also be primed but functionally inactivated. This state of anergy is characterized by incapability to proliferate and to produce IL-2 following antigen stimulation [49, 50]. Antigens are required to maintain this inactive state [51], and large amounts of IL-2 or anti-OX40 antibodies can abrogate it [52]. Anergy results from either a lack of costimulatory signal by APCs, a low affinity of TCR for the antigen, or from CTLA4/B7 interaction. Indeed, interactions between CD28 expressed on T-cell surface and CD80-CD86 on antigen-presenting cells are essential for activation and proliferation of alloreactive T cells [53], allow generation of memory T cells and inhibit regulatory T (Tregs) suppressive activity [54, 55]. Without CD28/CD80-CD86 engagement, interactions between TCRs and alloantigens induce the anergy of T cells. CTLA-4 (CD152) has a large structural homology with CD28 and interacts with CD80-CD86 with better affinity than CD28 molecule and functions as a negative regulator of T-cell activation [56]. The expression of these two molecules regulates the balance between activation and inhibition of T cells and allows the control of an over-reaction of the immune system leading to inflammation or autoimmunity [57]. Similarly, the expression of Programmed Death-1 (PD-1) after antigenic stimulation and interaction with its ligand PDL-1 reduces IL-2 synthesis and induces T-cell anergy [58]. Another important co-stimulatory pathway is the CD40/CD40L co-stimulatory pathway. The CD40 molecule is a transmembrane protein that

belongs to the TNF receptor family. It is expressed on vascular endothelial cells [59], activated DCs [60], monocytes/macrophages, platelets [61] and B lymphocytes [62]. The CD40L, also called CD154, exists in soluble form or at the cell membrane [63]. It is expressed on activated CD4⁺ T cells, basophiles, eosinophils [64], DCs from the blood [65], endothelial cells, macrophages [66], and B lymphocytes [67]. The CD40-CD40L interaction is critical for T-cell-dependent effector functions [68]. Indeed, CD40/CD40L interaction acts with IL-12 to induce production of IFN- γ by human T lymphocytes stimulated by anti-CD3/anti-CD28, as well as IL-2 production by Th1 and IL-4, IL-5 and IL-10 by Th2 lymphocytes [69]. Besides, interaction with CD40 activates the expression of adhesion molecules by T lymphocytes [70]. Many other co-stimulation pathways are well described such as RANK/RANKL or ICOS/ICOSL. These costimulatory pathways are crucial for T-cell activation inducing rejection, so inhibition of one or more of these pathways may inhibit rejection. Moreover, anergized T cells can inhibit DCs function [71], become IL-10 producing Tregs [72], and induce T-cell apoptosis [73]. Autoreactive B cells also undergo anergy induced by chronic stimulation of BCR(B cell receptor) by antigens [74].

Activated autoreactive T cells can persist in a nonpathogenic state. Indeed, Th2 cytokines expression is linked to lower autoimmunity [75, 76] and tolerance in transplantation [77–79], sometimes through Tregs induction [80]. By contrast, Th1 and Th17 are linked to allograft rejection [81]. Therefore, immunosuppressive treatments, like glucocorticoides or sirolimus, aim to inhibit Th1 responses and promote Th2 responses [82, 83].

Peripheral tolerance is also maintained by regulatory cells. Immune cells can acquire a regulatory function during development, such as “natural” Tregs in the thymus, or in periphery under the influence of the microenvironment, such as “induced” Tregs in the allograft or draining lymph nodes. Almost all type of cells have a regulatory counterpart, including T cells, B cells, myeloid cells (MDSCs, M2 macrophages), DCs. These regulatory cells limit effector cell responses to pathogens and self-antigens, acting by contact or by secretion of suppressive cytokines. In transplantation, regulatory cells are targets for therapeutic strategies to control innate immune responses triggered by ischemia/reperfusion of the graft, and adaptive responses triggered by the allograft.

3. Induction of tolerance

3.1. Animal models of tolerance

The immune system complexity is due to a large number of possible interactions and activation pathways. So, *in vitro* experiments provide primary results but they need to be confirmed by *in vivo* studies to overview all the potential effects on the organism. There are lots of rodent models of allograft transplantation and numerous strategies have been used successfully to induce tolerance in these models.

Kidney transplantation is often used between MHC mismatched rodents [84, 85]. General physical condition is observed during all the experiments. Serum creatinine levels and urine

quality are measured after transplantation to evaluate kidney activity. Generally, this graft is realized in different steps. First, ablation of one recipient kidney and allograft of MHC mismatched kidney. The transplanted organ is not immediately efficient. So, ablation of the second recipient's kidney is realized few days after transplantation. At this time, the recipient has only one transplanted kidney. If the kidney is rejected, the rodent dies because of blood toxicity.

Cardiac allograft in rodent is also a good model [86–90]. In this case, it is a heterotopic graft. Recipients keep its heart and receive a MHC-mismatched heart in the abdomen. The heart is connected to recipient blood circulation. Heart allograft survival is evaluated by palpation through the abdominal wall and scoring of its beating. Just after transplantation, heart beats strongly. But, if there is activation of the recipient immune system against alloantigens, the heart tissue is stiffened and beating are less intense and frequent until their full arrest. The major advantage of this model is that the recipient survives even if rejection occurred, and thus mechanisms can be analyzed.

But, sometimes, results obtained in rodent models could not be reproduced in larger animal models, such as non-human primates (NHPs) or swine. Rodents are too different from human to serve as preclinical models. Indeed, rodents have 90% similarity with human genome while there are around 99% similarity between NHP and human. Thus, NHPs constitute a more relevant animal transplant model. But, using NHPs is considerably more expansive and restrictive than rodents. Indeed, NHPs need more time for reproduction and development and more place than rodents. Moreover, all protocols conducted on animals have to be approved by an ethical comity. NHPs are ethically largely more controlled than rodents. So, first experiments are generally conducted on rodent models to generate primary results and conclusion. Then, a model with immune system more reflective of the human immune system is essential for testing protocols before moving into clinical studies.

This was the case for anti-CD40L treatment. All results obtained in rodents have demonstrated a great potential for induction of transplant tolerance. However, similar experiments in primate and human have highlighted a major barrier. Indeed, CD40L is a molecule expressed on NHPs, and human platelets. So this treatment resulted in thrombosis in NHPs and could not be used in the clinic [91, 92]. New anti-CD40L antibodies are being engineered as alternatives given the potential of this strategy in multiple diseases [93–95].

An alternative possibility that has been developed in the last decade is the engineering of mouse with humanized immune system in which various types of human cells are engrafted and functional [96, 97]. These mice harbor a complete null mutation of the IL-2 receptor gamma chain, NOD/SCID IL-2r γ^{null} (NSG), or Rag 2^{-/-} γ^{null} and are characterized by an impaired development and function of murine T, B and NK cells. These mice can efficiently support the development of a functional human hemato-lymphopoiesis. There are different protocols, more and more efficient, to induce humanization in highly deficient mice, such as injection of CD34⁺ cells or PBMCs. Mice humanized with PBMCs represent the fastest model of graft versus host disease (GVHD), due to direct injection of adult PBMCs. Indeed, these models allow the analysis of human immunology *in vivo* [98, 99]. The mice are monitored for weight loss and tissue damages.

Another important model is skin transplantation [100–102]. It is possible to graft tailskin on the recipient lateral flank in rodent models. After removal of the bandage, grafts are observed to analyse their evolution. It's considered as rejected when skin dries and falls, indeed no viable skin remains. This strategy is even more relevant in humanized mice model [103]. In this case, mice are grafted with human skin obtained from abdominal surgery from patients. In this kind of model, skins are left to engraft at least 15 days before rejection is triggered by injection of allogeneic PBMCs.

3.2. Co-stimulation blockade

The aim of transplantation research is to exploit mechanisms of self-tolerance to generate specific tolerance after transplantation. One of the most promising approaches is to inhibit co-stimulatory pathways to abort activation of T cells following TCR engagement. T cells are an essential component of the immune response against allogeneic cells inducing allograft rejection. Interaction between TCR and MHC/antigen induces the first signal of stimulation. But this alloantigen recognition only is not sufficient for complete T cell activation. Co-stimulatory signals generated by the interaction between antigen and T cells and cytokine stimulation are also necessary for complete immune system activation [104]. There are 4 different co-stimulation molecules families: immunoglobulins superfamily, TNF receptors, integrin family, and T-cell immunoglobulin and mucin-containing domain (TIM) family.

Blockade of costimulatory pathways has been considered as a good strategy for the prevention of allograft rejection in transplantation by aborting activation following TCR engagement [52, 105]. These strategies have been studied in mice, rat, and NHPs and induces allograft tolerance [106, 107]. Blockade of both CD28/B7 and CD40/CD40L co-stimulatory pathways induces long-term allograft survival. In the '90s, the first CTLA-4Ig soluble molecule was generated [108]. This molecule corresponds to the fusion between CTLA-4 extracellular domain and a modified IgG1 constant fragment domain [109]. CTLA-4Ig interaction with CD80-CD86 inhibits T-cell activation and prevents rejection of cardiac and renal allografts in rodent models [87, 108, 110] and prolongs survival of human islets xenograft in mice [111]. But CTLA-4Ig is not sufficient to induce tolerance because all allograft were finally rejected. Besides, when this treatment is combined with donor-specific transfusion (DST), allograft tolerance is obtained in heart allograft rodent models [105, 112]. DST corresponds to injection of donor splenocytes during transplantation and induces a state of chimerism. CD28 blockade show interesting results in rodent models, but this strategy is not efficient enough in NHP models [113]. Furthermore, it has been described that CTLA-4 is important for Tregs functions [114] and also for induction of tolerance to allograft [115, 116]. Thus, it would be more benefic to target CD28 molecule on T cell than CD80/CD86. Different groups have demonstrated that specific targeting of CD28 prevented rejection and generated Tregs [115, 117, 118]. FR104 has been developed in our laboratory as a costimulatory inhibitor that target CD28 without altering CD80/CD86 [119]. There are important differences between murine and human CD28 in terms of expression and interactions [120]. Thus, FR104 has been studied in NOD/SCID mice and NHP models. FR104 is safe *in vitro* and *in vivo* on human cells and does not play agonistic

function on T cells [99]. This point is really important because another anti-CD28 molecule (TGN1412) studied in a phase 1 clinical trial induced important cytokine storm that caused life threatening effects [121].

CD40-CD40L blockade has also been studied for induction of transplantation tolerance. There are different strategies to block this pathway (monoclonal antibodies, CD40Ig). Treatment with monoclonal antibody anti-CD40L induces skin, renal, and cardiac allograft survival in mice [86, 122] and in NHP models [123, 124] but only with long-term repeated injections [123]. Some groups have shown that these monoclonal antibodies deplete activated T cells through cytotoxicity [125] and apoptosis [126], and induce Tregs [102]. These blockades of the CD40-CD40L pathway induce prolongation of allograft survival but without real allograft tolerance. Effect of anti-CD40L treatment has been improved by association with DST in islet graft in mice [127]. Different studies have demonstrated the importance of treatment associated with DST, such as anti-CD4, anti-thymocytes, or anti-CD40L [128–130]. Another strategy uses CD40Ig molecule as treatment in allograft models. Our team has demonstrated that treatment with CD40Ig molecule or gene transfer induces allograft acceptance in cardiac allograft rat models [131] mediated by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs [132]. Several approaches use combined protocols. Indeed, anti-CD40L and CTLA-4Ig treatment synergies in heart and skin allograft in rodents [86, 101] and in renal allograft in NHPs [113].

ICOS-ICOSL pathway is another costimulatory pathway. ICOS presents around 40% similarity with CD28 and CTLA-4. ICOSL is constitutively expressed by B lymphocytes and monocytes and induced after T-cell activation [133]. Mice knocked out for ICOS have shown weak humoral responses [134–136]. ICOS-ICOSL blockade alone does not really induce significant effect on graft outcomes [137]. Therefore, our team have demonstrated that blockade of both ICOS-ICOSL and CD40-CD40L induce long-term heart allograft survival in rat model and decreases chronic rejection lesions [138]. During acute rejection, RANK and RANKL molecules are increased. Moreover, RANKL blockade induce long-term heart allograft survival in both rats and mice [139], and blockade effect is stronger when associated with CD40 pathway. PD1 is expressed by activated T lymphocytes, B and NK cells and macrophages, while PDL1 and PDL2 are expressed by activated APCs. PD-L1Ig alone does not improve allograft survival but synergizes with cyclosporine A, rapamycin, and anti-CD40L [140]. This pathway seems to play a role in the generation of some Tregs [141, 142].

3.3. Regulatory cells, crucial players in tolerance

In the context of organ transplantation, the findings of the last decades have put lights on regulatory cells as key players in the induction and maintenance of tolerance in organ transplantation. Although it has become evident that several distinct subsets of regulatory cells have the capacity to finely and tightly regulate the anti-donor immune responses in organ transplantation, one subset has attracted most of the research, the CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}Tregs, thanks to the identification of a crucial master gene necessary for their development, identity, and function, the Foxp3 (Forkhead box P3) transcription factor [143–146].

3.3.1. Regulatory T cells (Tregs)

Tregs suppression of immune responses has been unravelled in the '70s [147]. Several subsets of Tregs have been evidenced including CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Tregs, but also CD8⁺ Tregs, among them the CD8⁺CD45RC^{low} and CD8⁺CD28⁻ Tregs are the most known, CD4⁺CD8⁻ Tregs, NKT cells and $\gamma\delta$ T cells. Tregs can further be subdivided in characteristics (phenotype, repertoire...) and potential in organ transplantation depending of their emergence from the thymus (nTregs) or from the periphery (iTregs). While nTregs developed as a distinct lineage in the thymus, iTregs can be generated from naive cells in the periphery and can be *in vitro* or *in vivo* induced in transplantation under some conditions such as donor-specific blood transfusion, blockade of the CD40/CD40L pathway, or donor MHC-derived peptides [148–150].

Since the identification of the CD25 and Foxp3 markers, several other markers have been proposed to better define Tregs, such as for CD4⁺ Tregs glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein (GITR), CTLA-4, CD62L, CD103 (alpha beta integrin), LAG-3 and CD127 (alpha chain of the IL-7 receptor) [151–155]. For CD8⁺ Tregs, the identification of relevant markers has been more difficult and several markers have been proposed such as CD122, CD28, CD45RC, CD103, and PD-1 [156–160]. A major discovery for Tregs biology was the identification of the Foxp3 and its role in CD4⁺ Tregs development, identity and function [161, 162]. Mutations of the Foxp3 gene lead to a lymphoproliferative pathology in mice and an immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X linked (IPEX) syndrome in human [163]. To date, this gene remains the best marker to identify CD4⁺ Tregs, although in human it has been demonstrated that it can be transitory upregulated in T lymphocytes upon activation without providing regulatory capacity [164]. The Helios and neuropilin-1 (Nrp-1) markers have also been proposed to distinguish nTregs from iTregs, and also more recently as an important marker for CD8⁺ Tregs identity and function [165–167]. Indeed, the Cantor group demonstrated that Helios was a key transcription factor that stabilizes CD8⁺ Tregs in the context of an inflammatory response and that Helios-deficient Tregs developed an unstable phenotype (reduced Foxp3 and increased effector cytokines expression) during inflammatory responses. Antigen specificity has also been proposed to play an important role to distinguish Tregs origins [168]. Tregs originating from the thymus were selected for their specificity toward self-antigens, and thus are susceptible to be continuously stimulated by the self-antigens in periphery, potentially explaining their high expression of activation markers such as CD25, while iTregs generated by environmental conditions (inflammation, tolerance. . .) have a higher affinity toward exogenous antigens and thus are less stable once the antigens have been eliminated. In the context of organ transplantation, the antigens remain and we have demonstrated that CD8⁺CD45RC^{low} iTregs were maintained and stable for a long time [132, 150].

Tregs use different mechanisms to suppress anti-donor immune responses; they can mediate their activity through cell contact, cytokines secretion, or metabolic disturbance. Suppression through cell contact is mediated by the CTLA-4 and LAG-3 molecules expressed by Tregs. Interaction of CTLA-4 with B7 modulates CD80-86 expression by APCs and tryptophan catabolism in DCs, thus inhibiting T-cell activation [169]. Tregs can also induce effector cells

apoptosis by cytolysis mediated by cell contact and secretion of cytotoxic molecules such as granzyme B and perforin [170]. Suppression through metabolic disturbance consists in the modification of the biochemical and cytokine environment, leading to target cell death. Adenosine triphosphate (ATP), cyclic-adenosine-monophosphate (cAMP), or IL-2 deprivation has been shown has strong inhibitor of cell proliferation [171, 172]. Finally, immunosuppressive cytokines play a major role in Treg-mediated suppression. IL-10, TGF- β , IL-34, IL-35, FGL-2, and IFN γ are all involved in CD4⁺ and/or CD8⁺ Tregs function [89, 159, 173, 174]. We have demonstrated that IFN γ production by CD8⁺CD45RC^{low} Tregs in a model of cardiac allograft tolerance in rat resulted in indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression by DCs and endothelial cells of the graft [159]. We have shown that CD8⁺CD45RC^{low} iTregs also produced high levels of FGL-2 [89] and IL-34 in rat and we have demonstrated that IL-34 is a cytokine that is specifically expressed by human Foxp3⁺ CD4⁺ and CD8⁺ Tregs [173].

3.3.2. Other subsets of regulatory cells

Clinical and experimental observations have highlighted the role and potential of non-T cells with regulatory properties, defined as regulatory B cells (Bregs), tolerogenic dendritic cells (Tol-DCs), or regulatory macrophages (Mregs) or myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) (nonexhaustive list) [89, 175–179].

The role of Bregs has been particularly investigated in allograft models of tolerance by our laboratory and in tolerant transplanted patients. In these patients, high levels of B lymphocytes and B markers have been observed, while these patients were tolerant and displayed an absence of donor-specific antibodies (DSAs) [3, 180, 181]. The phenotypic profile of Bregs remains unclear, in contrast to Tregs, although a few markers have been identified including CD1d, CD21, CD24, and IgM and it has been demonstrated that they mostly display an immature phenotype [182, 183]. A common feature of Bregs is their ability to secrete IL-10 and IL-35, two cytokines playing a major role in their activity and initially demonstrated in autoimmune diseases [184]. Other mechanisms of action resulting in Bregs activation and suppression involve their BCR engagement, cooperation with T lymphocytes, signaling via CD40/CD40L, TLR activation, IFN γ from tolerogenic DCs, or granzyme B secretion [185–189]. The engagement of their function results in inhibition of effector CD4⁺ T-cell proliferation, Th1 differentiation, APCs function, and monocytes activation. In addition, Bregs have been shown as able to induce Tregs and NKT cells [177, 190]. In the context of transplantation, the role of Bregs has been proven in a model of cardiac allograft tolerance in mice treated with anti-CD45RB [191]. In our laboratory, we have demonstrated that IgM⁺IgG⁻ B cells with a regulatory activity accumulated in the cardiac allograft of tolerant rat recipients and can adoptively transfer allograft tolerance to newly grafted recipients [183, 189]. We have shown that those Bregs had a partial defect in CD40 signaling and overexpressed granzyme B. In a similar model of cardiac allograft, we have demonstrated that administration of an adenovirus encoding fibroleukin-2 (FGL-2), a cytokine associated with Treg function, can induce tolerance to the allograft, thought generation of Bregs capable of infectious tolerance [89]. Finally, we have also demonstrated in a model of CD8⁺ Treg-mediated CD40Ig-induced allograft tolerance, deple-

tion of CD8⁺ Tregs resulted in maintenance of long-term survival induction through generation of Bregs and RegMCs [176].

Although DCs are mostly known to be immunogenic; they also have the capacity to be tolerogenic. They play a major role in central and peripheral tolerance since they are involved in clonal deletion of autoreactive T lymphocytes in the thymus and correlate with an increased risk of autoimmune diseases and decreased presence of CD4⁺ Tregs when depleted in periphery [192]. They are defined by their expression of tolerogenic molecules, such as IL-10, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), TGF- β or heme-oxygenase 1 (HO-1), their low expression of immunostimulatory molecules, such as MHC molecules or CD80 and CD86, and in general their ability to generate Tregs and to inhibit effector T-cell responses. Their tolerogenic properties have been linked with their maturation, exposure to immunosuppressive, or anti-inflammatory treatments and their environment [193]. In the last year, a number of protocols have been developed to generate Tol-DCs as therapeutic tools to induce a specific tolerance to antigens in autoimmune diseases and transplantation, and our laboratory is involved in the first clinical trial in kidney transplanted patients using Tol-DCs in the context of a European "ONE STUDY" funding involving several centers [194, 195].

Initially, the focus was on the potential of immature conventional DCs (cDCs) expressing low levels of MHC and costimulatory molecules and their potential to induce transplant tolerance to a cardiac graft in mice [196, 197]. Our laboratory has demonstrated that autologous DC combination with suboptimal dose of immunosuppressive drugs induces long-term allograft survival in rat [198]. We have shown that they require TMEM176B, an intracellular protein identified in tolerant recipients, to cross-present donor antigens and induce Tregs and prolong allograft survival [199]. We have also shown that the molecule HO-1 can inhibit DC maturation, while preserving their production of IL-10, and thus leading to inhibition of pro-inflammatory and allogeneic immune responses [200].

Although their tolerogenic properties in transplantation are less well defined, the role of plasmacytoid DCs (pDCs) has been demonstrated for the regulation and the maintenance of bone marrow and organ transplantation [201]. As for cDCs, they can be immunogenic or tolerogenic according to their receptor engagement and maturation status. We have demonstrated their preferential interaction with CD8⁺ Tregs in a model of cardiac allotransplantation in rat treated with CD40Ig resulting in the superior suppressive potential of CD8⁺CD45R^{low} Tregs [159, 202]. A group has shown their involvement in a model of cardiac allograft tolerance in mice treated with DST and anti-CD40L. In this model, pDCs induced tolerance through generation of alloantigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs [203] and depletion of pDCs inhibited Treg development and tolerance induction. In human, pDCs stimulated through certain of their TLR (toll like receptor) or costimulatory molecules efficiently induced CD4⁺ and CD8⁺ Tregs inhibiting *in vitro* allogeneic T-cell stimulation [204–206]. Liver-transplanted patients tolerating their allograft displayed significantly more pDCs and CD4⁺ Tregs [207].

Finally, Tregs can generate tolerogenic DCs, by modifying molecules expression such as inducing tolerogenic molecules expression like IDO, ILT3 or ILT4, changing their function [208]. We have demonstrated in several models of allograft tolerance that DCs were essential for establishment and maintenance of allograft tolerance [202, 209–211].

In transplantation, although macrophages activation is often associated with allograft destruction and rejection in the early phases, the existence of an alternative population of Mregs contributing to tissue reparation, activated by Th2-type cytokine such as IL-4 and IL-13 and inhibiting pro-inflammatory cytokines secreted by macrophages [212]. Mregs can be induced by Treg interactions, Tregs depletions, and can even induce in turn Tregs via IL-10 secretion for example [213, 214]. The reduction of macrophages in mice receiving hematopoietic stem cells aggravated the GVHD, whereas expansion of macrophages with CSF-1 resulted in the opposite effect [215]. Mregs isolated from peripheral blood are characterized by their morphology, specific markers, although unstable, and their capacity to inhibit T-cell proliferation *in vitro* [216]. A clinical pilot study is administering donor-derived Mregs to kidney-transplanted patients, allowing graft survival under minimal immunosuppression one year following administration without clinical signs of graft rejection [217]. We and others have shown the potential of M-CSF and IL-34, two cytokines involved in monocytes survival and differentiation to induce Mregs *in vitro* and *in vivo* in human, mice, and rat transplantation models, and that those Mregs induced in turn Tregs capable of tolerance induction [173, 218].

MDSCs are a heterogeneous population of immature hematopoietic progenitor cells presenting numerous suppressive functions, including alloantigen tolerance induction in cardiac and islet allograft model in mice and kidney allograft in rat [219, 220].

3.4. Tipping the balance between effector and regulatory functions

Allograft outcome depends on the balance between effectors, which attack alloantigenic tissues, and regulators, which are essential for regulation/inhibition of alloresponses and induction of tolerance [221]. Induction of tolerance might be induced by the diminution of alloreactive T cells to allow Tregs to suppress the immune system activation. A large number of protocols have been studied with more or less efficacy.

Several approaches have been based on the expression amount of CD45 molecule on T cells allowing to distinguish effector and Tregs [222]. Strategies using monoclonal antibodies have been tested in animal models, notably in mice models of transplantation targeting CD45RB, as CD4⁺CD45RB^{high} T cells from untreated mice have been shown as capable of inducing colitis, diabetes, and thyroiditis [223]. In all cases where CD4⁺CD45RB^{high} T cells have been shown to cause autoimmunity, their counterpart CD4⁺CD45RB^{low} T cells have been shown to prevent the induction of the disease. Anti-CD45RB antibody (MB23G2) caused transitory decrease of circulating lymphocytes expressing CD45RB and induced allograft survival with normal kidney allograft function [85]. This antibody induces also upregulation of CTLA-4 on lymphocytes [224]. This treatment has been studied in kidney, pancreatic islets, and heart allograft models. Lazarovits et al. have studied two different CD45RB mAb (MB23G2 and MB4B4). They have shown that the nondepleting MB4B4 is therapeutically ineffective while MB23G2 depletes CD45RB^{high} lymphocytes and induces renal and islets allograft tolerance in mice model [85, 225].

Tipping the balance to favor regulatory functions is an interesting alternative to effector cells depletion. In our laboratory, we have developed and demonstrated the efficacy of different therapeutic strategies to modify the balance in favor of regulatory functions, such as CD40Ig,

anti-CD28 (FR104), HO-1, FGL-2, or IL-34, for example [55, 89, 131, 173, 226]. Our team studied CD40Ig treatment in a cardiac allograft rat model. We have demonstrated that this treatment induces long-term survival by generation of CD8⁺CD45RC^{low} [131]. CD45RC has been shown in rats, mice, and humans to be a marker of both CD4⁺ and CD8⁺ Tregs [98, 102–106]. Moreover, this cell population is able to transfer infectious tolerance to naive transplanted rats [159]. Anti-CD28 is a good candidate to prevent rejection in the clinic [115, 231]. Zhang and al have shown that anti-CD28 inhibits lymphocytes activation and increases the proportion of cells expressing Foxp3 in the allograft. Our team and others have proved that treatment with anti-CD28 acts through the increase of the proportion of Tregs [117, 118, 178]. Actually, FR104 is the most known molecule targeting CD28. This humanized molecule has no agonist activity on human T cells *in vitro* and it does not induce cytokine storm in NOD/SCID mice reconstituted with human PBMCs. Moreover, Poirier and al have demonstrated the potential of FR104 in GVHD humanized mice model. They have also administrated FR104 to NHPs. Their results indicated a good tolerance in NHP and excluded cytokines release [99]. Several nondepleting antibodies, such as anti-CD4 and anti-CD8 mAb, are efficient to induce tolerance [232] and have permitted the first proof of the possibility of infectious tolerance [233]. Moreover, different strategies should be combined to improve their effects. Indeed, anti-CD45RB mAb and anti-CD40L mAb synergized and improved long-term allograft survival in islets and skin allografts [234].

All these examples confirm the importance of the balance between effector and regulatory cells for graft outcome.

4. From the bench to the clinic

Regulatory cells are essential for tolerance in transplantation. Many animal models have highlighted the potential of such tools for preventing allograft rejection and GVHD development. Their human counterparts are a promising issue for following immune status and inducing tolerance in transplanted patients.

4.1. New biomarkers for a real-time adapted treatment

A biomarker is “a characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention” [235]. Nowadays, the reliability of the prognosis to predict allograft survival/rejection is low. For pancreas and liver transplantation, the measurement of lipase/amylase and liver enzymes respectively is recommended as routine post transplantation monitoring. The monitoring of cardiac enzymes is not recommended because of the poor sensitivity of these markers in the diagnosis of acute rejection, thus patients have to suffer endomyocardial biopsies 15 times during the first year after transplantation [236]. Echocardiography, diastolic function analysis, and quantitative measurement of changes of the transverse relaxation time T2 in the myocardium by magnetic resonance imaging are considered to improve cardiac allograft rejection prediction [237]. For renal allograft, the prognosis is generally based on creatinemia evolution and glomerular filtration. This prediction can be improved by calculat-

ing the kidney transplant failure score (KTFS) considering not only the creatinemia at 3 and 12 months post graft, but also the proteinuria at 12 months, the number of previous transplantations, the age and sex of the donor, the creatinemia of the donor at the harvesting time, and the incidence of an acute graft rejection in first year post transplantation [238].

Noncompliant patients spontaneously developing an operational tolerance to their graft are useful to identify new biomarkers and adapt in real time the care of patients. By comparing phenotypes of cells and cytokines from tolerant patients with healthy volunteers and patients rejecting their graft, we should be able to identify markers correlating with the immune status toward the graft. However, studies are limited to blood and urine analysis because of the ethical question of performing a biopsy of a tolerated graft. Kidney-grafted spontaneous operational tolerant patients are defined as having ceased all immunosuppressive drugs for more than one year, with no increase in serum creatinine during the last 12 months (CRT < 10%). Using microarray analysis, Brouard, Newell, and Sagoo compared genes differentially expressed in tolerant recipients with patients exhibiting chronic rejection [181, 239, 240]. Tolerant patients showed a reduction of activation markers of proinflammatory T cells, a down-regulation of pro-inflammatory cytokines [239], a GATA3 upregulation suggesting a Th2 deviation [241], and an increase in CD4⁺CD45RA⁺Foxp3^{hi} memory Tregs versus patients with chronic rejection [3, 242, 243]. Interestingly, the three distinct studies and cohorts converge also with an increase of B cells in blood and CD20 transcript in urine in tolerant patients [180, 181, 240]. However, the phenotype of B cells named Bregs they described diverges [180, 181, 240, 244]. In liver-grafted spontaneous operational tolerant patients, higher numbers of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T cells, Vδ1⁺ T cells, and NK cells were detected [245, 246].

The heterogeneity of treatments, in terms of dose and type of immunosuppressors administered to patients during chronic rejection episodes, and the heterogeneity of the parameters selected to monitor regulatory cells activity in the recent trials, prevents comparison of the results. To define general tolerance signatures, consortiums as The ONE Study and EU COST Action “BM1305: action to focus and accelerate cell-based tolerance-inducing therapies,” standardized immune monitoring of patients included in clinical trial [247]. Six panels of 7–9 markers designed are now standardized within 8 international laboratories to monitor T cells, B cells, and DCs [247].

Newly described cytokines associated with regulatory cells should be considered as prognostic markers. Recently, IL-34 has been closely associated with Tregs and M2 macrophages [173]. FGL2, produced by Tregs and generating Bregs, could also reflecting immune status of the graft [248]. Furthermore, nucleic acid analysis suggests new biomarkers for allograft rejection, such as donor-derived cell-free DNA (ddcfDNA) [249], OX40 [250], OX40L [250], PD-1 [250], Foxp3 [250] mRNA levels in urinary cells, and A20 [251], HO-1 [251], granzyme B [251], perforin [251], and Tim-3 mRNA [252] in both urinary cells and PBLs.

4.2. From patients observation to action

Many immunosuppressive drugs were developed these last decades. By targeting many cell types at different levels/pathways, their association largely contains the immune responses against the allograft. Briefly, glucocorticoids and calcineurin inhibitors (ciclosporin, tacroli-

mus) inhibit cytokine transcription in T lymphocytes and macrophages; mTOR inhibitors (rapamycin, everolimus [253]) inhibit expression of costimulatory molecules on APCs and T lymphocytes proliferation; cytostatics (cyclophosphamide, methotrexate, azathioprine) and purines inhibitors (mycophenolate mofetil) inhibit T and B cell divisions; antibodies targeting thymocytes (ATG, thymoglobulin), CD3 or CD52 (Campath-1H) deplete T lymphocytes, CD25 (basiliximab, daclizumab) inhibit T lymphocytes activation, and CD20 (rituximab) and CD52 deplete B lymphocytes; sphingosine 1 phosphate inhibitor FTY720 (Fingolimod) retain lymphocytes in lymphoid organs and decrease their circulation in blood; efalizumab inhibits LFA-1 functions. However, drawbacks and side effects they induce are still unresolved.

The identification of new immunoregulatory mediators and the recent findings regarding regulatory cells over-represented in tolerant patients whereas lacking in graft-rejecting ones suggest new therapeutic strategies to control the immune balance. Several cytokines and antibodies have shown promising results in animal models. It has recently been shown that the cytokine IL-34 is able to induce Tregs through conversion of regulatory macrophages [173]. Similarly, FGL2 can induce Bregs [248]. In addition, antibodies blocking costimulatory pathway like CD28 antagonist (FR104) or antibodies targeting TCR-associated signaling (CD45RC [254]) or DR3 [255] marker seem efficient to decrease T-cell function whereas promoting Tregs [55, 99, 256]. The promotion of regulatory cells is likely to induce lower drawback than classical broad-spectrum drugs.

Immunoregulatory cell therapy may be able to support peripheral tolerance and aims to induce a donor-specific unresponsiveness. This personalized method consists in harvesting blood cells from a patient, isolating and expanding *ex vivo* regulatory cells before re-infusing them to the patient in order to control allogeneic response against the graft in solid organ transplantation, or to control allogeneic response against the recipient infused with hematopoietic stem cells (HSCT) to avoid a GVHD reactions.

The first clinical trial was realized in 2009 by Trzonkowski et al, using 10^5 Tregs/kg expanded CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Tregs to reduce chronic GVHD symptoms [257]. In 2011, Brunstein began a phase I clinical trial and to date showed that until 3×10^6 expanded Tregs would be safe and efficient to reduce the incidence of grade II–IV aGVHD [258]. The same year, Di anni showed that freshly purified CD4⁺CD25⁺ Tregs counteracts the GVHD potential of a high number of donor Tcons in HLA-haploidentical HSCT [259]. In 2014, Martelli confirmed in a phase II clinical trial that co-infusion of freshly purified CD4⁺CD25⁺ Tregs significantly reduces GVHD incidence without affecting GVL (graft versus leukemia) effect [260]. In 2014, Bacchetta infused 10^5 donor T lymphocytes pretreated with IL-10/kg into recipient of HSCT and showed the protective effect of TR1 cells against GVHD [261]. Whereas these first clinical studies focused on Tregs in HSCT, several alternative regulatory cell types have been identified as potential sources for immunotherapies in solid organ transplantation. The EU-funded international ONE study consortium considers several immunoregulatory cell-based therapies for clinical management of solid organ transplant recipients and shares a common clinical protocol design. The ONE Study project titled “A Unified Approach to Evaluating Cellular Immunotherapy in Solid Organ Transplantation” aims to compare the feasibility and the potential of cell therapy by using MDSCs, Mregs, DC-10, Tol-DCs [262], rapa-DCs, monocytes conditioned with

mesenchymal stem cells [263], Tr1 [264], and CD4⁺ Tregs [265]. CD8⁺ Tregs are now approaching clinical tests [266–268] and Bregs are also considered as a tool for cell therapy [269].

Success of cell therapy to control allogeneic immune responses against the donor depends on regulatory properties of cells and on the number of regulatory cells infused into the recipient. Based on animal models and preclinical models of humanized mice, about 7 to 11 × 10⁸ Tregs/kg would be necessary to control allogeneic response [270]. However, we have to consider the *in vivo* proliferation of Tregs after infusion [271]. Thus, the maximal infusible dose approved by The ONE Study for safety is 10⁷ Tregs/kg [265]. Nowadays, Tregs from patients can be 100 to 1000 fold short-term expanded *ex vivo* while keeping their suppressive properties [272–274].

Importantly, clinical protocols also consider specificity of therapeutic cells against the graft donor. Indeed, antigen-specific Tregs have been shown more efficient in inhibiting anti-donor immune response [275]. The frequency of direct alloreactive Tregs has been estimated to 1–10% of total Tregs [276]. Injecting more donor-specific cells would amount to inject fewer cells, and to reduce nonspecific unwanted drawbacks. For Tang and Bluestone, the effect induced by 5 × 10⁹ polyclonal CD4⁺ Tregs would be equivalent to the effect induced by 1.5 × 10⁸ to 1 × 10⁹ allogeneic Tregs [277]. That is why processes have been developed to expand Tregs specifically with APCs or antigen derived from the HLA donor. Indeed, CD4⁺ Tregs expanded with donor DCs or B cells, or by indirect presentation of donor cell lysate antigen onto recipient APCs [276], showed a higher suppressive activity compared to polyclonally expanded Tregs [275, 278–280]. Similar protocols were used to generate donor-specific CD8⁺ Tregs [266]. Whereas TCR repertoire of donor APCs-expanded Tregs is still diverse, Tregs relatively efficiently reduce alloreactive T cell response without compromising general immunity according to mice models [266, 279]. Based on their capacity of infectious tolerance, Ag-specific Tregs can exert dominant tolerance to alloantigen *in vivo* by inducing regulatory properties in alloreactive T cells [281]. The identification of a unique shared peptide is of crucial interest today. Tregs with a unique antigen specificity can also be isolated and then expanded for cell therapy [282], or selected during the expansion by indirect presentation of one peptide [150, 267, 283]. Genetic engineering used to confer a TCR specificity to lymphocytes to redirect T cells in cancer immunotherapy [284, 285] offers new possibilities to obtain Tregs with an artificial specificity toward the graft donor Ag.

As cells will be re-infused into the patient, all reagents used to culture cells have to be validated for “clinical grade,” and after expansion, cells are analyzed for purity and stability. Tregs are phenotypically characterized for expression of helios [167], DNA methylation status of the TSDR (Treg specific demethylated region) [286], while Foxp3 expression is no more sufficient [287], and tested in *in vitro* suppression assay.

Cell therapy strategy would allow reducing the use of conventional immunosuppression in organ transplant recipients; nevertheless, clinical trials are rarely totally free of drugs for patients’ safety. This could affect regulatory cells survival and functions. Indeed, tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF), and methylprednisolone do not affect phenotype, function, or stability of Tregs, but reduce their proliferative capacity, whereas rapamycin did not [288–290]. Moreover, rapamycin is sometimes used to maintain regulatory properties of Tregs during expansion culture and also to convert conventional CD4⁺ T cells into Tregs *ex vivo* [291].

By targeting upstream IL-2 synthesis, cyclosporine A compromises the homeostatic behaviour of CD4⁺ Tregs in peripheral immune compartments [292]. On the contrary, FTY720 synergizes with rapamycin for the conversion of CD4⁺ Tregs [293]. Thus, the choice of drugs combined with cell therapy has to be considered.

5. Conclusion

Research in transplantation has made considerable progresses improving transplantation outcomes, but important obstacles remain. Induction of tolerance is considered as the key to reduce the impact of toxic side effects of general immunosuppressive drugs. Better definition of immune tolerance mechanisms in human should lead to a better understanding of the potential effects of targeting strategies.

Author details

Laetitia Boucault, Séverine Bézie, Jason Ossart and Carole Guillonnet*

*Address all correspondence to: carole.guillonnet@univ-nantes.fr

INSERM UMR1064, Center for Research in Transplantation and Immunology-ITUN, Nantes University Hospital, Medicine University, University of Nantes, France

References

- [1] Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009;69(16):2227–43.
- [2] Ashton-Chess J, Giral M, Brouard S, Souillou J-P. Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation* 2007;84(10):1215–9.
- [3] Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1848–61.
- [4] Porter KA. Morphological aspects of renal homograft rejection. *Br Med Bull*. 1965;21:171–5.

- [5] Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966;2(7465):662–5.
- [6] Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation* 1990;49(1):85–91.
- [7] Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation* 1992;53(3):550–5.
- [8] Lechler RI, Batchelor JR. Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 1982;155(1):31–41.
- [9] Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005;5(9):2248–52.
- [10] Nankivell BJ, Kuypers DRJ. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet Lond Engl.* 2011;378(9800):1428–37.
- [11] Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(5):682–8.
- [12] Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *J Exp Med.* 1990;171(1):307–14.
- [13] Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE, Popma SH, et al. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002;169(11):6154–61.
- [14] Celli S, Albert ML, Bousso P. Visualizing the innate and adaptive immune responses underlying allograft rejection by two-photon microscopy. *Nat Med.* 2011;17(6):744–9.
- [15] He C, Heeger PS. CD8 T cells can reject major histocompatibility complex class I-deficient skin allografts. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2004;4(5):698–704.
- [16] Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557–69.
- [17] Steele DJ, Laufer TM, Smiley ST, Ando Y, Grusby MJ, Glimcher LH, et al. Two levels of help for B cell alloantibody production. *J Exp Med.* 1996;183(2):699–703.
- [18] Auchincloss H, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of “indirect” recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(8):3373–7.

- [19] Morón G, Dadaglio G, Leclerc C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol.* 2004;25(2):92–7.
- [20] Fluck N, Witzke O, Morris PJ, Wood KJ. Indirect allorecognition is involved in both acute and chronic allograft rejection. *Transplant Proc.* 1999;31(1–2):842–3.
- [21] Dalchau R, Fangmann J, Fabre JW. Allorecognition of isolated, denatured chains of class I and class II major histocompatibility complex molecules. Evidence for an important role for indirect allorecognition in transplantation. *Eur J Immunol.* 1992;22(3):669–77.
- [22] Issa F, Schiopu A, Wood KJ. Role of T cells in graft rejection and transplantation tolerance. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(1):155–69.
- [23] Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173(8):4828–37.
- [24] Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(5):550–7.
- [25] Brown K, Sacks SH, Wong W. Coexpression of donor peptide/recipient MHC complex and intact donor MHC: evidence for a link between the direct and indirect pathways. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011;11(4):826–31.
- [26] Huesmann M, Scott B, Kisielow P, von Boehmer H. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 1991;66(3):533–40.
- [27] Merckenschlager M, Graf D, Lovatt M, Bommhardt U, Zamoyska R, Fisher AG. How many thymocytes audition for selection? *J Exp Med.* 1997;186(7):1149–58.
- [28] Cosgrove D, Chan SH, Waltzinger C, Benoist C, Mathis D. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4+ T cells. *Int Immunol.* 1992;4(6):707–10.
- [29] Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996;383(6595):81–5.
- [30] Capone M, Romagnoli P, Beermann F, MacDonald HR, van Meerwijk JP. Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 2001;97(5):1336–42.
- [31] Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298(5597):1395–401.

- [32] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med*. 2004;200(8):1039–49.
- [33] Hinterberger M, Aichinger M, Prazeres da Costa O, Voehringer D, Hoffmann R, Klein L. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11(6):512–9.
- [34] Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med*. 2009;206(7):1505–13.
- [35] Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 1995;3(4):407–15.
- [36] Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med*. 2000;6(1):56–61.
- [37] Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. 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* 2000;13(6):829–40.
- [38] Walker LSK, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(1):11–9.
- [39] Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, et al. Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65(2):305–17.
- [40] Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med*. 1998;188(2):409–14.
- [41] Dhein J, Walczak H, Bäuml C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 1995;373(6513):438–41.
- [42] Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, Roberts IA, Debatin KM, Fischer A, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 1995;268(5215):1347–9.
- [43] Ferber I, Schönrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hämmerling GJ, Arnold B. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 1994;263(5147):674–6.
- [44] Förster I, Hirose R, Arbeit JM, Clausen BE, Hanahan D. Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* 1995;2(6):573–85.

- [45] Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Sarin A, Berzofsky JA. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med*. 1996;184(2):485–92.
- [46] Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996;87(2):319–29.
- [47] Russell DM, Dembić Z, Morahan G, Miller JF, Bürki K, Nemazee D. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 1991;354(6351):308–11.
- [48] Cyster JG, Hartley SB, Goodnow CC. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* 1994;371(6496):389–95.
- [49] Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1987;165(2):302–19.
- [50] Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990;248(4961):1349–56.
- [51] Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305–34.
- [52] Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305–34.
- [53] Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol*. 1998;18(5):389–418.
- [54] Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;172(5):2778–84.
- [55] Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med*. 2010;2(17):17ra10.
- [56] Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1(5):405–13.
- [57] Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation* 2012;93(1):1–10.
- [58] Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, et al. PD-1-mediated suppression of IL-2 production induces CD8+ T cell anergy in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(11):6682–9.
- [59] Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, et al. Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1995;182(1):33–40.

- [60] McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DN. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol.* 1996;26(6): 1204–10.
- [61] Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res.* 2003;92(9):1041–8.
- [62] Kehry MR. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1996;156(7):2345–8.
- [63] Ludewig B, Henn V, Schröder JM, Graf D, Kroczeck RA. Induction, regulation, and function of soluble TRAP (CD40 ligand) during interaction of primary CD4⁺ CD45RA⁺ + T cells with dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(12):3137–43.
- [64] Gauchat JF, Henchoz S, Fattah D, Mazzei G, Aubry JP, Jomotte T, et al. CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur J Immunol.* 1995;25(3):863–5.
- [65] Pinchuk LM, Klaus SJ, Magaletti DM, Pinchuk GV, Norsen JP, Clark EA. Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1996;157(10):4363–70.
- [66] Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Bourcier T, Bonnefoy JY, Pober JS, et al. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1931–6.
- [67] Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LS, Lipsky PE. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995;154(10):4996–5010.
- [68] Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev.* 1996;153:85–106.
- [69] Peng X, Kasran A, Warmerdam PA, de Boer M, Ceuppens JL. Accessory signaling by CD40 for T cell activation: induction of Th1 and Th2 cytokines and synergy with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* 1996;26(7):1621–7.
- [70] Barrett TB, Shu G, Clark EA. CD40 signaling activates CD11a/CD18 (LFA-1)-mediated adhesion in B cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1991;146(6):1722–9.
- [71] Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R. Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2000;165(3):1175–81.
- [72] Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J Exp Med.* 1998;187(2):177–83.

- [73] Chai JG, Bartok I, Scott D, Dyson J, Lechler R. T:T antigen presentation by activated murine CD8+ T cells induces anergy and apoptosis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998;160(8):3655–65.
- [74] Gauld SB, Benschop RJ, Merrell KT, Cambier JC. Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nat Immunol*. 2005;6(11):1160–7.
- [75] Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krahrl T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162(5):2511–20.
- [76] Young DA, Lowe LD, Booth SS, Whitters MJ, Nicholson L, Kuchroo VK, et al. 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. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164(7):3563–72.
- [77] Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplant Proc*. 2008;40(10):3390–2.
- [78] Yin H, Li X-Y, Jin X-B, Zhang B-B, Gong Q, Yang H, et al. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. *Transplantation* 2010;89(10):1189–97.
- [79] Amarnath S, Chen H, Foley JE, Costanzo CM, Sennesh JD, Solomon MA, et al. Host-based Th2 cell therapy for prolongation of cardiac allograft viability. *PLoS One* 2011;6(4):e18885.
- [80] Zhang D, Sanchez-Fueyo A, Kawamoto K, Alexopoulos SP, Zhang W, Zheng XX. Th1 to Th2 immune deviation facilitates, but does not cause, islet allograft tolerance in mice. *Cytokine* 2010;51(3):311–9.
- [81] Xie A, Wang S, Zhang K, Wang G, Ye P, Li J, et al. Treatment with interleukin-12/23p40 antibody attenuates acute cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2011;91(1):27–34.
- [82] Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1024:124–37.
- [83] Libetta C, Sepe V, Zucchi M, Portalupi V, Meloni F, Rampino T, et al. The effect of sirolimus- or cyclosporine-based immunosuppression effects on T-cell subsets in vivo. *Kidney Int*. 2007;72(1):114–20.
- [84] Sayegh MH, Akalin E, Hancock WW, Russell ME, Carpenter CB, Linsley PS, et al. CD28-B7 blockade after alloantigenic challenge in vivo inhibits Th1 cytokines but spares Th2. *J Exp Med*. 1995;181(5):1869–74.
- [85] Lazarovits AI, Poppema S, Zhang Z, Khandaker M, Le Feuvre CE, Singhal SK, et al. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 1996;380(6576):717–20.

- [86] Hancock WW, Sayegh MH, Zheng XG, Peach R, Linsley PS, Turka LA. Costimulatory function and expression of CD40 ligand, CD80, and CD86 in vascularized murine cardiac allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13967–72.
- [87] Baliga P, Chavin KD, Qin L, Woodward J, Lin J, Linsley PS, et al. CTLA4Ig prolongs allograft survival while suppressing cell-mediated immunity. *Transplantation* 1994;58(10):1082–90.
- [88] Chen L, Wang T, Zhou P, Ma L, Yin D, Shen J, et al. TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2006;6(10):2282–91.
- [89] Bézie S, Picarda E, Tesson L, Renaudin K, Durand J, Ménoret S, et al. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PloS One* 2015;10(3):e0119686.
- [90] Lin H, Bolling SF, Linsley PS, Wei RQ, Gordon D, Thompson CB, et al. Long-term acceptance of major histocompatibility complex mismatched cardiac allografts induced by CTLA4Ig plus donor-specific transfusion. *J Exp Med*. 1993;178(5):1801–6.
- [91] Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med*. 2000;6(2):114.
- [92] Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, et al. A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(3):719–27.
- [93] Shock A, Burkly L, Wakefield I, Peters C, Garber E, Ferrant J, et al. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:234.
- [94] Tocoian A, Buchan P, Kirby H, Soranson J, Zamacona M, Walley R, et al. First-in-human trial of the safety, pharmacokinetics and immunogenicity of a PEGylated anti-CD40L antibody fragment (CDP7657) in healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2015;24(10):1045–56.
- [95] Xie JH, Yamniuk AP, Borowski V, Kuhn R, Susulic V, Rex-Rabe S, et al. Engineering of a novel anti-CD40L domain antibody for treatment of autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;192(9):4083–92.
- [96] Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):118–30.
- [97] Legrand N, Cupedo T, van Lent AU, Ebeli MJ, Weijer K, Hanke T, et al. Transient accumulation of human mature thymocytes and regulatory T cells with CD28 superagonist in “human immune system” Rag2(-/-)gammac(-/-) mice. *Blood* 2006;108(1):238–45.

- [98] Ji M, Jin X, Phillips P, Yi S. A humanized mouse model to study human immune response in xenotransplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPD INT*. 2012;11(5):494–8.
- [99] Poirier N, Mary C, Dilek N, Hervouet J, Minault D, Blancho G, et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2012;12(10):2630–40.
- [100] Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168(3):1080–6.
- [101] Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker-Burden C, et al. Long-term acceptance of skin and cardiac allografts after blocking CD40 and CD28 pathways. *Nature* 1996;381(6581):434–8.
- [102] Honey K, Cobbold SP, Waldmann H. CD40 ligand blockade induces CD4+ T cell tolerance and linked suppression. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;163(9):4805–10.
- [103] Feng G, Nadig SN, Bäckdahl L, Beck S, Francis RS, Schiopu A, et al. Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection. *Sci Transl Med*. 2011;3(83):83ra40.
- [104] Lafferty KJ, Woolnough J. The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol Rev*. 1977;35:231–62.
- [105] Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei RQ, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(22):11102–5.
- [106] Ford ML, Larsen CP. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol Rev*. 2009;229(1):294–306.
- [107] Li XC, Strom TB, Turka LA, Wells AD. T cell death and transplantation tolerance. *Immunity* 2001;14(4):407–16.
- [108] Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991;174(3):561–9.
- [109] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233–58.
- [110] Azuma H, Chandraker A, Nadeau K, Hancock WW, Carpenter CB, Tilney NL, et al. Blockade of T-cell costimulation prevents development of experimental chronic renal allograft rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(22):12439–44.
- [111] Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 1992;257(5071):789–92.

- [112] Sayegh MH, Zheng XG, Magee C, Hancock WW, Turka LA. Donor antigen is necessary for the prevention of chronic rejection in CTLA4Ig-treated murine cardiac allograft recipients. *Transplantation* 1997;64(12):1646–50.
- [113] Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN, Davis TA, Dong Y, Gray GS, et al. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(16):8789–94.
- [114] Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008;322(5899):271–5.
- [115] Zhang T, Fresnay S, Welty E, Sangrampurkar N, Rybak E, Zhou H, et al. Selective CD28 blockade attenuates acute and chronic rejection of murine cardiac allografts in a CTLA-4-dependent manner. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011;11(8):1599–609.
- [116] Markees TG, Phillips NE, Gordon EJ, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, et al. 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. *J Clin Invest.* 1998;101(11):2446–55.
- [117] Guillonneau C, Séveno C, Dugast A-S, Li X-L, Renaudin K, Haspot F, et al. Anti-CD28 antibodies modify regulatory mechanisms and reinforce tolerance in CD40Ig-treated heart allograft recipients. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;179(12):8164–71.
- [118] Haspot F, Séveno C, Dugast A-S, Coulon F, Renaudin K, Usal C, et al. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2005;5(10):2339–48.
- [119] Mary C, Coulon F, Poirier N, Dilek N, Martinet B, Blanche G, et al. Antagonist properties of monoclonal antibodies targeting human CD28. *mAbs* 2013;5(1):47–55.
- [120] Yao S, Zhu Y, Zhu G, Augustine M, Zheng L, Goode DJ, et al. B7-H2 Is a Costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 2011;34(5):729–40.
- [121] Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006;355(10):1018–28.
- [122] Markees TG, Phillips NE, Noelle RJ, Shultz LD, Mordes JP, Greiner DL, et al. Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand. *Transplantation* 1997;64(2):329–35.
- [123] Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K, et al. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med.* 1999;5(6):686–93.
- [124] Elster EA, Xu H, Tadaki DK, Montgomery S, Burkly LC, Berning JD, et al. Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute

rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 2001;72(9):1473–8.

- [125] Monk NJ, Hargreaves REG, Marsh JE, Farrar CA, Sacks SH, Millrain M, et al. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med.* 2003;9(10):1275–80.
- [126] Blair PJ, Riley JL, Harlan DM, Abe R, Tadaki DK, Hoffmann SC, et al. Cd40 ligand (Cd154) triggers a short-term Cd4+ T cell activation response that results in secretion of immunomodulatory cytokines and apoptosis. *J Exp Med.* 2000;191(4):651–60.
- [127] Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, Appel MC, Steele AW, Durie FH, et al. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(21):9560–4.
- [128] Omoto K, Nishimura Y, Nomoto K, Kong YY, Umesue M, Murakami Y, et al. Anti-CD4 monoclonal antibody reduces the dose of cyclophosphamide required to induce tolerance to H-2 haplotype identical skin allografts in mice. *Immunobiology* 1996;195(1):16–32.
- [129] Mayumi H, Good RA. The necessity of both allogeneic antigens and stem cells for cyclophosphamide-induced skin allograft tolerance in mice. *Immunobiology* 1989;178(4-5):287–304.
- [130] Seung E, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL. Hematopoietic chimerism and central tolerance created by peripheral-tolerance induction without myeloablative conditioning. *J Clin Invest.* 2003;112(5):795–808.
- [131] Guillot C, Guillonneau C, Mathieu P, Gerdes CA, Ménoret S, Braudeau C, et al. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40Ig results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2002;168(4):1600–9.
- [132] Guillonneau 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;117(4):1096–106.
- [133] Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 1999;402(6763):827–32.
- [134] Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 2001;409(6816):97–101.
- [135] Dong C, Temann UA, Flavell RA. Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001;166(6):3659–62.
- [136] Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 2001;409(6816):105–9.

- [137] Salama AD, Yuan X, Nayer A, Chandraker A, Inobe M, Uede T, et al. Interaction between ICOS-B7RP1 and B7-CD28 costimulatory pathways in alloimmune responses in vivo. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2003;3(4):390–5.
- [138] Guillonnet C, Aubry V, Renaudin K, Séveno C, Usal C, Tezuka K, et al. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation* 2005;80(4):546–54.
- [139] Guillonnet C, Louvet C, Renaudin K, Heslan J-M, Heslan M, Tesson L, et al. The role of TNF-related activation-induced cytokine–receptor activating NF- κ B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol.* 2004;172(3):1619–29.
- [140] Ozkaynak E, Wang L, Goodearl A, McDonald K, Qin S, O’Keefe T, et al. Programmed death-1 targeting can promote allograft survival. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2002;169(11):6546–53.
- [141] Aramaki O, Shirasugi N, Takayama T, Shimazu M, Kitajima M, Ikeda Y, et al. Programmed death-1-programmed death-L1 interaction is essential for induction of regulatory cells by intratracheal delivery of alloantigen. *Transplantation* 2004;77(1):6–12.
- [142] Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH, Noelle RJ. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(27):9331–6.
- [143] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Break-down of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;155(3):1151–64.
- [144] Shevach EM. The resurrection of T cell-mediated suppression. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2011;186(7):3805–7.
- [145] Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005;22(3):329–41.
- [146] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609):1057–61.
- [147] Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 1970;18(5):723–37.
- [148] Paiva RS, Lino AC, Bergman M-L, Caramalho I, Sousa AE, Zelenay S, et al. Recent thymic emigrants are the preferential precursors of regulatory T cells differentiated in the periphery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(16):6494–9.

- [149] Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009;30(5):626–35.
- [150] Picarda E, Bézie S, Venturi V, Echasserieau K, Mérieau E, Delhumeau A, et al. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2497–512.
- [151] Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*. 2002;3(2):135–42.
- [152] Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000;192(2):303–10.
- [153] Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;169(5):2461–5.
- [154] Huang C-T, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004;21(4):503–13.
- [155] Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med*. 2006;203(7):1701–11.
- [156] Ligocki AJ, Niederkorn JY. Advances on Non-CD4⁺ Foxp3⁺ T regulatory cells: CD8⁺, type 1, and double negative t regulatory cells in organ transplantation. *Transplantation* 2015;99(8):1553–9.
- [157] Ménoret S, Guillonnet C, Bezié S, Caron L, Anegon I, Li X-L. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;677:63–83.
- [158] Niederkorn JY. Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Curr Opin Immunol*. 2008;20(3):327–31.
- [159] Guillonnet 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- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2007;117(4):1096–106.
- [160] Guillonnet C, Picarda E, Anegon I. CD8⁺ regulatory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(6):751–6.
- [161] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4(4):330–6.
- [162] Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells. *Adv Immunol*. 2003;81:331–71.

- [163] Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1713–22.
- [164] Morgan ME, van Bilsen JHM, Bakker AM, Heemskerk B, Schilham MW, Hartgers FC, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol.* 2005;66(1):13–20.
- [165] Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010;184(7):3433–41.
- [166] Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(10):1713–22, S1–19.
- [167] Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, Brown FD, Moffett H, Lemieux ME, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science* 2015;350(6258):334–9.
- [168] Lee WT, Prasad A, Watson ARO. Anergy in CD4 memory T lymphocytes. II. Abrogation of TCR-induced formation of membrane signaling complexes. *Cell Immunol.* 2012;276(1-2):26–34.
- [169] Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):762–74.
- [170] Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 2004;104(9):2840–8.
- [171] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204(6):1257–65.
- [172] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1353–62.
- [173] Bézie S, Picarda E, Ossart J, Tesson L, Usal C, Renaudin K, et al. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J Clin Invest.* 2015;125(10):3952–64.
- [174] Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DAA. Cutting edge: human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2011;186(12):6661–6.

- [175] Chesneau M, Michel L, Dugast E, Chenouard A, Baron D, Pallier A, et al. Tolerant kidney transplant patients produce b cells with regulatory properties. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2015;26(10):2588–98.
- [176] Bézie S, Picarda E, Ossart J, Martinet B, Anegon I, Guillonneau C. Compensatory regulatory networks between CD8 T, B, and myeloid cells in organ transplantation tolerance. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195(12):5805–15.
- [177] Durand J, Chiffolleau E. B cells with regulatory properties in transplantation tolerance. *World J Transplant*. 2015;5(4):196–208.
- [178] Dugast A-S, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180(12):7898–906.
- [179] Dilek N, Poirier N, Usal C, Martinet B, Blancho G, Vanhove B. Control of transplant tolerance and intragraft regulatory T cell localization by myeloid-derived suppressor cells and CCL5. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;188(9):4209–16.
- [180] Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, et al. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*. 2010;78(5):503–13.
- [181] Newell KA, Asare A, Kirk AD, Gisler TD, Bourcier K, Suthanthiran M, et al. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1836–47.
- [182] Mauri C, Blair PA. Regulatory B cells in autoimmunity: developments and controversies. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(11):636–43.
- [183] Le Texier L, Thebault P, Lavault A, Usal C, Merieau E, Quillard T, et al. Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(3):429–38.
- [184] Bouaziz J-D, Le Buanec H, Saussine A, Bensussan A, Bagot M. IL-10 producing regulatory B cells in mice and humans: state of the art. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):519–27.
- [185] Qian L, Qian C, Chen Y, Bai Y, Bao Y, Lu L, et al. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}FcγRIIb^{hi} regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood*. 2012;120(3):581–91.
- [186] Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):391–7.
- [187] Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;182(12):7459–72.

- [188] Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010;32(1):129–40.
- [189] Durand J, Huchet V, Merieau E, Usal C, Chesneau M, Remy S, et al. Regulatory B Cells with a Partial Defect in CD40 Signaling and Overexpressing Granzyme B Transfer Allograft Tolerance in Rodents. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195(10):5035–44.
- [190] Kim JI, Rothstein DM, Markmann JF. Role of B cells in tolerance induction. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015;20(4):369–75.
- [191] Deng S, Moore DJ, Huang X, Lian M-M, Mohiuddin M, Veledeoglu E, et al. Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 May 15;178(10):6028–32.
- [192] Darrasse-Jèze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T, Yao K, et al. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2009;206(9):1853–62.
- [193] Manicassamy S, Pulendran B. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*. 2011;241(1):206–27.
- [194] Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010;108:111–65.
- [195] Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi M-C. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res*. 2012;1(1):13.
- [196] Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers F, Starzl TE, et al. Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* 1996;62(5):659–65.
- [197] Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rössner S, et al. 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. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):1813–22.
- [198] Hill M, Thebault P, Segovia M, Louvet C, Bériou G, Tilly G, et al. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2011;11(10):2036–45.
- [199] Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, et al. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014;14(5):1021–31.

- [200] Chauveau C, Rémy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert F-X, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2005;106(5):1694–702.
- [201] Rogers NM, Isenberg JS, Thomson AW. Plasmacytoid dendritic cells: no longer an enigma and now key to transplant tolerance? *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2013;13(5):1125–33.
- [202] 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 Baltim Md 1950*. 2010;185(2):823–33.
- [203] Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol*. 2006;7(6):652–62.
- [204] Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;173(7):4433–42.
- [205] Boor PPC, Metselaar HJ, Jonge S de, Mancham S, van der Laan LJW, Kwekkeboom J. Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺LAG-3⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(6):1663–74.
- [206] Gilliet M, Liu Y-J. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195(6):695–704.
- [207] Tokita D, Mazariegos GV, Zahorchak AF, Chien N, Abe M, Raimondi G, et al. High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance. *Transplantation* 2008;85(3):369–77.
- [208] Manavalan JS, Kim-Schulze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, et al. Alloantigen specific CD8⁺CD28[−]FOXP3⁺ T suppressor cells induce ILT3⁺ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol*. 2004;16(8):1055–68.
- [209] Chiffolleau E, Bériou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou J-P, Cuturi MC. Role for thymic and splenic regulatory CD4⁺ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168(10):5058–69.
- [210] Degauque N, Lair D, Dupont A, Moreau A, Roussey G, Moizant F, et al. Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103⁺ cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;176(7):3915–22.
- [211] Josien R, Heslan M, Brouard S, Soulillou JP, Cuturi MC. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 1998;92(12):4539–44.

- [212] Broichhausen C, Riquelme P, Geissler EK and Hutchinson JA. Regulatory macrophages as therapeutic targets and therapeutic agents in solid organ transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2012;17(4):332–342.
- [213] Elhage R, Cheraï M, Levacher B, Darrasse-Jeze G, Baillou C, Zhao X, et al. C-terminal cleavage of human Foxp3 at a proprotein convertase motif abrogates its suppressive function. *Scand J Immunol.* 2015;81(4):229–39.
- [214] Liu G, Duan K, Ma H, Niu Z, Peng J, Zhao Y. An instructive role of donor macrophages in mixed chimeras in the induction of recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cells. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(8):827–35.
- [215] 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;208(5):1069–82.
- [216] Wood KJ, Bushell A, Hester J. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(6):417–30.
- [217] Darrasse-Jeze G, Darasse-Jeze G, Klatzmann D, Charlotte F, Salomon BL, Cohen JL. CD4+CD25+ regulatory/suppressor T cells prevent allogeneic fetus rejection in mice. *Immunol Lett.* 2006;102(1):106–9.
- [218] Taieb J, Chaput N, Schartz N, Roux S, Novault S, Ménard C, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176(5):2722–9.
- [219] Dilek N, Vuillefroy de Silly R, Blanche G, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Front Immunol.* 2012;3:208.
- [220] Dilek N, van Rompaey N, Le Moine A, Vanhove B. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(6):765–8.
- [221] Jiang S, Lechler RI, He X-S, Huang J-F. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol.* 2006;67(10):765–76.
- [222] Ordonez L, Bernard I, L'faqihi-Olive F-E, Tervaert JWC, Damoiseaux J, Saoudi A. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PloS One* 2009;4(4):e5287.
- [223] Kamanaka M, Huber S, Zenewicz LA, Gagliani N, Rathinam C, O'Connor W, et al. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *J Exp Med.* 2011;208(5):1027–40.
- [224] Fecteau S, Basadonna GP, Freitas A, Ariyan C, Sayegh MH, Rothstein DM. CTLA-4 up-regulation plays a role in tolerance mediated by CD45. *Nat Immunol.* 2001;2(1):58–63.
- [225] Auersvald LA, Rothstein DM, Oliveira SC, Khuong CQ, Basadonna GP. Anti-CD45RB treatment prolongs islet allograft survival in mice. *Transplant Proc.* 1997;29(1–2):771.

- [226] Moreau A, Hill M, Thébault P, Deschamps JY, Chiffolleau E, Chauveau C, et al. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J*. 2009;23(9):3070–7.
- [227] Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR. 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. *J Exp Med*. 1983;158(3):795–810.
- [228] Xystrakis E, Bernard I, Dejean AS, Alsaati T, Druet P, Saoudi A. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur J Immunol*. 2004;34(2):408–17.
- [229] Xystrakis E, Dejean AS, Bernard I, Druet P, Liblau R, Gonzalez-Dunia D, et al. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 2004;104(10):3294–301.
- [230] Powrie F, Mason D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med*. 1990;172(6):1701–8.
- [231] Laskowski IA, Pratschke J, Wilhelm MJ, Dong VM, Beato F, Taal M, et al. Anti-CD28 monoclonal antibody therapy prevents chronic rejection of renal allografts in rats. *J Am Soc Nephrol JASN*. 2002;13(2):519–27.
- [232] Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H. Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunol Rev*. 1996;149:5–33.
- [233] Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* 1993;259(5097):974–7.
- [234] Rothstein DM, Livak MF, Kishimoto K, Ariyan C, Qian HY, Fecteau S, et al. Targeting signal 1 through CD45RB synergizes with CD40 ligand blockade and promotes long term engraftment and tolerance in stringent transplant models. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001;166(1):322–9.
- [235] Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89–95.
- [236] Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2010;29(8):914–56.
- [237] Bonnemains L, Cherifi A, Girerd N, Odille F, Felblinger J. Design of the DRAGET Study: a multicentre controlled diagnostic study to assess the detection of acute rejection in patients with heart transplant by means of T2 quantification with MRI in comparison to myocardial biopsies. *BMJ Open*. 2015;5(10):e008963.

- [238] Foucher Y, Daguin P, Akl A, Kessler M, Ladrière M, Legendre C, et al. A clinical scoring system highly predictive of long-term kidney graft survival. *Kidney Int.* 2010;78(12):1288–94.
- [239] Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh S, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(39):15448–53.
- [240] Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010;120(6):1848–61.
- [241] Moraes-Vieira PMM, Takenaka MCS, Silva HM, Monteiro SM, Agena F, Lemos F, et al. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2012;142(2):117–26.
- [242] Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, et al. Central role of CD45RA-Foxp3hi memory regulatory T cells in clinical kidney transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2015;26(8):1795–805.
- [243] Moraes-Vieira PMM, Silva HM, Takenaka MCS, Monteiro SM, Lemos F, Saitovitch D, et al. Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals. *Hum Immunol.* 2010;71(5):442–50.
- [244] Martínez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2007;7(2):309–19.
- [245] Braza F, Souillou J-P, Brouard S. Gene expression signature in transplantation tolerance. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2012;413(17–18):1414–8.
- [246] Bohne F, Martínez-Llordella M, Lozano J-J, Miquel R, Benítez C, Londoño M-C, et al. Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest.* 2012;122(1):368–82.
- [247] Streitz M, Miloud T, Kapinsky M, Reed MR, Magari R, Geissler EK, et al. Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study. *Transplant Res.* 2013;2(1):17.
- [248] Bézie S, Picarda E, Tesson L, Renaudin K, Durand J, Ménoret S, et al. Fibrinogen-like protein 2/fibroleukin induces long-term allograft survival in a rat model through regulatory B cells. *PLoS One* 2015;10(3):e0119686.
- [249] Gielis EM, Ledeganck KJ, De Winter BY, Del Favero J, Bosmans J-L, Claas FHJ, et al. Cell-Free DNA: An Upcoming Biomarker in Transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2015;15(10):2541–51.

- [250] Afaneh C, Muthukumar T, Lubetzky M, Ding R, Snopkowski C, Sharma VK, et al. Urinary cell levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, or PD-L2 and acute rejection of human renal allografts. *Transplantation* 2010;90(12):1381–7.
- [251] Bodonyi-Kovacs G, Strom TB, Putheti P. A20--a biomarker of allograft outcome: a showcase in kidney transplantation. *Adv Exp Med Biol*. 2014;809:103–16.
- [252] Manfro RC, Aquino-Dias EC, Joelsons G, Nogare AL, Carpio VN, Gonçalves LFS. Noninvasive Tim-3 messenger RNA evaluation in renal transplant recipients with graft dysfunction. *Transplantation* 2008;86(12):1869–74.
- [253] Bertoni E, Larti A, Rosso G, Zanazzi M, Di Maria L, Salvadori M. Good outcomes with cyclosporine very low exposure with everolimus high exposure in renal transplant patients. *J Nephrol*. 2011;24(5):613–8.
- [254] Guillonneau 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;117(4):1096–106.
- [255] Kim B-S, Nishikii H, Baker J, Pierini A, Schneidawind D, Pan Y, et al. Treatment with agonistic DR3 antibody results in expansion of donor Tregs and reduced graft-versus-host disease. *Blood* 2015;126(4):546–57.
- [256] Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanco G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2005;353(8):770–81.
- [257] Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2009;133(1):22–6.
- [258] Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117(3):1061–70.
- [259] Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–8.
- [260] Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, et al. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood* 2014;124(4):638–44.
- [261] Bacchetta R, Lucarelli B, Sartirana C, Gregori S, Lupo Stanghellini MT, Miqueu P, et al. Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T cells. *Front Immunol*. 2014;5:16.
- [262] Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi M-C. Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation. *Transplant Res*. 2012;1(1):13.

- [263] Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol.* 2013;172(2):333–48.
- [264] Petrelli A, Tresoldi E, Mfarrej BG, Paganelli A, Spotti D, Caldara R, et al. Generation of donor-specific T regulatory type 1 cells from patients on dialysis for cell therapy after kidney transplantation. *Transplantation* 2015;99(8):1582–9.
- [265] Geissler EK. The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant Res.* 2012;1(1):11.
- [266] Zheng J, Liu Y, Liu Y, Liu M, Xiang Z, Lam K-T, et al. Human CD8+ regulatory T cells inhibit GVHD and preserve general immunity in humanized mice. *Sci Transl Med.* 2013;5(168):168ra9.
- [267] Picarda É, Ossart J, Bézie S, Guillonnet C. [Key role of allopeptide-specific CD8(+) Tregs in transplantation]. *Médecine Sci MS.* 2015;31(1):22–4.
- [268] Dai Z, Zhang S, Xie Q, Wu S, Su J, Li S, et al. Natural CD8+CD122+ T cells are more potent in suppression of allograft rejection than CD4+CD25+ regulatory T cells. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2014;14(1):39–48.
- [269] Nouël A, Simon Q, Jamin C, Pers J-O, Hillion S. Regulatory B cells: an exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front Immunol.* 2014;5:11.
- [270] Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17(4):349–54.
- [271] Nguyen VH, Zeiser R, Dasilva DL, Chang DS, Beilhack A, Contag CH, et al. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 2007;109(6):2649–56.
- [272] Nadig SN, Wieckiewicz J, Wu DC, Warnecke G, Zhang W, Luo S, et al. In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells. *Nat Med.* 2010;16(7):809–13.
- [273] Issa F, Hester J, Goto R, Nadig SN, Goodacre TE, Wood K. Ex vivo-expanded human regulatory T cells prevent the rejection of skin allografts in a humanized mouse model. *Transplantation* 2010;90(12):1321–7.
- [274] Wu DC, Hester J, Nadig SN, Zhang W, Trzonkowski P, Gray D, et al. Ex vivo expanded human regulatory T cells can prolong survival of a human islet allograft in a humanized mouse model. *Transplantation* 2013;96(8):707–16.
- [275] Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med.* 2011;3(83):83ra42.

- [276] Veerapathran A, Pidala J, Beato F, Yu X-Z, Anasetti C. Ex vivo expansion of human Tregs specific for alloantigens presented directly or indirectly. *Blood* 2011;118(20):5671–80.
- [277] Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(11) a015552
- [278] Cherai M, Hamel Y, Baillou C, Touil S, Guillot-Delost M, Charlotte F, et al. Generation of human alloantigen-specific regulatory T-cells under good manufacturing practice-compliant conditions for cell therapy. *Cell Transplant* 2015;24(12):2527–40.
- [279] Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M, Mintz MA, et al. Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2013;13(11):3010–20.
- [280] Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJPM, Joosten I. Ex vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4(pos)CD25(high) T cells for immunotherapy. *PloS One* 2008;3(5):e2233.
- [281] Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, et al. “Infectious” transplantation tolerance. *Science* 1993;259(5097):974–7.
- [282] Noyan F, Lee Y-S, Zimmermann K, Hardtke-Wolenski M, Taubert R, Warnecke G, et al. Isolation of human antigen-specific regulatory T cells with high suppressive function. *Eur J Immunol.* 2014;44(9):2592–602.
- [283] Veerapathran A, Pidala J, Beato F, Betts B, Kim J, Turner JG, et al. Human regulatory T cells against minor histocompatibility antigens: ex vivo expansion for prevention of graft-versus-host disease. *Blood* 2013;122(13):2251–61.
- [284] Sangiolo D. Redirected T cells in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2015;15(12):1667–70.
- [285] Duong CPM, Yong CSM, Kershaw MH, Slaney CY, Darcy PK. Cancer immunotherapy utilizing gene-modified T cells: From the bench to the clinic. *Mol Immunol.* 2015;67(2 Pt A):46–57.
- [286] Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grützkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(9):2378–89.
- [287] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol.* 2007;19(4):345–54.
- [288] Scottà C, Fanelli G, Hoong SJ, Romano M, Lamperti EN, Sukthankar M, et al. Impact of immunosuppressive drugs on the therapeutic efficacy of ex vivo expanded human regulatory T cells. *Haematologica.* 2016;101(1):91–100.

- [289] Hester J, Schiopu A, Nadig SN, Wood KJ. Low-dose rapamycin treatment increases the ability of human regulatory T cells to inhibit transplant arteriosclerosis in vivo. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2012;12(8):2008–16.
- [290] Scottà C, Esposito M, Fazekasova H, Fanelli G, Edozie FC, Ali N, et al. Differential effects of rapamycin and retinoic acid on expansion, stability and suppressive qualities of human CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) T regulatory cell subpopulations. *Haematologica* 2013;98(8):1291–9.
- [291] Hippen KL, Merkel SC, Schirm DK, Nelson C, Tennis NC, Riley JL, et al. Generation and large-scale expansion of human inducible regulatory T cells that suppress graft-versus-host disease. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2011;11(6):1148–57.
- [292] Coenen JJA, Koenen HJPM, van Rijssen E, Kasran A, Boon L, Hilbrands LB, et al. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+ CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(9):537–45.
- [293] Wu T, Zhang L, Xu K, Sun C, Lei T, Peng J, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol.* 2012;27(1):30–8.

INTECH

CV et liste des publications

Jason OSSART

241b routes de Vertou
44200 NANTES
FRANCE

DOB: 5th of December 1989

+33 (0)6.07.56.13.66

✉ jason.ossart@univ-nantes.fr

Postdoctoral Fellow in Immunology

EDUCATION

- 2018** **PhD** in Health and Life Sciences, Specialty Immunology, University of Nantes, France. **Will be defended in 01/30/18.** "Study of the mechanisms of tolerance, implication of Aire in auto-immunity, regulatory T cells selection and alloreactivity"
- 2014** **French Certificate of Animal Care**, Level I, Veterinary School, Nantes, France
- 2014** **Master's Degree** in Physiology of regulations, University of Brest, France
- 2012** **Bachelor's Degree** in Cellular and Physiologic Biology, University of Brest, France
- 2008** **A levels** in maths, physics, chemistry, biology, Cornouaille secondary school, Quimper

RESEARCH EXPERIENCE

October 2014- Present

PhD Student, directed by Dr. Carole Guillonnet and Pr. Régis Josien, Inserm UMR1064, Nantes, France

Research project: Study of mechanisms of tolerance, implication of Aire in auto-immunity, regulatory T cells selection and alloreactivity.

- Characterization of a new model of Aire deficiency in rat
- Study populations, frequency and function of Tregs in Aire^{-/-} rats
- Analyse of characteristics of antigen specific Tregs in rat

January-June 2014

Master's Internship, Inserm UMR1064, Nantes, France

Project: Study of mechanisms of tolerance, implication of Aire in auto-immunity, regulatory T cells selection and alloreactivity. Supervisor: Dr. Carole Guillonnet and Pr. Régis Josien

April-June 2013

Master's Internship, Inserm UMR1227, Brest, France

Subject: Study mechanisms of action of Bregs to control the in vitro differentiation of human Th17 cells.

Supervisor: Dr. Sophie Hillion

TECHNICAL SKILLS

Microscopy analysis

Use of confocal microscopy (Nikon A1RS)
Analysis with ImageJ (FIJI)
Slide scanner (Nanozoomer Hamamatsu)
Analysis with NDP viewer

Cytometry analysis

Membrane and intra-cellular protein detection, multi-color analysis (Canto, LSR II, FACS Verse), compensation
Cell Sorting (FACS ARIA): multi-color staining, two and four-way sorting, single cell sorting

Tetramer technology: tetramerization, dual-fluorochrome strategy staining
Detection of donor specific anti-MHC antibodies

Rodent studies

Ten-days (100 hours) training course in animal experiment (animal handling, welfare, experimental procedure, legislation...), 2014.

Intracardiac injection of adenovirus on grafted rats and suture

Injection of therapeutic agent or cells (subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal and intravenous)

Intracardiac blood sampling

Oral gavage

Organ harvesting (lymph nodes, heart, spleen, blood, eyes...)

Monitoring of cardiac graft survival

Maintenance, contention, anesthesia

Breeding and maintenance of a colony of rat

Molecular biology

PCR

DNA cloning, DNA purification

Analysis of gene expression: RNA purification, RT-PCR, qRT-PCR

Bacterial transformation with plasmid DNA: heat shock, electroporation

Analysis of DNA sequencing

Cell culture

Cell Isolation from various organs (Ficoll, magnetic beads)

Mixed Lymphocyte Reaction

Cell Proliferation Assay (CFSE, CPD)

Cytotoxicity Assay

Isolation of medullary thymic epithelial cells

Biochemistry

Immunohistochemistry (Paraffin embedded and Frozen samples, multiple staining...)

ELISA for cytokine detection

Western Blot SDS-PAGE

Protein purification and quantification

ADDITIONAL SKILLS

Project Management

Presentation of results: English scientific meetings, posters, oral presentations

Weekly Journal Club attendance: English oral presentation of papers, critical review of the current literature

Trainees Supervision: Supervised a Master student

Languages: French (native speaker)

Fluent Scientific English

IT: Word, Excel, Power Point, FlowJo, EndNote, Zotero, GraphPad Prism, Sequence Scanner, Fiji, R (basics).

PUBLICATIONS

- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Laure-Hélène Ouisse, Anne Moreau, Claire Usal, Jérôme Martin, Pärt Peterson, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. Breakdown of tolerance induces a severe APECED-like auto-immune disease independently of the genetic background in Aire-deficient rats. *Journal of Auto-immunity*, **submitted**
- Elodie Picarda, **Jason Ossart**, Séverine Bézie, Carole Guillonnet. Key role of alloptide-specific CD8(+) Tregs in transplantation. *Med science* 2015 Jan;31(1):22-4.
- Séverine Bézie, Elodie Picarda, **Jason Ossart**, Laurent Tesson, Claire Usal, Karine Renaudin, Ignacio Anegón, and Carole Guillonnet. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J Clin. Invest* 2015 Oct 1;125(10):3952-64.
- Séverine Bézie, Elodie Picarda, **Jason Ossart**, Bernard Martinet, Ignacio Anegón and Carole Guillonnet. Compensatory Regulatory Networks between CD8 T, B, and Myeloid Cells in Organ Transplantation Tolerance. *J Immunol* 2015 Dec 15;195(12):5805-15.
- Laetitia Boucalt, Séverine Bézie, Jason Ossart and Carole Guillonnet. Tolerance in Organ Transplantation, Book chapter: *Frontiers in Transplantation*.

COMMUNICATIONS

- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. A unique model of APECED-like rat display strong auto-immune symptoms. European Congress of Immunology, September 06-09, 2015, Vienna, Austria (ORAL PRESENTATION)
- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. Characterization of Aire-deficient rats revealed altered Treg function and increased alloreactivity. FOCIS 2016, June 22-25, 2016, Boston, USA (POSTER, also presented at the FOCIS Center of Excellence)
- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Nicolas Degauque, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. Altered Treg function following Aire-deficiency in rats, new insights of the role of Aire on Tregs selection. Annual meeting of the French Society for Immunology, November 28-30, 2016, Paris, France (POSTER)
- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Nicolas Degauque, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. Breakdown of central tolerance induces a severe APECED-like auto-immune disease in a unique Aire-deficient rat model. Transgenics Rat Meeting, May 11-13, 2017, Nantes, France (ORAL PRESENTATION + POSTER)
- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Nicolas Degauque, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegón, Régis Josien and Carole Guillonnet. Altered Treg function following Aire-deficiency in rats, new insights of the role of Aire on Tregs selection, 22nd NAT 2017 meeting « Immunotherapies in transplantation and cancer », June 01-02, 2017, Nantes, France (POSTER)

- **Jason Ossart**, Séverine Ménoret, Elodie Autrusseau, Anne Moreau, Nicolas Degauque, Claire Usal, Jérôme Martin, François-Xavier Hubert, Ignacio Anegon, Régis Josien and Carole Guillonneau. Altered Treg function following Aire-deficiency in rats, new insights of the role of Aire on Tregs selection. FOCIS 2017, June 14-17, 2012, Chicago, USA (POSTER)

FELLOWSHIP

Fondation pour la recherche médicale (Thesis subvention)

ASSOCIATIONS

FOCIS Member

French society of immunology Member

REFERENCES

Carole Guillonneau, PhD
INSERM UMR1064
30 Boulevard Jean Monnet
44093 Nantes, France

☎ +33 (0)2.40.08.75.96

✉ carole.guillonneau@univ-nantes.fr

Ignacio Anegon, M.D
INSERM UMR1064
30 Boulevard Jean Monnet
44093 Nantes, France

☎ +33 (2)2.40.08.74.14

✉ ignacio.anegon@univ-nantes.fr

Régis Josien, M.D
Director INSERM UMR1064
30 Boulevard Jean Monnet
44093 Nantes, France

☎ +33 (0)2.40.08.74.13

✉ regis.josien@univ-nantes.fr

Thèse de Doctorat

Jason OSSART

Génération et analyse d'un nouveau modèle de la maladie
APECED par déficience pour Aire chez le ratGeneration and analyse of a new model of APECED disease induced by Aire
deficiency in rat

Résumé

Les maladies auto-immunes sont dues à une rupture de la tolérance au soi et donc à un dysfonctionnement du système immunitaire. La protéine auto-immune regulator (Aire) est un régulateur de la transcription exprimé par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC) qui joue un rôle très important dans la tolérance centrale en régulant l'expression d'antigènes spécifiques de tissus (TSA) et ainsi la sélection négative des lymphocytes T immatures présentant un TCR de haute affinité pour un auto-antigène. Cependant, le rôle de Aire dans la sélection et la fonction des lymphocytes T régulateurs (Tregs) reste controversé. Nous avons généré un modèle de rats déficients pour Aire en utilisant la technologie des ZFN. En effet, nous avons pu mettre en évidence l'expression chez le rat, tout comme chez l'Homme, de Aire au niveau du messager mais aussi de la protéine dans le thymus et en périphérie. Nous avons décrit que ces rats présentent de forts symptômes auto-immuns comme l'alopecie, le vitiligo et l'ongulo-dystrophie, mais également des lésions histologiques importantes et de nombreux auto-anticorps circulant dans le sérum contre de nombreux organes. Nous avons également pu mettre en évidence un défaut de fonction des Tregs $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$ in vivo dans un modèle de wasting disease mais pas de défaut des Tregs $CD8^+CD45RC^{low}$.

Mots clés

-Aire-APECED-Tregs-Rat-

Abstract

Autoimmune diseases are due to a break in self-tolerance and to a dysfunction of the immune system. The autoimmune regulator protein (Aire) is a transcription regulator expressed by medullary thymic epithelial cells (mTEC). It is playing an important role in central tolerance by the negative selection of highly specific autoreactive T cells through the expression of tissue-specific antigens (TSA). However, the role of Aire in regulatory T cell selection remains unclear and controversial. We generated a model of Aire-deficient rat using the zinc finger nuclease (ZFN) technology. Indeed, we highlighted the same pattern of expression of Aire between rat and human in the thymus as well as in the periphery. We showed that Aire-deficient rats display strong auto-immune symptoms such as alopecia, vitiligo or nail dystrophy but also strong histological lesions and numerous circulating auto-antibodies targeting numerous organs. We also evidenced a defect, in vivo, in a model of wasting disease, in the function of $CD4^+CD25^{hi}CD127^{low}$ Tregs but not $CD8^+CD45RC^{low}$.

Key Words

---Aire-APECED-Tregs-Rat-----